



ROZPRAWA DOKTORSKA

*Elżbieta Studzińska-Sroka*

# **Porosty jako źródło związków aktywnych biologicznie**

Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji  
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
Promotor: **dr hab. Wiesława Bylka, prof. UM**

Poznań, 2013



ROZPRAWA DOKTORSKA

*Elżbieta Studzińska-Sroka*

# **Lichens as a source of bioactive compounds**

Department of Pharmacognosy  
Poznan University of Medical Sciences  
Promoter: **dr hab. Wiesława Bylka, prof. UM**

Poznan, 2013

**Słowa kluczowe:**

porosty, wyciągi, izolacja związków, identyfikacja, aktywność biologiczna

**Key words:**

lichens, extracts, isolation of lichen substances, identification, biological activity

*Pani Profesor Wiesławie Bylce  
pragnę serdecznie podziękować  
za wyrozumiałość, poświęcony czas,  
cenne uwagi merytoryczne  
oraz pomoc w trakcie realizacji niniejszej pracy*

*Serdecznie dziękuję  
Pani Profesor Irenie Matławskiej  
za umożliwienie wykonania pracy doktorskiej*

*Szczególnie dziękuję Panu dr hab. Markowi Muriasowi  
za współpracę w realizacji badań aktywności cytotoksycznej,  
pomoc w interpretacji danych i wielką życzliwość*

*Serdeczne podziękowania składam również  
Panu Profesorowi Bogdanowi Kędzi  
Pani mgr Elżbiecie Holdernie-Kędzi  
Panu dr hab. Karolowi Kacprzakowi  
Panu dr Łukaszowi Marczakowi  
Pani dr Agnieszce Galanty  
za pomoc w realizacji części badań*

*Dziękuję Pani dr hab. Annie Katrusiak  
za konsultacje naukowe*

*Pragnę również bardzo podziękować Pani dr Darii Zarabskiej  
za pomoc w zbiorze surowca do badań,  
dyskusje i wprowadzenie w świat lichenologii*

*Dziękuję wszystkim pracownikom Katedry i Zakładu Farmakognozji  
za wskazówki, pomoc, owocne dyskusje  
oraz miłą atmosferę pracy*

*Najbliższym dziękuję za wsparcie*

# *SPIS TREŚCI*

---

WSTĘP .....	12
CZEŚĆ TEORETYCZNA .....	15
1. Ogólna charakterystyka porostów jako grupy ekologicznej .....	16
1.1. Anatomia i morfologia porostów .....	16
1.2. Metabolity porostów .....	19
1.3. Biosynteza wtórnych metabolitów porostowych .....	20
1.4. Aktywność biologiczna porostów .....	24
1.4.1. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa .....	24
1.4.2. Aktywność przeciwnowotworowa .....	30
1.4.3. Aktywność antyoksydacyjna .....	37
1.4.4. Inne kierunki aktywności biologicznej .....	43
2. Charakterystyka badanych gatunków porostów .....	48
2.1. Wybór gatunków do badań .....	48
2.2. Systematyka .....	48
2.3. Charakterystyka botaniczna i chemizm badanych gatunków porostów .....	49
2.3.1. <i>Hypogymnia physodes</i> .....	49
2.3.2. <i>Parmelia sulcata</i> .....	51
2.3.3. <i>Hypocenomyce scalaris</i> .....	52
2.3.4. <i>Cladonia uncialis</i> .....	53
3. Aktywność biologiczna badanych porostów .....	54
3.1. Aktywność biologiczna związków otrzymanych z badanych gatunków porostów ....	54
3.1.1. Atranoryna .....	55
3.1.2. Chloroatranoryna .....	59
3.1.3. Kwas lekanorowy .....	60
3.1.4. Kwas skwamatowy .....	63
3.1.5. Kwas fizodowy i jego pochodne .....	63
3.1.6. Kwas salazynowy .....	65
3.1.7. Kwas usninowy .....	67
3.2. Aktywność biologiczna wyciągów z badanych porostów .....	77
3.2.1. <i>Hypogymnia physodes</i> i <i>Parmelia sulcata</i> .....	77
3.2.2. <i>Hypocenomyce scalaris</i> i <i>Cladonia uncialis</i> .....	81
CEL PRACY .....	82
CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA .....	84

Wykaz stosowanych skrótów.....	85
4. Materiały i metody.....	89
4.1. Materiały.....	89
4.1.1. Badania fitochemiczne.....	89
4.1.2. Badania aktywności antyoksydacyjnej.....	90
4.1.3. Badania aktywności cytotoksycznej.....	90
4.2. Surowiec do badań.....	92
4.3. Metody.....	93
4.3.1. Ekstrakcja.....	93
4.3.1.1. Przygotowanie wyciągów do badań fitochemicznych.....	93
4.3.1.2. Przygotowanie wyciągów do badań aktywności biologicznej.....	95
4.3.2. Analiza jakościowa.....	96
4.3.2.1. Chromatografia analityczna cienkowarstwowa (TLC).....	96
4.3.3. Izolacja związków.....	97
4.3.3.1. Chromatografia preparatywna cienkowarstwowa (PTLC).....	97
4.3.3.2. Chromatografia kolumnowa preparatywna (CC).....	98
4.3.3.3. Krystalizacja.....	98
4.3.3.4. Izolacja związków z <i>Hypogymnia physodes</i> .....	98
4.3.3.5. Izolacja związków z <i>Parmelia sulcata</i> .....	100
4.3.3.6. Izolacja związków z <i>Hypocenomyce scalaris</i> .....	101
4.3.3.7. Izolacja związków z <i>Cladonia uncialis</i> .....	103
4.3.4. Identyfikacja związków.....	103
4.3.4.1. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).....	103
4.3.4.2. Spektroskopia w nadfiolecie (UV).....	104
4.3.4.3. Spektrometria mas (MS).....	104
4.3.4.4. Pomiar skręcalności optycznej.....	104
4.3.5. Analiza ilościowa.....	104
4.3.5.1. Oznaczanie zawartości sumy polifenoli z odczynnikiem Folin-Ciocalteu.....	104
4.3.5.2. Oznaczenie zawartości kwasu (-)-usninowego w wyciągach z <i>C. uncialis</i> metodą HPLC.....	106
4.3.6. Badania aktywności biologicznej.....	108
4.3.6.1. Badania aktywności antyoksydacyjnej.....	108
4.3.6.1.1. Przygotowanie roztworów związków i wyciągów do badań aktywności antyoksydacyjnej.....	108



4.3.6.1.2. Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej za pomocą analizy z rodnikiem DPPH' .....	109
4.3.6.1.3. Oznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej w oparciu o redukcję jonów żelaza (III) (FRAP) .....	110
4.3.6.2. Badania aktywności cytotoksycznej .....	112
4.3.6.2.1. Hodowla komórek.....	112
4.3.6.2.2. Przygotowanie roztworów związków i wyciągów do badań aktywności cytotoksycznej .....	113
4.3.6.2.3. Ocena cytotoksyczności badanych związków za pomocą testu MTT .....	114
4.3.6.2.4. Ocena cytotoksyczności badanych związków za pomocą testu z fioletem krystalicznym.....	115
4.3.6.2.5. Ocena cytotoksyczności badanych związków za pomocą testu z czerwonią obojętną.....	116
4.3.7. Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej .....	116
4.3.7.1. Drobnoustroje do badań.....	117
4.3.7.2. Przygotowanie wyciągów do badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej .....	117
4.3.7.3. Oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej metodą seryjnych rozcieńczeń .....	118
4.4. Analiza statystyczna .....	118
5. Wyniki .....	119
5.1. Ekstrakcja.....	119
5.2. Analiza jakościowa otrzymanych wyciągów .....	120
5.3. Izolacja związków.....	122
5.3.1. Badania <i>Hypogymnia physodes</i> .....	122
5.3.1.1. Izolacja związku Hp_1 (kwas fizodowy).....	122
5.3.1.2. Izolacja związku Hp_2 (kwas fizodalowy).....	122
5.3.1.3. Otrzymanie mieszaniny związków Hp_3 i Hp_4 (atranoryna i chloroatranoryna) .....	123
5.3.2. Badania <i>Parmelia sulcata</i> .....	123
5.3.2.1. Izolacja związku Ps_1 (kwas salazynowy).....	123
5.3.3. Badania <i>Hypocenomyce scalaris</i> .....	124
5.3.3.1. Izolacja związku Hs_1 metodą PTLC (kwas lekanorowy).....	124
5.3.3.2. Izolacja związku Hs_1 metodą krystalizacji (kwas lekanorowy).....	125
5.3.4. Badania <i>Cladonia uncialis</i> .....	125
5.3.4.1. Izolacja związku Cu_1 (kwas usninowy) .....	125

5.3.4.2. Izolacja związku Cu_2 (kwas skwamatowy).....	126
5.4. Identyfikacja związków .....	127
5.4.1. Identyfikacja związku Hp_1 (kwas fizodowy) .....	127
5.4.2. Identyfikacja związku Hp_2 (kwas fizodalowy) .....	135
5.4.3. Identyfikacja mieszaniny Hp_3+Hp_4 (atranoryna i chloroatranoryna).....	139
5.4.4. Identyfikacja związku Ps_1 (kwas salazynowy) .....	142
5.4.5. Identyfikacja związku Hs_1 (kwas lekanorowy).....	147
5.4.6. Identyfikacja związku Cu_1 (kwas usninowy).....	152
5.4.7. Identyfikacja związku Cu_2 (kwas skwamatowy) .....	158
5.5. Oznaczenie sumy polifenoli metodą z odczynnikiem Folin-Ciocalteau.....	165
5.5.1. Krzywa kalibracyjna dla kwasu galusowego.....	165
5.5.2. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli w badanych wyciągach w przeliczeniu na kwas galusowy.....	166
5.5.2.1. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli w wyciągach z <i>H. physodes</i> .....	166
5.5.2.2. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli w wyciągach z <i>P. sulcata</i> .....	167
5.5.2.3. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli w wyciągach z <i>H. scalaris</i> .....	167
5.5.2.4. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli w wyciągach z <i>C. uncialis</i> .....	168
5.6. Oznaczenie zawartości kwasu (-)-usninowego w wyciągach z <i>C. uncialis</i> metodą HPLC .....	169
5.7. Badania aktywności antyoksydacyjnej .....	174
5.7.1. Oznaczenie właściwości zmiatania wolnych rodników z zastosowaniem odczynnika DPPH .....	174
5.7.2. Oznaczenie zdolności redukowania jonów żelaza Fe <sup>3+</sup> (FRAP).....	181
5.7.3. Zestawienie wyników badań aktywności antyoksydacyjnej i oznaczenia całkowitej zawartości polifenoli w analizowanych wyciągach.....	184
5.8. Badania aktywności cytotoksycznej .....	186
5.9. Badania aktywności mikrobiologicznej.....	194
OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW .....	196
6. Omówienie i dyskusja wyników .....	197
6.1. Ekstrakcja.....	197
6.2. Analiza jakościowa .....	198
6.3. Izolacja związków.....	199
6.4. Identyfikacja związków .....	200
6.4.1. Związek Hp_1 (kwas fizodowy).....	201

---

6.4.2. Związek Hp_2 (kwas fizyodalowy) .....	202
6.4.3. Związki Hp_3 + Hp_4 (mieszania atranoryny i chloroatranoryny).....	203
6.4.4. Związek Ps_1 (kwas salazynowy) .....	205
6.4.5. Związek Hs_1 (kwas lekanorowy) .....	206
6.4.6. Związek Cu_1 (kwas (-)-usninowy) .....	207
6.4.7. Związek Cu_2 (kwas skwamatowy) .....	209
6.5. Analizy ilościowe .....	210
6.6. Aktywność biologiczna.....	211
6.6.1. Właściwości antyoksydacyjne .....	211
6.6.2. Właściwości cytotoksyczne .....	215
6.6.3. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe .....	222
<i>PODSUMOWANIE I WNIOSKI</i> .....	227
<i>STRESZCZENIE</i> .....	231
<i>SUMMARY</i> .....	236
<i>SPIS TABEL I RYCIN</i> .....	240
Spis tabel.....	241
Spis rycin .....	243
<i>PIŚMIENNICTWO</i> .....	246

***WSTEP***

Porosty (grzyby lichenizowane), to mało zbadane organizmy o ciekawych właściwościach. Wytwarzane przez nie związki często nie są spotykane w świecie roślin czy zwierząt. Aktualnie piśmiennictwo donosi o zidentyfikowaniu w porostach około 1050 substancji. Postęp w stosowanych metodach badawczych sprawił, że liczba ta przez ostatnie 15 lat wzrosła niemal dwukrotnie [Nash 2008, Molnár i Farkas 2010].

Ciągle niewiele wiadomo o znaczeniu substancji wytwarzanych przez porosty. Pewne jest, że związki te są niezbędne dla ich prawidłowego rozwoju. Wykazano, że metabolity wtórne ochraniają porosty przed niszczącym wpływem zanieczyszczeń środowiska. Ponadto mogą zabezpieczać grzyby lichenizowane przed działaniem promieni słonecznych i rozwojem zagrażających porostom mchów lub roślin naczyniowych, a także atakiem mikroorganizmów. Obecność niektórych substancji odstrasza też roślinożerne zwierzęta, zabezpieczając plechy przed zjedzeniem [Huneck 1999]. Wszystko to sprawiło, że porosty, pomimo często trudnych warunków rozwoju, zdołały opanować wiele środowisk nierzadko nieosiągalnych dla innych organizmów (są to tzw. organizmy pionierskie).

Prowadzone badania wykazały, że substancje wytwarzane przez porosty wywierają działanie biologiczne na organizm człowieka. Dane literaturowe mówiące o stosowaniu plech i przygotowanych z nich specyfików w medycynie ludowej wielu kultur wskazują, że porosty mogą stanowić cenny surowiec leczniczy. W Grecji Hipokrates zalecał *Usnea barbata* zwłaszcza w chorobach kobiecych, natomiast nieco później Dioskurydes zachwalał działanie tego samego porostu w takich problemach jak: bezsenność, wymioty, biegunki, żółtaczka. W Egipcie już w XVIII wieku p.n.e. zwrócono uwagę na lecznicze właściwości *Evernia furfuracea* (syn. *Pseudevernia furfuracea*). *Usnea longissima* (tzw. „Sun-Lo”) była wykorzystywana w medycynie chińskiej jako środek wykrztuśny oraz do leczenia owrzodzeń. Porosty z rodzaju *Usnea* znalazły zastosowanie także w medycynie malajskiej. Malajowie leczyli z ich pomocą infekcje górnych dróg oddechowych. Ponadto istnieją dane o stosowaniu porostów w medycynie arabskiej oraz przez Indian. Różne gatunki porostów stosowano również w tradycji europejskiej w celach leczniczych. Porosty zalecano w tym przypadku w: schorzeniach płuc, stanach zapalnych śluzówki jamy ustnej i gardła, nerek, leczeniu trudno gojących się ran, niestrawności, braku apetytu, a nawet wścieklicznie [Blumenthal 2000, Malhotra i wsp. 2008, Studzińska-Sroka 2008].

Dziś porosty mają niewielkie znaczenie w medycynie. Oficjalnie, w celach leczniczych stosowany jest porost islandzki (*Cetraria islandica*), który posiada

monografię w FP IX i PhE VII [Farmakopea Polska IX, European Pharmacopoeia VII]. Surowiec ten, w formie wyciągów stanowi skład kilku preparatów leczniczych do użytku wewnętrznego, obecnych na Polskim rynku aptecznym. Ponadto zdarza się, że wyciągi z porostów dodawane są do kosmetyków np. do past do zębów.

Zainteresowanie porostami ciągle się zwiększa, o czym świadczy zaobserwowany w ostatnich trzech latach (od roku 2010) istotny wzrost badań dotyczący biologicznej aktywności porostów oraz wytwarzanych przez nie związków. Zakres eksperymentów o charakterze *in vitro* i *in vivo* obejmuje coraz więcej kierunków. W piśmiennictwie można znaleźć informacje na temat działania: przeciwdrobnoustrojowego (w tym na oporne szczepy bakterii), antyoksydacyjnego, przeciwnowotworowego, przeciwzapalnego, przeciwbólowego, hipolipidemicznego, przeciwcukrzycowego czy immunomodulującego. Wśród substancji porostowych są też substancje, które mogłyby mieć zastosowanie w terapii chorób neurodegeneracyjnych (choroba Parkinsona, Alzheimer) lub być pomocne w leczeniu schorzeń dermatologicznych (np. łuszczyca) [Müller 2001, Boustie i Grube 2005, Studzińska i wsp. 2008, Bylka i Studzińska 2009, Studzińska-Sroka i Bylka 2010, De Paz i wsp. 2010, Molnár i Farkas 2010, Verma i wsp. 2012, Wei i wsp. 2012]. Wyniki prowadzonych prac uzasadniają słuszność wykorzystywania porostów w medycynie ludowej.

Z uwagi na uzyskiwane zachęcające wyniki eksperymentów porosty wydają się być dobrym materiałem do kolejnych prac o charakterze doświadczalnym, których celem byłoby poznanie cech związków i wyciągów porostowych mogących mieć zastosowanie w terapii różnych chorób.

# ***CZEŚĆ TEORETYCZNA***

## 1. Ogólna charakterystyka porostów jako grupy ekologicznej

### 1.1. Anatomia i morfologia porostów

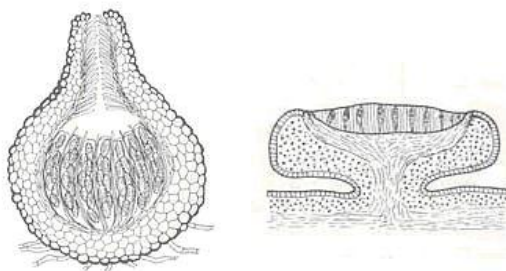
Porosty to organizmy, które do dziś budzą wiele pytań. Pierwsze uzasadnione prowadzonymi obserwacjami przypuszczenia o ich wyjątkowej, tzw. dwoistej naturze pojawiły się już w II połowie XIX wieku. Od tego czasu wielu uczonych próbowało wyjaśnić czym tak naprawdę porosty są [Podbielkowski i wsp. 1986, Haluwyn i Lerond 1993]. Porosty, przez setki lat zaliczane były do królestwa roślin. Pogląd ten, dzięki bardziej zaawansowanym metodom badawczym ewoluował i dziś wiadomo, że w sensie taksonomicznym porosty należą do królestwa grzybów. Wydaje się, że trafna jest definicja wybitnego amerykańskiego lichenologa Vernona Ahmadjiana, według której porosty to związek między grzybem tzw. mikobiontem i zdolnym do fotosyntezy partnerem - glonem lub sinicą tzw. fotobiontem. Zespolenie budujących plechę porostową komponentów daje „nową jakość”, co w konsekwencji prowadzi do powstania struktury odmiennej morfologicznie, anatomicznie i funkcjonalnie od poszczególnych partnerów wyjściowych [Ahmadjian 1993]. Problem określenia typu relacji zachodzącej między komponentami porostów, pozostaje bez jasnego rozwiązania. Największą popularnością cieszy się hipoteza symbiozy mutualistycznej (korzyści odnoszą wszystkie budujące porost komponenty), jednak coraz więcej badaczy twierdzi, że wzajemna kooperacja zachodzi na zasadzie helotyizmu, pasożytnictwa ograniczonego czy pasożytnictwa [Czarnota 2009, Podbielkowski i wsp. 1986, Bystrek 1997]. Proces powstawania porostów nazywany jest lichenizacją, stąd ich nazwa synonimowa grzyby lichenizowane. Wiadomo, że lichenizacji podlega około 15000 gatunków grzybów na świecie. Ponad 98% znanych gatunków grzybów lichenizowanych tworzą grzyby workowe (Ascomycota). Rzadko mikobiont jest przedstawicielem grzybów podstawkowych (Basidiomycota) czy grzybów niedoskonałych (Fungi imperfecta) [Czarnota 2009]. W większości zidentyfikowanych do tej pory gatunkach komponentem zielonym są glony z rodzaju Chlorophyta, w 10% cyjanobakterie i w 3% oba typy fotobiontów. W połączeniu z różnymi grzybami tworzą one odmienne taksony grzybów lichenizowanych [Oksanen 2006].

Plechę porostów może charakteryzować różna budowa. Wyróżnia się plechę homeomeryczną, gdzie komórki glonu i grzyba są bezładnie ułożone względem siebie oraz heteromeryczną, w której zauważyć można wyraźne warstwy złożone z komórek fotobionta (warstwa glonowa) i strzępek grzyba (miąższ, kora). Kształt plechy

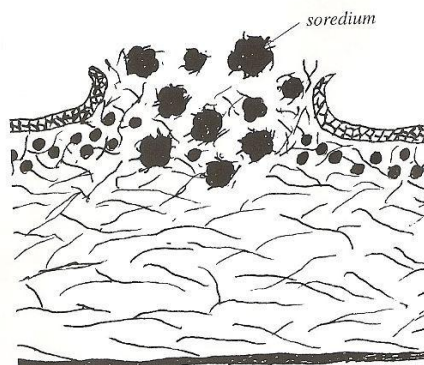


w zdecydowanej większości przypadków zależy od budującego ją grzyba. Wyróżnia się kilka typów plech, z których najważniejsze to: skorupiasta (ściśle przylegająca do podłoża), plakodiowa (na środku skorupiasta, ku obwodowi luźno przylegające do podłoża fragmenty), łuskowata (złożona z nieprzylegających do substratu łuseczek), listkowata (spłaszczona grzbietobrzusnie na kształt listków, dość luźno przyczepiona do podłoża, za pomocą chwytników), krzaczkowata (składa się z fragmentów w kształcie zwisających lub wznoszących się gałązek). Ponadto, niektóre porosty posiadają plechę dwupostaciową (w ciągu rozwoju porost wytwarza różne rodzaje plechy) [Bystrek 1997, Wójciak 2007].

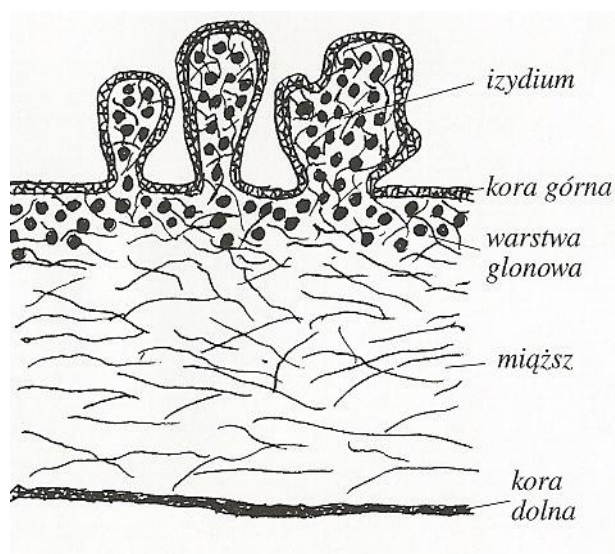
Na powierzchni plechy, porosty wytwarzają różne struktury, o ważnej dla przebiegu funkcji fizjologicznych roli. Są to m.in. owocniki, soralia i soledia (urwistki), izydia (wrostki), pyknidia, cefalodia, pseudocyfelle. Owocniki, będące organem rozmnażania płciowego grzyba, mają różną postać. Mogą to być apotecja, charakterystyczne dla workowców, perytecja jak u gromady podstawczaków lub inne znacznie mniej rozpowszechnione formy (rycina 1). Izydia i soledia to organy rozmnażania wegetatywnego. Znajdujące się na powierzchni plechy wzrostki mają postać brodaweczek (rycina 3). Urwistki przyjmują formę często jaśniejszego od zabarwienia plechy proszku i wydostają się z wnętrza plechy w miejscach zwanych soraliami (rycina 2). Wygląd soraliów ma znaczenie przy oznaczaniu porostów. Duża liczba porostów wytwarza pyknidia, czyli drobne, brodawczkowane twory z otworkiem, w których znajdują się zarodniki zwane pyknokonidiami. Cefalodia to skupiska fotobionta, odmiennego od tworzącego plechę (zazwyczaj sinic), który traktuje się jako kolejny komponent porostowy. Ponadto na powierzchni plechy porostu występują pseudocyfelle, czyli miejsca luźniejszego ułożenia strzępek grzyba, w których następuje wymiana gazowa [Podbielkowski i wsp. 1986, Bystrek 1997, Wójciak 2007].



**Rycina 1.** Budowa owocnika typu perytecjum i apotecjum [Podbielkowska 1995, Lipnicki i Wójciak 1995].



Rycina 2. Przekrój przez plechę z soralium [Wójciak 2007].



Rycina 3. Przekrój przez plechę heteromeryczną z izydiami [Wójciak 2007].

Siedliskiem porostów może być: kora drzew (epifity), skały (epility), gleba (epigeity), murszejące drewno (epiksyle), ale także beton, metal, szkło, skóra czy tworzywa sztuczne. Cechą charakterystyczną, wyróżniającą porosty od innych organizmów, jest zdolność wytwarzania specyficznych substancji, nazywanych zwyczajowo „kwasami porostowymi” (ang. *lichen substances*). Substancje te pełnią funkcję ochronną, broniąc porost przed wpływem szkodliwych czynników zewnętrznych (np. przed zwierzętami, drobnoustrojami, promieniowaniem słonecznym, zanieczyszczeniem środowiska), co ułatwia rozwój w trudnych warunkach środowiska. Ponadto produkowane przez porosty metabolity, są często cechą charakterystyczną odrębnych gatunków i w ten sposób stanowią ważny element ich identyfikacji wykorzystywany w chemotaksonomii [Nash 2008].

## 1.2. Metabolity porostów

W organizmach żywych występują dwie główne grupy substancji naturalnych. Są to metabolity pierwotne (substancje podstawowe zwane też pierwotnymi) oraz metabolity wtórne (substancje wtórne). Podział ten, wprowadzony najpierw w fizjologii roślin, przyjął się także w naukach biochemicznych i fitochemii. Do metabolitów pierwotnych, które pełnią rolę substancji energetycznych, budulcowych i zapasowych zalicza się białka, aminokwasy, tłuszcze, węglowodany, kwasy nukleinowe, czyli związki umożliwiające prawidłowy rozwój i przebieg podstawowych funkcji fizjologicznych. Metabolity wtórne to substancje należące do różnych grup chemicznych i pełniące rolę związków o specyficznych właściwościach, w tym aktywne biologicznie [Kohlmünzer 2007].

Pierwotne metabolity porostów występują również w roślinach lub grzybach. Zbadano, że w porostach ich biosynteza zachodzi prawdopodobnie z udziałem obu symbiontów: mikobionta i fotobionta [Nash 2008]. Dużą część związków porostowych stanowią metabolity wtórne, które często występują tylko w porostach. Według danych piśmiennictwa spośród około 1050 [Molnár i Farkas 2010] wyizolowanych dotychczas substancji wtórnych, zaledwie 50-60 z nich występuje w innych grzybach lub roślinach wyższych [Nash 2008]. Omawiane związki, często zwyczajowo nazywane kwasami porostowymi, magazynowane są na strzępkach grzybów, mogą być rozmieszczone w całej objętości lub w różnych miejscach plechy tj. w części korowej (np. atranoryna, kwas usninowy) lub w tzw. miększu (np. depsydony). Specyficzny może być też skład chemiczny organelli wegetatywnych (soralia, pyknidia, pseudocyfelle, cefalodia) lub wytwarzanych przez porost owocników (apotecja) [Orange i wsp. 2001].

Wykazano, że niektóre wytwarzane przez porosty metabolity wtórne powstają jedynie przy współpracy obu komponentów. Chociaż izolowane komórki mikobionta są zdolne do produkcji niektórych typowych dla porostów metabolitów wtórnych, to jednak bez udziału fotobionta nie jest możliwe syntetyzowanie związków identycznych z wytwarzanymi w danej wspólnocie życiowej komponentów.

Porostowe substancje wtórne są wytwarzane w komórkach grzyba. Źródłem związków węgla niezbędnych do produkcji substancji wtórnych, jest fotosynteza, przeprowadzana dzięki obecności w poroście komórek fotobionta. Zauważono, że jeśli w symbiozę wchodzi cyjanobakterie, węglowodanem dostarczanym do komórek grzyba jest glukoza. Gdy współżycie dotyczy grzyba i glonu, substratem tym jest rybitol, erytritrol lub sorbitol [Nash 2008].

### 1.3. Biosynteza wtórnych metabolitów porostowych

Wtórne metabolity porostowe powstają na drodze trzech podstawowych szlaków metabolicznych. Pierwszą grupę stanowią związki wywodzące się z aktywnego octanu tzw. poliketydy, kolejną tworzą pochodne kwasu mewalonowego, trzecią i ostatnią z omawianych są biogenetyczne pochodne kwasu szikimowego (rycina 5).

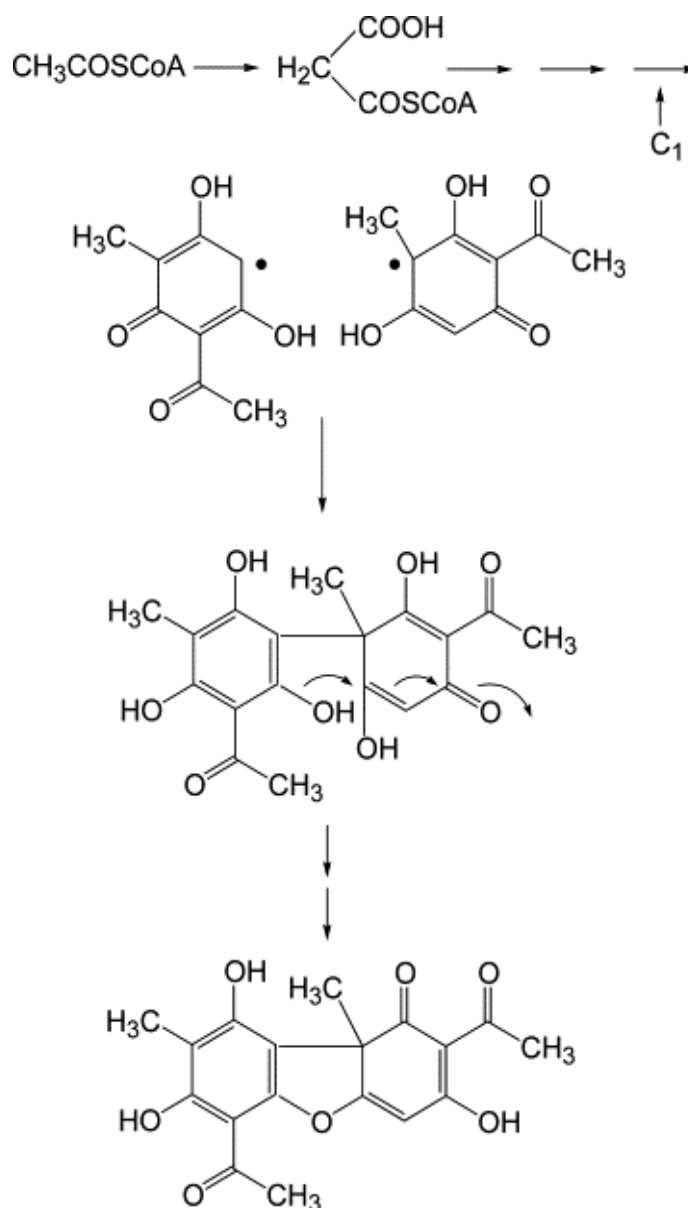
Najwięcej substancji wtórnych powstaje w wyniku przemian acetylo-CoA (**droga acetylopolimalonianu**). W procesie tworzenia związków o charakterze poliketydów bierze udział duża grupa enzymów: syntazy poliketydowe PKSs. Dołączenie do cząsteczki acetylo-CoA z udziałem karboksylazy acetylo-CoA kolejnych jednostek dwuwęglowych, prowadzi do powstania malonylo-CoA. Jest to substrat dla PKSs, katalizujących kolejne reakcje (kondensacja Claisena, która pozwala otrzymać cząsteczkę kwasu fenolowego z podstawnikiem metylowym oraz inne przemiany np. procesy redukcji i dehydratacji). Proces wydłużania łańcucha węglowego zakończony jest etapem cyklizacji i prowadzi do utworzenia cząsteczki kwasu orselinowego lub jego 3-metylowej pochodnej.

Metabolitami wtórnymi powstającymi na drodze acetylopolimalonianu są depsydy i depsydony. Podstawową strukturę tych związków stanowią dwie lub kilka cząsteczek kwasów fenolowych zespolonych wiązaniem estrowym. Jako pierwsze, przez połączenie wiązaniem estrowym cząsteczek orcynolu lub  $\beta$ -orcynolu (kwasu orcynolowego lub 3-metylo orcynolowego), powstają despsydy [Nash 2008]. Depsydony są biogenetyczną pochodną depsydów, tworzoną na skutek wprowadzenia do cząsteczki wiązania eterowego. Wydaje się, że depsydy i depsydony biogenetycznie wywodzą się z cząsteczki o takiej samej strukturze, a ich końcowa budowa chemiczna zależy od zachodzących w drodze biosyntezy reakcji biochemicznych [Dayan 2001, Legaz i wsp. 2011].

Interesująca wydaje się rola *para*-depsydów w biosyntezie związków porostowych. Uważa się, że są to prekursorzy, bądź też związki pośrednie, w procesie tworzenia *meta*-depsydów, depsonów, eterów difenylowych, depsydonów i dibenzofuranów [Nash 2008].

Kwas usninowy, pochodna dibenzofuranu, powstaje prawdopodobnie w innym niż depsydy i depsydony typie cyklizacji wyjściowego poliketydu. Przed procesem aromatyzacji do cząsteczki poliketydu zostaje włączony jednowęglowy fragment ( $C_1$ ). Prowadzi to do utworzenia cząsteczek metylofloracetofenonu, które w wyniku stereospecyficznego oksydacyjnego parowania się tworzą uwodniony kwas usninowy.

Kolejno, wskutek utraty cząsteczki wody dochodzi do powstania wiązania eterowego i utworzenia cząsteczki kwasu usninowego [Ingólfssdóttir 2002].



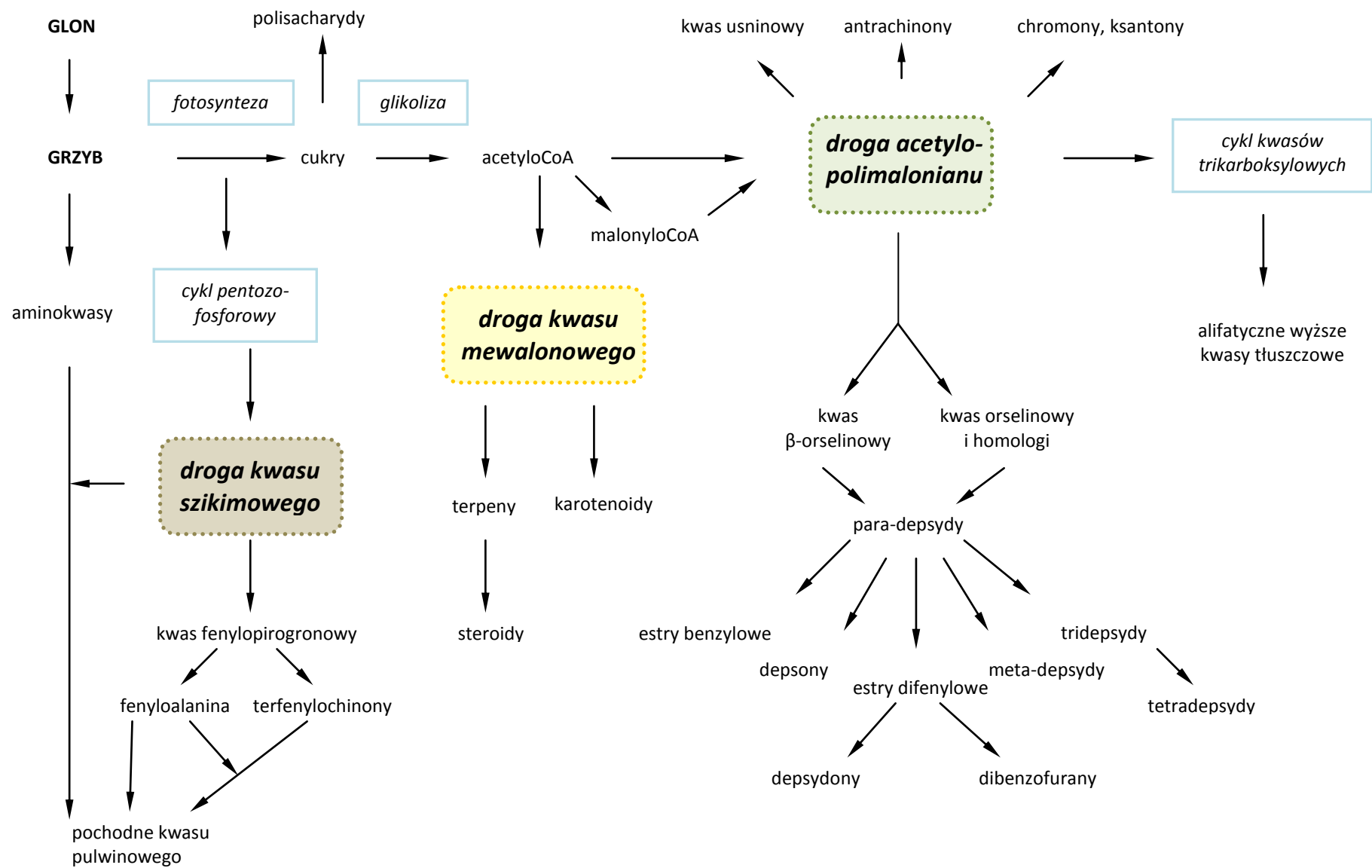
**Rycina 4.** Biosynteza kwasu usninowego [Ingólfssdóttir 2002].

Na drodze przemian acetylopolimalonianu powstają także inne występujące w porostach związki. Są to, obecne również w roślinach czy grzybach substancje o strukturze: chromonów (cyklizacja pentaketydów), ksantonów (cyklizacja heksaketydów), antrachinonów (cyklizacja oktaketydów) [Nash 2008, Dayan 2001].

Punktem wyjścia w biosyntezie metabolitów wtórnych z udziałem **kwasu mewalonowego** jest podobnie jak w omawianej biogenezie poliketydów, acetylo-CoA. W wyniku przemian z udziałem acetylo-CoA powstają cząsteczki kwasu mewalonowego,

który następnie przekształca się w izopentylopirofosforan czyli tzw. „aktywny izopren”. W wyniku polimeryzacji 5 węglowych jednostek aktywnego izoprenu powstają terpeny, steroidy i karotenoidy. Porosty nie są zdolne do wytwarzania seskwiterpenów. Jak dotąd w ich plechach stwierdzono obecność tylko dwóch związków o strukturze diterpenów. Bardziej rozpowszechnione są triterpeny (ponad 20). Większość metabolitów wtórnych związanych biogenetycznie z drogą kwasu mewalonowego, występuje także w roślinach wyższych i grzybach.

Niektóre związki porostowe powstają w szlaku biogenetycznym prowadzącym poprzez kwas szikimowy. Produktami wyjściowymi jest fosforylowana tetroza (4-fosforan erytrozy) oraz fosfoenolopirogronian. Biochemiczne przemiany obu związków prowadzą do powstania kwasu szikimowego, a następnie kluczowego produktu pośredniego szlaku, kwasu choryzmowego [Kohlmünzer 2007]. Jest on prekursorem aromatycznych aminokwasów, w tym fenyloalaniny, która powstając z kwasu fenylopirogronowego na drodze reduktywnej aminacji, stanowi substrat w biosyntezie kwasu pulwinowego i jego pochodnych [Boustie i Grube 2005, Nash 2008].



23 **Rycina 5.** Prawdopodobne drogi biosyntezy prowadzące do powstania większości grup substancji porostowych [Nash 2008].

## 1.4. Aktywność biologiczna porostów

### 1.4.1. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa porostów została zauważona już w ubiegłym stuleciu. Po otrzymaniu penicyliny z *Penicillium* sp. metabolity wtórne porostów, czyli organizmów z pogranicza świata roślin i grzybów, stały się przedmiotem intensywnych badań. Pierwsze naukowe doniesienie o przeciwdrobnoustrojowej aktywności porostów pochodzą z pierwszej połowy XX wieku. Testowano wówczas zarówno wyciągi jak i wyizolowane związki, a otrzymanywane wyniki były bardzo obiecujące. Nad badaniem właściwości przeciwbakteryjnych porostów i ich metabolitów w latach 30. i 40. pracowali niezależnie naukowcy z różnych krajów. Spadek zainteresowania porostami przyszedł wraz z erą antybiotyków syntetycznych. Obecnie, wskutek narastającej lekooporności drobnoustrojów badania porostów są znów aktualne, a prowadzone przez lata prace pozwalają przypuszczać, że nawet 50% wszystkich porostów posiada właściwości antybiotyczne [Malthora i wsp. 2008, Kusumaningrum i wsp. 2011].

Badania nad działaniem przeciwdrobnoustrojowym porostów dotyczą wyciągów i związków. Wśród metabolitów wtórnych o strukturze depsydów przebadano obecny w porostach  **kwas difraktowy** i  **kwas oliwatorowy**. Pomimo dużego podobieństwa w budowie do badanej równolegle atranoryny oba związki miały znacznie wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową. Rezultaty badań wykazały, że minimalne stężenie hamujące rozwój prątków gruźlicy było około 16 razy niższe dla kwasu difraktowego niż atranoryny (MIC = 15,6 µg/ml dla kwasu difraktowego i 250 µg/ml dla atranoryny). Kwas oliwatorowy działał najsilniej na *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, natomiast nie wykazywał znaczącego wpływu na komórki *Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli*. Testy na grzybach strzępkowych dowiodły jego słabszego od chloroatranoryny działania na ten typ mikroorganizmów [Honda i wsp. 2010, Türk i wsp. 2006].

Właściwości przeciwdrobnoustrojowe  **kwasu fumaroprotocetrarowego** (depsydon), potwierdzono badaniami *in vitro*. W testach aktywności przeciwdrobnoustrojowej, aktywność związku odnotowano w stosunku do *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* oraz *Listeria monocytogenes*. Kwas fumaroprotocetrarowy słabo działał na drożdżoidalne grzyby takie jak: *Candida albicans* i *Candida glabrata* [Yilmaz i wsp. 2004]. Aktywność kwasu fumaroprotocetrarowego oraz  **stiktowego** oceniono również w innym badaniu na 6 szczepach bakterii (Gram-dodatnich i Gram-ujemnych)



oraz na 10 szczepach grzybów. Kwas fumaroprotocetrarowy posiadał aktywność przeciwbakteryjną przy MIC od 0,031 do 0,062 mg/ml oraz przeciwgrzybiczą przy MIC od 0,125 do 0,250 mg/ml i działał najsilniej na komórki bakteryjne *Klebsiella pneumoniae*. Kwas stiktowy wykazywał niską aktywność, a odnotowana wartość MIC zarówno wobec badanych grzybów jak i bakterii była 5-10 razy wyższa niż dla innych badanych równocześnie związków porostowych. Substancje wzorcowe (streptomycyna i ketokonazol) działały nawet 100 silniej [Ranković i Mišić 2008].

**Kwas norstiktowy** to depsydon, o wysokiej aktywności wobec *Mycobacterium tuberculosis* (MIC = 62,5 µg/ml). Związek, z uwagi na mniejszą polarność od innych testowanych związków, cechowało wyższe powinowactwo do lipofilnych błon biologicznych, co mogłoby tłumaczyć silniejsze działanie kwasu norstiktowego od związków bardziej polarnych, m.in. od badanego równolegle kwasu salazynowego [Honda i wsp. 2010]. W innym eksperymencie kwas norstiktowy badano równocześnie z kwasem usninowym. Wyniki tego eksperymentu świadczyły o słabszym działaniu depsydonu. Rezultaty kolejnego badania wykazały, że kwas norstiktowy działał silnie na *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus faecalis* a także na grzyby drożdżoidalne *C. albicans* i *C. glabrata* [Tay i wsp. 2004].

Związkiem o ciekawych właściwościach biologicznych jest **diploicyna**. Jej właściwości przeciwbakteryjne po raz pierwszy zostały ocenione w 1946 roku przez Barry'ego. Zauważono wówczas, że związek ten ma wpływ na rozwój *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis* oraz *Mycobacterium smegmatis*. Później wykazano, że diploicyna jest również aktywna wobec licznych bakterii Gram-dodatnich [Ahmadjian i Hale 1977].

**Kwas wulpinowy** i jego pochodne to związki o innej strukturze niż omawiane dotąd depsydy i depsydony. Prowadzone badania dowiodły aktywności kwasu wulpinowego wobec beztlenowych bakterii z rodziny laseczek (MIC > 16 µg/ml) oraz bakterii tlenowych z grupy ziarniaków. Ponadto kwas wulpinowy wykazywał aktywność wobec klinicznych szczepów bakterii *Enterococcus* sp. (MIC = 16-32 µg/ml) i *Staphylococcus aureus* (MIC od 4 do >16 µg/ml), wrażliwych bądź opornych na metycylinę lub mupirocynę [Lauterwein i wsp. 1995].

**Antrachinony** to związki barwne, które nadają plesze porostów żółte, pomarańczowe lub czerwone zabarwienie [Kohlmünzer 2007]. Związki te, wykazują różnokierunkową aktywność biologiczną, w tym również przeciwdrobnoustrojową

[Manojlović i wsp. 2002]. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe antrachinonów określono wobec otrzymanych z porostów należących do rodzaju *Xanthoria* sp.: **erytroglaucyny**, **emodyny**, **fallacynalu**, **fycionu** = **parietyny**, **ksantoryny** oraz **teloschistyny**. Związki te działały na grzyby: *Aspergillus niger*, *Doratomyces stemonidis*, *Penicillium verucosum*, *Trichoderma viride*. Słabsza była ich aktywność wobec wykorzystanych w eksperymencie szczepów bakterii (*Bacillus mycooides*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas glicinea*, *Pseudomonas phaseolicola*). **Fallacynal** nie posiadał działania przeciwbakteryjnego. Badane związki nie wpływały na komórki *Bacillus mycooides* [Manojlović i wsp. 2000]. **Emodyna**, **parietyna**, **fallacynol**, **fallacynal** i **kwasy parietynowy**, izolowane z *Caloplaca schaeereri*, były badane pod kątem ich aktywności na *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas fluorescens*. Antrachinony działały najsilniej na *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas fluorescens* (MIC = 20-80 µg/ml) natomiast wzrost *Staphylococcus aureus* hamowany był najsilniej przez fallacynol (MIC = 20 µg/ml). Wszystkie włączone do eksperymentu metabolity wtórne były aktywne wobec badanych grzybów (MIC = 20-80 µg/ml). Również sam wyciąg z *C. schaeereri* charakteryzowała wyższa aktywność przeciwgrzybicza od przeciwbakteryjnej. Ekstrakt, nawet w stężeniach wyższych niż 320 µg/ml, nie działał na *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, a także *Candida albicans*, natomiast okazał się skuteczny wobec *Pseudomonas fluorescens* i grzybów: *Aspergillus niger*, *Trichomonas harzianum* (MIC = 160 µg/ml, 160 µg/ml, 80 µg/ml; odpowiednio) [Manojlović i wsp. 2002].

Substancje o budowie alifatycznej stanowią kolejną, po cząsteczkach o aromatycznej strukturze, grupę metabolitów porostowych. Przykładem jest  $\alpha$ -metyleno- $\gamma$ -butyrolakton, czyli **kwasy protolichesterynowe**. Pierwsze prace dotyczące aktywności przeciwdrobnoustrojowej tego związku prowadzono w latach 50. XX wieku. Rezultaty przeprowadzonych wówczas eksperymentów wskazywały na aktywność przeciwprątkową (*Mycobacterium tuberculosis*) oraz hamujący wpływ na rozwój *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus*. W późniejszym czasie stwierdzono, że działanie kwasu protolichesterynowego na bakterie *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* należy określić jako bakteriobójcze, a na *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* jako bakteriostatyczne [Türk i wsp. 2003]. Ciekawa jest aktywność kwasu protolichesterynowego wobec wywołującej wrzody żołądka i dwunastnicy bakterii *Helicobacter pylori*. Badania, w których wykazano przeciwwrzodowe działanie tego

porostowego metabolitu, oceniały nie tylko właściwości wolnego kwasu, ale także jego soli sodowej. Zarówno pierwszy jak i drugi związek działały na *H. pylori* (MIC = 16-64 µg/ml). Określona w eksperymencie wartość MIC<sub>90</sub> (32 µg/ml) świadczyła o znacznie słabszym działaniu wyciągu w porównaniu z ampicyliną (0,125 µg/ml) i erytromycyną (0,25 µg/ml), jednak wskazywała na aktywność zbliżoną do metronidazolu (16 µg/ml) [Ingólfssdóttir i wsp. 1997]. Być może jest to wytłumaczenie dla tradycyjnego stosowania *Cetraria islandica*, zawierającej kwas protolichesterynowy, w schorzeniach żołądka i dwunastnicy [Studzińska-Sroka i Bylka 2010].

Z porostów wyodrębniono również związki o strukturze tetrahydroksantonów (diksantony), do których należą **kwasy sekalonowe** (odmiany izomeryczne A-G). Udowodniono, że **kwas sekalonowy A** jest aktywny wobec *Bacillus subtilis* [Harada i wsp. 1974], a także działa na oportunistyczne szczepy *Micrococcus luteus* (MIC 4-8 µg/ml) i *Enterococcus faecalis* (MIC = 32 µg/ml) [Pettit i wsp. 2003].

Badano również przeciwdrobnoustrojowe działanie **wyciągów** acetonowych z 3 gatunków porostów z rodziny *Umbilicariaceae*. Najwyższą aktywność wykazywał ekstrakt otrzymany z *Umbilicaria polyphylla* (MIC = 1,56 mg/ml wobec *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli*; MIC = 3,12 mg/ml wobec *Enterobacter cloacae* oraz MIC = 6,25 mg/ml dla *Staphylococcus aureus*). Właściwości przeciwgrzybicze gatunku charakteryzowała wartość MIC od 1,56 do 12,5 mg/ml. *Umbilicaria crustulosa* działał słabiej wobec wymienionych bakterii (MIC między 1,56 mg/ml i 12,5 mg/ml), za wyjątkiem *E. coli* wobec której okazał się nieaktywny. Działanie grzybobójcze występowało w stężeniach 12,5 - 25 mg/ml. Najniższą aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazywał wyciąg acetonowy pozyskany z *Umbilicaria cylindrica* [Kosanić i wsp. 2012a].

Dla wyciągów metanolowych otrzymanych z zastosowaniem aparatu Soxhleta z *Cetraria pinastri*, *Cladonia digitala*, *Cladonia fimbriata*, *Fulgensia fulgens*, *Ochrolechia parella* i *Parmelia crinite* oznaczono działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec 17 różnych szczepów drobnoustrojów. Aktywność zależała od wybranego gatunku porostu oraz typu badanych mikroorganizmów. Gatunkiem o największej aktywności był *C. pinastri*. Wyciąg metanolowy z *C. pinastri* działał wobec wszystkich testowanych typów bakterii i grzybów. Wartość MIC wynosiła od 0,23 mg/ml dla *Enterococcus faecalis* do 1,87 mg/ml dla *Escherichia coli* oraz w przypadku grzybów od 0,94 mg/ml wobec *Candida albicans* do 15 mg/ml dla *Penicillium verrucosum*. Metanolowy wyciąg

z *Parmalia crinite* również hamował wzrost wszystkich testowanych bakterii (MIC od 0,94-3,75 mg/ml), działał też na 9 z 11 szczepów testowanych grzybów (MIC = 3,75-30 mg/ml). Aktywność przeciwdrobnoustrojową *F. fulgens* określono jako umiarkowaną. Wyciąg metanolowy z porostu hamował rozwój wszystkich bakterii (MIC 3,75-15,0 mg/ml) i 6 z 11 gatunków grzybów (3,75-30 mg/ml). *C. fimbriata* działała na 5 z 6 szczepów bakterii (MIC 3,75-7,5 mg/ml) oraz na 5 z 11 badanych grzybów (MIC 3,75-15 mg/ml). Wyciągi z *C. digitata* oraz *O. parella* charakteryzowała niska aktywność [Rancovič i wsp. 2010].

Testowano także aktywność przeciwdrobnoustrojową różnych wyciągów (eteru naftowego, acetonowego, metanolowego) z wyhodowanej w warunkach *in vitro* plechy z *Usnea ghattensis*. Okazało się, że mogą one silnie hamować wzrost różnych bakterii Gram-dodatnich (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus* MIC = 5–10 µg/ml) a siła tego działania była porównywalna lub niewiele niższa od stosowanych jako wzorce antybiotyków: streptomycyny i ampicyliny [Behera i wsp. 2005].

Piśmiennictwo wskazuje też na przeciwbakteryjne działanie wyciągów z *Cetraria aculeata*. Ekstrakty eteru dietylowego, acetonowe i etanolowe były testowane na 12 szczepach bakteryjnych i 8 szczepach grzybów. Wyciągi wykazywały aktywność wobec: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* [Türk i wsp. 2003].

Wyciągi z *Hypogymnia tubulosa* (eteru dietylowego, acetonowy, chloroformowy, eteru naftowego, etanolowy), przebadano na 13 szczepach bakterii, dwóch grzybach drożdżoidalnych i 10 grzybach strzępkowych. Właściwości antybiotyczne zostały odnotowane pozostałych mikroorganizmów: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*. Analiza danych pozwoliła stwierdzić, że na największą liczę szczepów drobnoustrojów działał wyciąg eteru dietylowego (na 9 szczepów, MIC od 5,15 do 660 µg związku naniesionego na krążek). Wyciągi chloroformowy, acetonowy, eteru naftowego, etanolowy działały odpowiednio na 7, 6, 5, 4 różne szczepy drobnoustrojów. Wśród nich najniższe wartości MIC uzyskiwał wyciąg eteru naftowego (MIC 1,25 do 320 µg związku naniesionego na krążek). Otrzymane rezultaty wskazywały na brak działania wyciągów na grzyby strzępkowe. Ponadto, wyciągi nie działały na niektóre Gram-ujemne drobnoustroje:

*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, *Yersinia enterocolitica* i drożdżoidalny grzyb *Candida glabrata* [Yilmaz i wsp. 2005].

Wyniki badań metanolowego wyciągu z *Parmotrema pseudotinctorum*, zebranego w południowych Indiach, zawierającego atranorynę oraz kwas lekanorowy wskazywały, że był on aktywny wobec *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*. Wartości MIC, charakteryzujące aktywność przeciwdrobnoustrojową, były nieco niższe w przypadku bakterii Gram-ujemnych (*P. aeruginosa* 0,35 i *E. coli* 0,40 mg/ml) niż Gram-dodatnich (*S. aureus* 0,50 i *C. perfringens* 0,45 mg/ml). Stosowany jako substancja wzorcowa chloramfenikol działał nieznacznie silniej od badanych wyciągów [Kumar i wsp. 2010].

Okazało się, że wyciągi otrzymane z porostów, działają synergistycznie ze stosowanymi w leczeniu antybiotykami. Zjawisko synergizmu występujące pomiędzy wyciągami i antybiotykami jest korzystne, gdyż może zwiększyć spektrum działania leku, zmniejszyć dawkę antybiotyku oraz zminimalizować ryzyko wystąpienia tzw. lekooporności. Prezentowane w piśmiennictwie wyniki badań sugerują, że zależność taka zachodzi w przypadku stosowania ampicyliny i metanolowego wyciągu z *Ramalina farinacea*. W prowadzonym eksperymencie łączono metanolowy ekstrakt z porostu (800 µg/ml) i roztwór badanego antybiotyku (tetracyklina; 50 µg/ml) w stosunku od 10:0 do 0:10. Dla powstałych mieszanin wyznaczano tzw.  $FIC_{index}$  (ang. *Fractional Inhibitory Concentration Index*), którego wartość  $<1$  oznaczała synergizm w działaniu badanych substancji, wartość 1-2 wskazywała na brak wzajemnego oddziaływania, natomiast wartość  $FIC_{index} > 2$  sugerowała występowanie antagonizmu. Otrzymane w eksperymencie wartości FIC różniły się w zależności od rodzaju stosowanego w badaniu szczepu *Staphylococcus aureus*. W przypadku dwóch z trzech badanych szczepów *Staphylococcus aureus* zjawisko synergizmu występowało w 44% (szczep K) lub 66% (szczep J). Najniższa obliczona wartość FIC dla mieszaniny wyciągu i antybiotyku 5:5 wynosiła 0,56. Wobec jednego z badanych szczepów (szczep D), zjawisko synergizmu nie występowało w ogóle, natomiast w przypadku dwóch z badanych mieszanin wyciągu i antybiotyku wartość obliczanego współczynnika wskazywała na występowanie antagonizmu [Agboke i wsp. 2011].

### 1.4.2. Aktywność przeciwnowotworowa

Stosunkowo niewiele wiadomo o właściwościach przeciwnowotworowych porostów i ich metabolitów, jednak badania wskazują, że wyciągi z porostów są bardziej aktywne wobec komórek nowotworowych niż ekstrakty z grzybów czy roślin [Bezivin i wsp. 2004, Boustie i Lohézic-Le Dévéhat 2008]. Ponadto, na podstawie dostępnych w literaturze danych można wnioskować, że bardziej aktywne są wyciągi przygotowane z użyciem niepolarnych odczynników, w porównaniu z wyciągami wodnymi i alkoholowymi (zwłaszcza w badaniach *in vitro*). Ekstrakty o charakterze polarnym są jednak bardziej aktywne w badaniach *in vivo*. Rozbieżność ta wynika najprawdopodobniej z różnic w składzie chemicznym ekstraktów. Ponadto analiza wyników niektórych prac wskazuje, że depsydony to grupa związków o silniejszych od depsydów właściwościach cytotoksycznych [Correché i wsp. 2002]. Piśmiennictwo podaje, że dotychczas przeprowadzono badania właściwości przeciwnowotworowych wyciągów z około 150 gatunków porostów [Boustie i Lohézic-Le Dévéhat 2008].

Jednym z badanych depsydów był **kwasy gyroforowy**, który wykazywał zróżnicowaną aktywność wobec badanych linii komórek nowotworowych. Wpływ na proliferację komórek: międzybłoniaka (MM98), raka sromu (A431) i prawidłowych keratynocytów ludzkich (HaCaT) został określony z wykorzystaniem testów z fioletem krystalicznym (CV) i czerwienią fenolową (NRU). Okazało się, że kwas gyroforowy wykazywał umiarkowane działanie wobec komórek międzybłoniaka ( $IC_{50} = 264 \mu M$  i  $134 \mu M$ , CV i NRU), a słabe na linii komórek nowotworu sromu ( $IC_{50} = 544 \mu M$  i  $911 \mu M$ , CV i NRU). Wartość  $IC_{50}$  charakteryzująca aktywność kwasu gyroforowego wobec nienowotworowej linii keratynocytów ludzkich była wyższa od 2 mM ( $IC_{50} > 2mM$ ). [Burlando i wsp. 2009]. Właściwości kwasu gyroforowego wobec HaCaT oceniono również w innym badaniu. Autorzy wykazali jego antyproliferacyjną aktywność w stężeniu  $IC_{50} = 1,7 \mu M$  [Kumar i Müller 1999a]. Oceniono także wpływ kwasu gyroforowego na komórki raka jajnika (A2780), raka szyjki macicy (HeLa), raka piersi (MCF-7 i SK-BR-3), raka okrężnicy (HT-29), raka jelita grubego (HCT-116), białaczki promielocytowej (HL-60) i na ludzką linię nowotworową limfoblastoidalną T (Jurkat). Działanie toksyczne, powodujące śmierć 50% komórek ( $IC_{50}$ ) w badanej próbie było niższe niż  $200 \mu M$  w przypadku komórek raka jajnika i białaczki promielocytowej ( $IC_{50} = 198,3 \mu M$  i  $146,7 \mu M$  – odpowiednio). W pozostałych przypadkach związek miał jeszcze słabsze działanie [Bačkorova i wsp 2011].

Wyniki badań pokazują, że **kwas ewernowy** (depsyd), nie wykazywał znaczącego cytotoksycznego wpływu na komórki: międzybłoniaka (MM98), raka sromu (A431) i prawidłowych keratynocytów ludzkich (HaCaT). W przeprowadzonych z zastosowaniem fioletu krystalicznego i czerwieni fenolowej testach obliczona wartość parametru  $IC_{50}$  była najniższa dla komórek raka sromu ( $IC_{50} = 100 \mu M$ ; test CV). W pozostałych przypadkach wpływ na komórki był słabszy ( $IC_{50}$  od 406 do 680  $\mu M$ ) [Burlando i wsp. 2009].

**Kwas difraktowy** wykazywał toksyczność wobec komórek keratynocytów ludzkich (HaCaT) i w stężeniu  $IC_{50} = 2,6 \mu M$  powodował ich śmierć w 50% [Kumar i Müller 1999a]. Działanie tego depsydu było również badane na szczurzych limfocytach. Wyniki świadczyły o jego słabszej aktywności od testowanej równolegle kolchicyny (6,54 dpm i 3,50 dpm) [Correché i wsp. 2002]. Badania nad wpływem kwasu difraktowego na komórki raka okrężnicy (HCT-116) i raka szyjki macicy (HeLa) wykazały, że depsyd zmniejszał ich żywotność w sposób porównywalny z etopozydem – (lek cytostatyczny;  $IC_{50} = 42,2$  i  $64,6 \mu M$  oraz  $40,3$  i  $45,2 \mu M$ , odpowiednio). Związek działał w mniejszym stopniu na komórki MCF-7 (rak piersi)  $IC_{50} = 93,4 \mu M$  a wobec NIH-3T3 (mysie fibroblasty embrionalne) nie był toksyczny w stężeniach do 100  $\mu M$  [Brisdelli i wsp. 2012].

**Tenuioryna** jest tridepsydem występującym w porostach z rodzaju *Peltigera*. Jej antyproliferacyjne działanie badano testem ze znakowaną tymidyną, na komórkach raka piersi (T47D), trzustki (PANC-1) oraz okrężnicy (WiDr). Tenuioryna z *Peltigera leucophlebia* była w umiarkowanym stopniu aktywna wobec komórek nowotworów: trzustki i okrężnicy ( $IC_{50} = 87,9$  oraz  $95,9 \mu M$ ), natomiast na komórki raka piersi działała zdecydowanie słabiej ( $IC_{50} = 152,6 \mu M$ ) [Ingólfssdóttir i wsp. 2002].

**Ester metylowy kwasu orselinowego i orcynol** izolowane z *Parmelia subrudecta* wykazywały słabe antyproliferacyjne właściwości wobec mysich komórek fibroblastów (L-929) oraz komórek białaczkowych (K562) ( $IC_{50} > 40 \mu g/ml$ ). Związki te nie były również toksyczne wobec komórek raka macicy linii HeLa ( $IC_{50} > 50 \mu g/ml$ ) [Ivanova i wsp. 2010].

Badano również wpływ **kwasu lobarowego** na komórki nowotworowe. W prowadzonych eksperymentach określono aktywność: antyproliferacyjną (limfocyty krwi obwodowej), cytotoksyczną oraz hamującą syntezę DNA (w komórkach nowotworowych linii raka piersi: T47-D i ZR-75-1 i białaczki erytroblastycznej K-562). Wartość  $IC_{50}$ , przy której odnotowano działanie kwasu lobarowego wynosiła w zależności od typu działania,

odpowiednio: 24,5 µg/ml, > 30 µg/ml i 14,5-44,7 µg/ml [Ogmundsdottir 1998]. Kwas lobarowy działał także ze średnią siłą na komórki raka szyjki macicy (HeLa) i okrężnicy (HCT-116), natomiast nie był aktywny wobec komórek raka piersi (MCF-7) i mysich fibroblastów embrionalnych ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ) [Brisdelli i wsp. 2012]. W innych badaniach testowano kwas lobarowy na 12 liniach nowotworów ludzkich: rak jelita grubego (HL-60, WiDr), białaczka mieloblastyczna (K-562), rak żołądka (AGS), rak piersi (T47-D), rak jajnika (NIH:OVCAR-3), rak trzustki (Capan-1, Capan-2, PANC-1), rak prostaty (PC-3), drobnokomórkowy rak płuc (NCI-H1417), białaczka limfoblastyczna T-komórkowa (Jurkat). W eksperymencie badano zdolność hamowania proliferacji komórek nowotworowych (test ze znakowaną tymidyną) i wykazano, że kwas lobarowy wpływa na podziały w/w typów komórek w stężeniach  $IC_{50}$ : 15,2-63,9 µg/ml (33,2-143,6 µM). Związek wykazywał najsilniejsze działanie wobec komórek raka trzustki, białaczki erytroblastycznej oraz raka piersi. W tym samym eksperymencie badano też **kwasy beomycesowy** (depsyd), który działał słabiej od kwasu lobarowego, a wyznaczona wartość parametru  $IC_{50}$  wynosiła od 28,7 do 80,0 µg/ml (76,8-213,9 µM). Związek ten działał najsilniej na komórki PC-3 (porównywalnie z kwasem lobarowym) oraz na komórki białaczki erytroblastycznej [Haraldsdottir i wsp. 2004].

Aktywność **kwasy wariolowego**, otrzymanego z *Ochrolechia parella*, zbadano na komórkach raka skóry (B16). Depsydon był znacznie mniej aktywny ( $IC_{50} = 38,7 \mu M$ ) od doksorubicyny ( $IC_{50} = 0,1 \mu M$ ), działał jednak porównywalnie z testowaną równocześnie cisplatyną ( $IC_{50} = 30,3 \mu M$ ) [Millot i wsp. 2007]. Aktywność przeciwnowotworową kwasu wariolowego badano także na komórkach raka: piersi (MCF-7), szyjki macicy (HeLa), okrężnicy (HCT-116) i na mysich fibroblastach embrionalnych (NIH-3T3). Rezultaty eksperymentu wskazywały, że związek, w stosowanych stężeniach, nie był toksyczny wobec badanych linii komórkowych ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ) [Brisdelli i wsp. 2012].

Millot i wsp. badali aktywność depsydów i depsydonów wyizolowanych z *Diploicia canescens*. Eksperymenty prowadzono na linii czerniaka (B16) oraz na keratynocytach ludzkich (HaCaT). Najsilniej na komórki B16 działała **buellina** i **skensydyna** ( $IC_{50} = 0,25 \mu M$  i  $0,4 \mu M$  odpowiednio). Mniej aktywne były: **diploicyna** ( $IC_{50} = 4,0 \mu M$ ) i **dechlorodiploicyna** ( $IC_{50} = 1,7 \mu M$ ). Keratynocyty ludzkie były w różnym stopniu wrażliwe na działanie badanych związków. Wartość  $IC_{50}$  dla buelliny oraz diploicyny wynosiła  $IC_{50} > 10 \mu M$ . Skensydyna i dechlorodiploicyna były bardziej toksyczne ( $IC_{50} = 4,3$  i  $6,1 \mu M$ ). W badaniu jako wzorzec zastosowano etopozyd, którego



toksyczność wobec komórek czerniaka wynosiła 0,28  $\mu\text{M}$ , a wobec HaCaT 0,55  $\mu\text{M}$  [Millot i wsp. 2009].

**Kwas  $\alpha$ -alektoronowy** wykazywał właściwości cytotoksyczne na komórki czerniaka (B16), słabsze od doksorubicyny lecz 3-krotnie silniejsze od cisplatyny [Millot i wsp. 2007].

Correché i wsp. badał w testach *in vitro* cytotoksyczność pięciu depsydów i dziewięciu depsydonów. Testy przeprowadzono na limfocytach izolowanych ze śledziona szczurów, za pomocą metody ze znakowaną tymidyną i z zastosowaniem kolchicyny jako substancji wzorcowej. Uzyskane wyniki wskazywały na wyższą od kolchicyny aktywność **pannaryny**, **1-chloropannaryny**, a także depsydu **sferoforyny** (odpowiednio o 1,8-raza depsydony i 1,5-raza depsydy). Znacznie słabiej od kolchicyny działały: kwas lobarowy, kwas fumaroprotocetrarowy, kwas psormowy, kwas stiktowy kwas wariolowy i wikanicyna (odpowiednio: 1,7-, 1,8-, 2,0-, 3,3-, 6,5-, 10-razy słabiej) [Correché i wsp. 2002].

Aktywność antyneoplastyczną depsydonu **wikanicyny** badał również Brisdelli i wsp. Związek w teście MTT, działał silniej na komórki raka okrężnicy (HCT-116) niż na komórki raka szyjki macicy (HeLa) ( $\text{IC}_{50} = 40,5 \mu\text{M}$  i  $67,0 \mu\text{M}$ ). Działanie to było porównywalne z etopozydem - lekiem o działaniu cytostatycznym ( $\text{IC}_{50} = 40,3 \mu\text{M}$  i  $45,2 \mu\text{M}$ ). Związek w badanych stężeniach nie był toksyczny dla komórek nowotworu piersi (MCF-7) i mysich fibroblastów embrionalnych (NIH-3T3)  $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$  [Brisdelli i wsp. 2012].

Rezultaty eksperymentów wykazały, że **kwas wulpiowy** działał słabo cytotoksycznie na komórki raka mezotelium (MM98:  $\text{IC}_{50} = 654 \mu\text{M}$  i  $503 \mu\text{M}$ ; odpowiednio test CV i NRU) i nieco silniej na komórki nowotworu sromu (A431;  $\text{IC}_{50} 473 \mu\text{M}$  i  $76 \mu\text{M}$ ). Związek, zastosowany w wysokich stężeniach był toksyczny dla keratynocytów ludzkich (HaCaT;  $\text{IC}_{50} = 150 - 160 \mu\text{M}$ ), natomiast w niskich ( $10 \mu\text{M}$ ) stymulował proliferację tych komórek. Ponadto kwas wulpinowy był w wyższym stopniu cytotoksyczny dla komórek keratynocytów niż komórek nowotworowych [Burlando i wsp. 2009].

**Kwas protolichesterynowy** mający strukturę  $\alpha$ -metyleno- $\gamma$ -laktonu posiada działanie cytotoksyczne i antyproliferacyjne. Badania wykazały, że wyizolowany m.in. z *Cetraria islandica* związek, był toksyczny wobec komórek raka piersi (T-47D i ZR-75-1) oraz białaczki erytroblastycznej (K-562). Działanie kwasu protolichesterynowego testowano też na prawidłowych fibroblastach skóry oraz na

limfocytach we krwi obwodowej. Kwas protolichesterynowy, w przypadku wszystkich trzech linii nowotworowych, powodował znaczne zmniejszenie syntezy DNA (test ze znakowaną tymidyną). Stężenie przy którym tworzenie DNA w badanych liniach nowotworowych było hamowane w 50% ( $IC_{50}$ ) wynosiło 1,1 – 24,6  $\mu\text{g/ml}$  a największa wrażliwość cechowała komórki raka piersi. Kwas protolichesterynowy wykazywał aktywność antyproliferacyjną wobec stymulowanych mitogenem limfocytów przy  $IC_{50} = 8,4 \mu\text{g/ml}$ . Śmierć komórek nowotworowych następowała przy stężeniu 20  $\mu\text{g/ml}$  kwasu (+)-protolichesterynowego. Synteza DNA, proliferacja i przeżycie prawidłowych komórek fibroblastów nie ulegały zaburzeniu przy podaniu kwasu protolichesterynowego w stężeniach do 20  $\mu\text{g/ml}$  [Ogmundsdóttir 1998]. W innym badaniu, właściwości antyproliferacyjne kwasu protolichesterynowego badano na 12 różnych typach komórek (HL-60, WiDr, K-562, AGS, T47-D, NIH:OVCA-3, Capan-1, Capan-2, PANC-1, PC-3, NCI-H1417, Jurkat). Wyniki eksperymentu wskazywały na silne działanie związku. Wartość  $IC_{50}$ , przy którym występował efekt hamowania proliferacji, wynosiła od 2,4 do 18,1  $\mu\text{g/ml}$  (7,4 - 55,8  $\mu\text{M}$ ) [Haraldsdóttir 2004]. Kwas protolichesterynowy badany na komórkach raka: okrężnicy (HCT-116), szyjki macicy (HeLa), piersi (MCF-7) i mysich fibroblastach embrionalnych (NIH-3T3) działał najsilniej na komórki raka okrężnicy ( $IC_{50}$  około 34  $\mu\text{M}$ ) oraz raka szyjki macicy ( $IC_{50}$  około 46,7  $\mu\text{M}$ ) i słabiej na komórki mysich fibroblastów. Związek nie działał toksycznie na komórki raka piersi. Wyniki testów pokazały również, że kwas protolichesterynowy posiada działanie apoptotyczne, a programowana śmierć komórki następowała w wyniku aktywacji enzymów z grupy kaspaz (kaspazy-3, -8 i -9) [Brisdelli i wsp. 2012].

**Kwasy sekalonowe** to związki o budowie biksantonów są wytwarzane przez porosty i grzyby, występujące w przyrodzie w postaci kilku izomerów optycznych (A-G). W zależności od odmiany izomerycznej substancję cechowała zróżnicowana aktywność biologiczna. Zbadano, że kwas sekalonowy A, posiadał działanie cytostatyczne na zwierzęce linie komórek białaczki L1210 ( $IC_{50} = 0,5\mu\text{g/ml}$ ) [Kurobane i wsp. 1987] i P388 ( $ED_{50} = 3,5\mu\text{g/ml}$ ) [Pettit i wsp. 2003]. Millot i wsp. prowadziła badania nad cytotoksycznością kwasów sekalonowych B i D wobec linii komórek czerniaka (B16) oraz keratynocytów ludzkich (HaCaT). Eksperyment przeprowadzono za pomocą testu MTT po 48 (B16) lub 72-godzinnej (HaCaT) inkubacji. Otrzymane wyniki wskazywały na wysoką toksyczność obu testowanych związków wobec komórek czerniaka, porównywalną nawet z badanym jako wzorzec etopozydem (2,8  $\mu\text{M}$ ; 0,28 i 0,28  $\mu\text{M}$  -

odpowiednio kwas sekalnowy B, D i etopozyd). Równocześnie kwasy sekalonowe działały słabiej od etopozydu na komórki nienowotworowe (HaCaT) [Millot i wsp. 2009].

Działanie cytotoksyczne posiadały również występujące w porostach **naftochinony**. Przeprowadzono badania, które dowiodły, że naftochinon **naftazaryna**, z *Cetraria islandica* był toksyczny dla komórek ludzkiego nowotworu naskórkowego. Otrzymane rezultaty wykazały, że związek ten hamował również rozwój keratynocytów ludzkich [Müller 2001].

**Parietyna** należy do grupy antrachinonów. Rezultaty badań cytotoksycznych właściwości związku pokazały, że parietyna działała na komórki raka jajnika (A2780) oraz na komórki linii nowotworowej białaczki limfoblastoidalnej T (Jurkat) ( $IC_{50} = 139,7 \mu M$  i  $129,5 \mu M$ , odpowiednio). W stosunku do pozostałych testowanych linii komórek nowotworowych (HeLa, MCF-7, SK-BR-3, HT-29, HCT-116 P53+/+ i HCT-116 P53-/-, HL-60) związek był mniej aktywny ( $IC_{50} > 200 \mu M$ ) [Bačkorova i wsp. 2011].

**Skabrozyna**, wyizolowany z *Xanthoparmelia scabrosa* związek o strukturze epiditiopiperazynodionu wykazywał silne właściwości cytotoksyczne wobec komórek mysiego nowotworu guza z komórek tucznych (P815,  $IC_{50} = 0,5 \mu M$ ) oraz ludzkich komórek raka piersi (MCF7;  $IC_{50} = 1,0 \mu M$ ) [Ernst-Russell i wsp. 1999].

Badano również aktywność przeciwnowotworową **wyciągów** z różnych gatunków porostów. W eksperymencie prowadzonym przez Bezivin i wsp., oznaczono działanie różnych ekstraktów z 8 gatunków porostów (ekstrakty otrzymano przez ekstrakcję w aparacie Soxhleta kolejno: heksanem, eterem dietylowym, metanolem). Eksperyment prowadzono na 6 liniach komórek nowotworowych, dwóch mysich (L1210 - białaczka; 3LL – rak płuca Lewis'a) i czterech ludzkich (K-562 – białaczka; DU145 – rak prostaty; MCF7 – rak piersi; U251 – glejak), a także jednej linii nienowotworowej (Vero – komórki z tkanki nabłonkowej nerki afrykańskiego koczodana zielonego). W badaniu przyjęto za aktywny taki wyciąg, dla którego wartość  $IC_{50} \leq 20 \mu g/ml$ . Spośród 24 włączonych do badania ekstraktów tylko 3 z nich okazały się nieaktywne wobec przebadanych komórek. Były to: wyciąg eterowy z *Evernia prunastrii* i *Platismatia glauca* oraz metanolowy z *Usnea rubicunda*. Najwięcej silnie działających wyciągów było wśród ekstraktów heksanowych. Wyniki badań wykazały, że najwyższą aktywność posiadały: *Cladonia convoluta* (wyciąg eteru dietylowego  $IC_{50}$  3LL  $< 1 \mu g/ml$ ), *Cladonia rangiformis* (wyciąg eteru dietylowego  $IC_{50}$  3LL  $< 1,2 \mu g/ml$ ), *Parmelia caperata* (wyciąg heksanowy  $IC_{50}$  DU145  $< 7,9 \mu g/ml$ ). Istotną toksyczność wobec komórek białaczki (K-562) wykazywał wyciąg heksanowy z *Cladonia convoluta*, natomiast wobec komórek raka

piersi (MCF-7) wyciąg eteru dietylowego z *Cladonia convoluta* ( $IC_{50} = 8,8 \mu\text{g/ml}$ ) oraz heksanowy z *Parmelia caperata* ( $IC_{50} = 13,4 \mu\text{g/ml}$ ) [Bezivin i wsp. 2003].

W badaniu właściwości cytotoksycznych *Cetraria aculeata* testowano przygotowany z surowca wyciąg acetonowy. Ekstrakt badano metodą MTT w zakresie stężeń 20 - 640  $\mu\text{g/ml}$ , w ludzkich liniach komórkowych: raka szyjki macicy (HeLa), drobnokomórkowego raka płuc (A549), oraz fibroblastach szczura (5RP7). Najsilniejsze działanie obserwowano w komórkach F2408 oraz 5RP7 ( $IC_{50} = 80$  i  $280 \mu\text{g/ml}$ , odpowiednio). Równocześnie badano właściwości mutagenne i genotoksyczne wyciągu z *C. aculeata*. Aktywność antymutagenną potwierdzono w modelach komórek bakteryjnych (*S. typhimurium* TA98 i TA100) i komórek ssaków z wykorzystaniem mutagenów 4-NDP (4-nitro-o-fenylendiamina) oraz 2-AF (2-aminofluoren), ulegających aktywacji metabolicznej. Wykazano, że wyciąg mocniej hamował mutację typu zmiany ramki odczytu niż substytucji pary zasad (zwłaszcza w TA98). Nie zaobserwowano mutagennego działania badanego wyciągu. Ekstrakt acetonowy działał również antygenotoksycznie [Zeytinoglu 2008].

Oświecimska i wsp. stwierdziła, że wyciąg etanolowy z *Cladonia sylvatica*, badany jako 8% rozcieńczenie, wykazywał cytotoksyczne działanie na komórki raka szyjki macicy (HeLa;  $IC_{50} = 138 \mu\text{g/ml}$ , co w przeliczeniu na wyciąg wynosiło  $11,04 \mu\text{g}$ ) [Oświecimska i wsp. 1983].

Aktywność acetonowego i metanolowego wyciągu z *Lethariella zahlbruckneri* badano na komórkach raka jelita grubego (HT-29). Rezultaty wykonanych eksperymentów dowiodły wpływu wyciągów na przeżywalność komórek nowotworowych. Okazało się, że siła działania wyciągów wzrastała wraz ze stosowaną dawką i czasem inkubacji. Wyciągiem o wyższej aktywności okazał się ekstrakt acetonowy (po 72-godzinnej inkubacji odpowiednio  $IC_{50} = 86,60$  i  $23,95 \mu\text{g/ml}$ ). W badaniach tych stwierdzono również apoptotyczny wpływ wyciągu acetonowego, lecz nie metanolowego, na komórki HT-29 (test Hoechst) i znaczące zwiększenie aktywności kaspazy-8 i -9 [Ren i wsp. 2009].

Badano cytotoksyczny wpływ wyciągów: chloroformowego, octanu etylu i metanolowego z porostu *Thamnia vermicularis* var. *subuliformis*, na komórki raka szyjki macicy (HeLa). Rezultaty eksperymentu wykazały, że żywotność komórek spadała wraz ze wzrostem stężenia i czasem inkubacji z badanym wyciągiem. Wartość  $IC_{50}$ , po inkubacji trwającej 24 h wynosiła odpowiednio dla wyciągu chloroformowego, octanu etylu i metanolowego:  $159,32 \mu\text{g/ml}$  i  $162,50 \mu\text{g/ml}$  oraz  $> 200 \mu\text{g/ml}$ . Aktywność

badanych wyciągów była zdecydowanie wyższa po inkubacji trwającej 72-godziny ( $IC_{50}$  od 30 do 60  $\mu\text{g/ml}$ ). Metodą z użyciem HPLC określono skład wyciągów stwierdzając, że zawierają one, w różnych ilościach, związki o charakterze depsydów: kwas beomycesowy, kwas lekanorowy, kwas barbatowy oraz kwas skwamatowy [Manojłović i wsp. 2010].

Wyciągi acetonowe z *Umbilicaria crustulosa*, *Umbilicaria cylindrica* i *Umbilicaria polyphylla* testowano na komórkach czerniaka (FemX) i raka okrężnicy (LS174). Uzyskane wartości  $IC_{50}$  potwierdziły, że testowane ekstrakty są toksyczne dla badanych komórek ( $IC_{50}$  od 28,45  $\mu\text{g/ml}$  do 97,82  $\mu\text{g/ml}$ ). Gatunkiem, działającym najsilniej na oba typy nowotworów był *U. cylindrica* ( $IC_{50}$  dla FemX oraz LS174 wyniosły odpowiednio: 28,45  $\mu\text{g/ml}$  - 40,55  $\mu\text{g/ml}$ ) [Kosanić i wsp. 2012a].

Te same typy komórek (FemX i LS174) posłużyły do oznaczenia właściwości cytotoxycznych dla wyciągów z *Parmelia saxatilis* i *Parmelia caperata*. Otrzymane rezultaty pokazały, że testowane wyciągi były aktywne wobec badanych linii komórek nowotworowych. Silniej na linii FemX działał wyciąg z *P. saxatilis* ( $IC_{50} = 11,01 \mu\text{g/ml}$ ), natomiast wyciąg z *P. caperata* wykazywał większą aktywność wobec LS174 ( $IC_{50} = 9,55 \mu\text{g/ml}$ ) [Kosanić i wsp. 2012].

Aktywność antyproliferacyjna wyciągów metanolowych z *Flavoparmelia caperata*, *Evernia prunastri*, *Cladonia foliacea* była badana wobec komórek raka okrężnicy (HCT-116). Wyciągi znacznie różniły się poziomem wykazywanej cytotoxyczności. Najsilniej po 72-godzinnej inkubacji działał wyciąg z *C. foliacea* ( $IC_{50} = 122,47 \mu\text{g/ml}$ ) [Mitrović i wsp. 2011].

#### 1.4.3. Aktywność antyoksydacyjna

Właściwości antyoksydacyjne depsydów: kwasu **diwarikatowego**, **pannaryny** i **1-chloropannaryny** badał Hidalgo i wsp. Wyniki prowadzonego eksperymentu wykazały, że testowane związki hamują oksydację  $\beta$ -karotenu oraz autooksydację w homogenatach mózgowych szczurów [Hidalgo i wsp. 1994]. W innym eksperymencie stwierdzono, że wyizolowane z porostów **sfeoforyna** (depsyd) i **pannaryna**, hamują w warunkach *in vitro* tworzenie anionu ponadtlenkowego [Russo i wsp. 2008].

**Kwas norstiktowy** i **fumaroprocetrarowy**, związki o strukturze depsydonów, w badaniach testem z użyciem odczynnika DPPH, charakteryzowały się większą zdolnością zmiatania anionu ponadtlenkowego *in vitro* niż kwercetyna ( $IC_{50} = 566$  i  $580 \mu\text{M}$  wobec  $IC_{50} = 754 \mu\text{M}$ ) [Lohézic-Le Dévéhat i wsp. 2007].

W innym eksperymencie (metoda z wolnym rodnikiem DPPH<sup>•</sup>) wykazano, że depsydony: **kwask lobarowy**, **kwask wariolowy**, **wikanicyna** oraz depsyd: **kwask difraktowy**, a także kwas **protolichesterynowy** nie posiadają działania antyoksydacyjnego w stężeniach do 0,8 mM. Stosowany jako substancja wzorcowa kwas askorbowy zmiatał 50% rodników w stężeniu  $IC_{50} = 30 \mu\text{M}$ . W tym samym eksperymencie określono wpływ testowanych związków na indukowanie reaktywnych form tlenu w komórkach raka szyjki macicy (HeLa). Komórki eksponowano na substancje w stężeniu  $50 \mu\text{M}$  przez 3 lub 24 godziny. Otrzymane rezultaty dowiodły, że substancje te nie zwiększają wewnątrzkomórkowego poziomu RFT. Kolejna część eksperymentu dowiodła braku ochronnego wpływu badanych substancji w w/w stężeniu, na wywołany podaniem  $500 \mu\text{M}$  t-BHP (wodorotlenek tert-butylu) wzrost poziomu RFT, w badanych komórkach nowotworowych (HeLa) [Brisdelli i wsp. 2012].

Badano również wyciąg metanolowy z *Lobaria pulmonaria*, który zmniejszał stres oksydacyjny wywołany podaniem indometacyny i zwiększał poziom dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy glutationu [Karakus i wsp. 2009].

Wykazano również, że ekstrakty otrzymane z *Parmotrema stuppeum* (benzenowe i acetonowe) działały antyoksydacyjnie i wraz z badanym stężeniem siła ich działania wynosiła: 30 i 35% przy  $200 \mu\text{g/ml}$  oraz 65 i 68% przy  $500 \mu\text{g/ml}$  (wzorzec: BHA 93% i 96%) [Jayaprakasha i Rao 2000].

Oceniono także właściwości antyoksydacyjne wodnego wyciągu przygotowanego ze stosowanej w lecznictwie *Cetraria islandica*. Badane próbki zawierały różne ilości ekstraktu ( $50, 100, 250, 500 \mu\text{g}$ ) i wszystkie charakteryzowały się działaniem antyoksydacyjnym wyższym od  $500 \mu\text{g}$   $\alpha$ - tokoferolu. Ponadto próbę zawierająca  $100 \mu\text{g}$  wyciągu, cechowała wyższa zdolność zmiatania anionu ponadtlenkowego niż zastosowanych jako wzorce antyoksydantów (BHT, BHA, kwercetyna) oraz silniejsze od BHA właściwości zmiatania rodnika DPPH<sup>•</sup>, a także wyższa od BHT siła redukująca mierzona testem z zastosowaniem heksacyjanożelazianu(III) potasu [Gulçin i wsp. 2002].

Działanie przeciwutleniające porostów z rodziny *Umbilicariaceae* było przedmiotem badań grupy serbskich naukowców. W eksperymencie, dla wyciągów acetonowych ( $1 \text{ mg/ml}$ ) przygotowanych z gatunków: *Umbilicaria crustulosa*, *Umbilicaria cylindrica* i *Umbilicaria polyphylla*, oszacowano: zdolność zmiatania wolnego rodnika DPPH<sup>•</sup>, tzw. siłę redukującą i zmiatanie anionu ponadtlenkowego. Okazało się, że zdolność zmiatania wolnych rodników była różna w zależności od testowanego gatunku i wahała się od 39,41% do 72,79%. Porównanie siły zmiatania

rodnika DPPH<sup>•</sup> przez wyciągi z porostów z substancjami o uznanych właściwościach antyoksydacyjnych pokazało, że ekstrakty działają przeciwutleniająco. Najbardziej aktywny wyciąg działał porównywalnie z BHA (79,78%); (Witamina C > BHA > *U. polyphylla* >  $\alpha$ -tokoferol > *U. crustulosa* > *U. cylindrica*). Zdolność redukcji jonów żelaza Fe<sup>3+</sup>, była niewielka i znacznie (nawet 10-krotnie) odbiegała od aktywności badanych równocześnie substancji wzorcowych. Wyciąg charakteryzowała średnia siła zmiatania anionu nadadtlenkowego (*U. polyphylla* > *U. crustulosa* > *U. cylindrica*: 22,92% - 55,43%). Poziom siły antyoksydacyjnej korelował z zawartością związków polifenolowych w surowcach [Kosanić i wsp. 2012a].

Badano także wyciągi: chloroformowy i metanolowy z *U. cylindrica*. Określony metodą HPLC skład ekstraktów wskazywał na obecność w nich depsydów (atranoryna), depsydonów (kwas salazynowy, kwas norstiktowy) oraz jednopierścieniowych związków aromatycznych (pochodnych metylo- $\beta$ -orcinolu). Wyniki tego eksperymentu wskazywały, że oba wyciągi posiadały porównywalną zdolność zmiatania rodnika DPPH<sup>•</sup> (IC<sub>50</sub> od 31 do 34  $\mu$ g/ml), która była jednak 2-10 razy słabsza od zastosowanych substancji odniesienia (BHA, witamina C, kwas galusowy). Rezultaty ukazały również: zbliżoną zdolność chelatowania metali przez wyciąg chloroformowy i metanolowy (IC<sub>50</sub> = 39,46 i 45,91  $\mu$ g/ml), dużą zdolność wyciągów do hamowania utleniania lipidów (IC<sub>50</sub> = 35,36  $\mu$ g/ml i 29,31  $\mu$ g/ml; lecz słabszą od BHA i  $\alpha$ -tokoferolu, natomiast silniejszą od witaminy C i kwasu galusowego), a także 2-krotnie silniejsze od witaminy C, lecz słabsze od kwasu galusowego i BHA, właściwości zmiatania rodnika hydroksylogowego (IC<sub>50</sub> = 89,11  $\mu$ g/ml i 83,34  $\mu$ g/ml) [Manojlović i wsp. 2012].

W innym badaniu testowano działanie antyoksydacyjne wyciągów acetonowych, metanolowych i wodnych z *Cetraria islandica*, *Parmelia petrusa*, *Pseudevernia furfuracea*, *Lecanora altra*. Ekstrakty przygotowane w stężeniu 1 mg/ml oraz substancje wzorcowe (witamina C, BHA,  $\alpha$ -tokoferol) badano różnymi metodami. Rezultaty wykazały, że uzyskane wyciągi posiadały właściwości antyoksydacyjne. Zdolność zmiatania rodnika DPPH<sup>•</sup> przez wyciągi wynosiła od 33 do 95%. Najsilniejsze działanie charakteryzowało wyciągi z *L. altra*. Średni stopień aktywności wykazywały wyciągi z *C. islandica*, *P. petrusa*, *U. cylindrica* oraz wodny wyciąg z *P. furfuracea*. Wyciągi acetonowy i metanolowy z *P. furfuracea* działał słabiej od *L. altra* lecz silniej od pozostałych ekstraktów. Zdolność redukcji jonów Fe<sup>3+</sup> była najwyższa dla *L. altra*, natomiast właściwości zmiatania anionu nadadtlenkowego były zdecydowanie najlepsze

w przypadku metanolowego wyciągu z *L. altra*. Najslabiej działały wyciągi wodne, zwłaszcza z *C. islandica* i *P. petrusa*. Rezultaty badań zawartości polifenoli i flawonoidów wykazały, że istnieje korelacja pomiędzy zawartością tych związków a siłą działania antyoksydacyjnego [Kosanić i Ranković 2011].

Badano również wyciągi otrzymane z wyhodowanych w warunkach *in vitro* plech porostu *Usnaea ghattensis*. Najbardziej aktywnym z przygotowanych ekstraktów (eteru naftowego, acetonowy, metanolowy) był wyciąg metanolowy, którego zdolność hamowania peroksydacji lipidów wynosiła 87%. Jest to wartość wyższa, niż osiągnięta dla roztworu Troloxu w stężeniu 20 µg/ml (65%). Duża była też zdolność badanego wyciągu do zmiatania anionu ponadtlenkowego oraz do zmiatania wolnych rodników i wynosiła odpowiednio: 56% oraz 73%. Badane równocześnie związki o znanej aktywności antyoksydacyjnej (BHT, BHA, kwercetyna) działały porównywalnie i procentowa zdolność do zmiatania anionorodnika ponadtlenkowego oraz do zmiatania wolnych rodników wynosiła odpowiednio: 68%, 59%, 47% oraz 83%, 77%, 69%. Pozostałe wyciągi działały znacznie słabiej [Behera i wsp. 2005].

Aktywność antyoksydacyjną wyciągów metanolowo-wodnych (90:10 v/v) otrzymanych z pięciu różnych gatunków porostów: *Stereocaulon alpinum*, *Ramalina terebrata*, *Caloplaca sp.*, *Lecanora sp.*, *Caloplaca regalis* zebranych z obszarów Antarktydy, sprawdzano testem z użyciem wolnego rodnika DPPH• i ABTS<sup>+</sup>. Najwyższą aktywność spośród wyciągów porostowych, która była jednak słabsza od powszechnie znanych antyoksydantów, wykazywały ekstrakty z *Lecanora sp.* Rezultaty badań umożliwiły porównanie właściwości antyoksydacyjnych porostów stref arktycznych z rosnącymi w strefie klimatów tropikalnych. Uzyskane wyniki pozwoliły wnioskować o silniejszych właściwościach przeciwutleniających porostów strefy klimatów chłodniejszych [Paudel i wsp. 2008].

Badaniom aktywności antyoksydacyjnej w warunkach *in vitro* poddano wyciągi metanolowe i acetonowe sporządzone z 8 gatunków porostów rosnących na obszarze Antarktydy (*Cetraria aculeata*, *Cladonia furcata*, *Pseudephebe pubescens*, *Sphaerophorus globosus*, *Stereocaulon alpinum*, *Umbilicaria antarctica*, *Usnea antarctica* i *Usnea aurantiacoatra*). Wyniki badań wskazywały, że wyciągi acetonowe były znacznie bardziej aktywne od ekstraktów metanolowych. Najsilniejsze właściwości zmiatające wolne rodniki DPPH• posiadał wyciąg acetonowy z *U. antarctica* (IC<sub>50</sub> = 121,3 µg/ml). Ekstrakt ten wykazywał również wysoką zdolność redukcji jonów Fe<sup>3+</sup> do Fe<sup>2+</sup>, której wartość była jednak niewiele niższa od analogicznie przygotowanych



wyciągów z *S. alpinum*, *U. aurantiacoatra*. Wyciąg acetonowy z *Umbilicaria antarctica* silnie, gdyż porównywalnie z witaminą C, zmiatał anionorodnik ponadtlenkowy. Analiza HPLC składu wyciągu acetonowego *U. antarctica* wykazała, że głównym jego składnikiem jest **kwask lekanorowy**, a wysoka aktywność przeciwutleniająca wyciągu może być związana z oddziaływaniem synergistycznym pomiędzy głównym i pozostałymi składnikami badanego wyciągu [Luo i wsp. 2009].

Badano również aktywność antyoksydacyjną wyciągów metanolowych, chloroformowych i eteru naftowego z *Toninia candida*. W ekstraktach oceniono zawartość poszczególnych metabolitów wtórnych metodą z użyciem HPLC-UV. Wyniki świadczyły o wysokiej zawartości w wyciągach związków o strukturze depsydonów (kwask norstiktowy >> kwask stiktowy > kwask protocetrarowy), natomiast znacznie niższej depsydonów (atranoryna) i dibenzofuranów (kwask usninowy). Otrzymane rezultaty ukazały, że porost *T. candida* posiada właściwości antyoksydacyjne, które potwierdzono w testach badających: całkowitą aktywność antyoksydacyjną (wyciąg metanolowy > chloroformowy > eteru naftowego: 51,45-78,45 µg witaminy C/g), zdolność peroksydacji lipidów (wyciąg metanolowy > chloroformowy >> eteru naftowego; IC<sub>50</sub>: 46,46-21,45 µg/ml; tokferol: 0,48 µg/ml), zdolność zmiatania rodnika hydroksylogowego (wyciąg metanolowy > chloroformowy > eteru naftowego: 67,11–50,57 µg/ml; BHT 33,92 µg/ml) oraz z zastosowaniem wolnego rodnika DPPH\* (wyciągi metanolowy > eteru naftowego >> chloroformowy; IC<sub>50</sub> = od 51,45 do 48,98 µg/ml; witamina C: 6,05 µg/ml) [Manojlović i wsp. 2012].

Wyciągi metanolowe przygotowane z *Cetraria pinastri*, *Cladonia digitata*, *Cladonia fimbriata*, *Fulgensia fulgens*, *Ochrolechia parella* i *Parmelia crinita* posiadały zróżnicowane właściwości antyoksydacyjne, wykazane w testach hamowania peroksydacji kwasu linolowego oraz zdolność do redukcji jonów z Fe<sup>+3</sup> do Fe<sup>+2</sup> (metoda z heksacyjanożelazian(III)-em potasu). Otrzymane rezultaty ukazały, że największą zdolność hamowania utleniania kwasu linolowego posiadał wyciąg z *C. pinastri* (48,8%). Była to wartość wyższa niż dla witaminy C (35,0%), lecz o połowę niższa w porównaniu z Troloxem (99%). *P. crinita*, *C. fimbriata* i *F. fulgens* działały porównywalnie i hamowały proces utleniania kwasu linolowego o 16 - 20%. Pozostałe z badanych wyciągów wykazywały aktywność poniżej 10%. Wyciąg z *C. pinastri* posiadał również największą zdolność redukcji jonów Fe<sup>+3</sup>, która była kolejno niższa dla: *P. crinita* > *F. fulgens* > *C. fimbriata* > *C. digitata* > *O. parella*. Najwyższej aktywności antyoksydacyjnej towarzyszyła największa, wśród badanych ekstraktów, zawartość

związków o charakterze polifenoli. Wyciągi o niskiej zawartości polifenoli działały najslabiej (*C. digitata* i *O. parella*) [Rankovič i wsp. 2010].

Antyoksydacyjne właściwości 4 gatunków porostów zebranych w Malezji testował Stanly i wsp. Badania prowadzono na wyciągach metanолоwych i acetonowych z *Ramalina peruviana*, *Bulbothrix isidiza*, *Parmotrema tinctorum*, *Cladia agregata*. W prowadzonych eksperymentach oceniono zdolność zmiatania wolnego rodnika DPPH• oraz stopień hamowania utleniania  $\beta$ -karotenu. Oceniono także zawartość polifenoli w otrzymanych z surowca wyciągach. Badane gatunki lichenizowanych grzybów działały antyoksydacyjnie, a stopień aktywności różnił się w zależności od: gatunku, typu wyciągu i zastosowanego stężenia (zakres badanych stężeń: 15,6-750  $\mu\text{g/ml}$ ). W teście z odczynnikiem DPPH najsilniej działał ekstrakt acetonowy z *R. peruviana* ( $\text{IC}_{50}$ = 60,66  $\mu\text{g/ml}$ ), najslabiej z *C. agregata*. Badane w stężeniu 250  $\mu\text{g/ml}$  wyciągi, zapobiegały utlenianiu  $\beta$ -karotenu porównywalnie z  $\alpha$ -tokoferolem, natomiast najsilniejsze działanie odnotowano dla wyciągów acetonowych z: *B. isidiza* i *R. peruviana*. Zawartość polifenoli w badanych wyciągach była wyższa dla prób acetonowych i zawierała się między 27,1–111,8 mg GAE/g wyciągu (*R. peruviana* wyciąg metanолоwy oraz *P. tinctorum* wyciąg acetonowy) [Stanly i wsp. 2011].

W innym badaniu testowano **aktywność antyoksydacyjną 85 gatunków**, reprezentujących 41 rodzajów porostów. Z plech przygotowano 99 ekstraktów etanолоwych (maceracja w temp. pokojowej). Rezultaty badań przeprowadzone z użyciem wolnego rodnika DPPH• wykazały, że 17 badanych wyciągów etanолоwych miało wysoką aktywność antyoksydacyjną (11 powyżej 150  $\mu\text{mol/l}$  Troloxu; 6 powyżej 200  $\mu\text{mol/l}$  Troloxu). Najsilniej działały: *Hypogymnia vittata*, *Peltigera aphtosa*, *Nephromopsis ornata*, *Pseudevernia furfuracea*, *Cladonia vulcani* i *Peltigera elizabethae* [Hara i wsp. 2011].

W kolejnym eksperymencie testowano aktywność antyoksydacyjną wyciągów metanолоwych z **46 gatunków porostów** zebranych z górskich terenów Chin. Dla określenia aktywności antyoksydacyjnej przeprowadzono testy z użyciem roztworu wolnego rodnika DPPH•, zbadano zdolność hamowania peroksydacji kwasu linolowego oraz redukcji jonów  $\text{Fe}^{3+}$  do  $\text{Fe}^{2+}$  (badane stężenie 330  $\mu\text{g/ml}$ ). Spośród wszystkich testowanych próbek najwyższą aktywność antyoksydacyjną wykazywały wyciągi z *Peltigera praetextata* i *Sticta nylanderiana*. Oba z badanych gatunków wykazywały wysokie (wyższe 1,37-rza od kwasu askorbowego) działanie hamujące peroksydację kwasu linolowego, wysoką siłą redukującą (lecz 1-1,5 raza niższą od BHA) oraz zdolność

zmiatania 88 i 90% wolnych rodników. Wysoka aktywność antyoksydacyjna korelowała także z wysoką zawartością polifenoli w obu surowcach. W wyniku przeprowadzonej analizy zawartości metabolitów w najsilniej działającym wyciągu (*S. nylanderiana*) okazało się, że związkiem dominującym jest kwas lekanorowy. Autorzy sugerują, że wskazuje to na związek między obecnością w surowcu kwasu lekanorowego i siłą działania antyoksydacyjnego [Luo i wsp. 2010].

Została też określona aktywność antyoksydacyjna wyciągu etanolowego (80% etanol, 3-godzinna ekstrakcja w 80°C) z zebranego w Chinach *Lethariella cladonioides*. Oceniony metodą HPLC skład wskazywał na obecność w badanym ekstrakcie: kwasu tamnolowego, kwasu skwamatowego, kwasu lekanorowego, kwasu norstiktowego, kwasu beomycesowego, kwasu barbatowego, kwasu usninowego, kanarionu, wermikularyny i in. niezidentyfikowanych substancji. Silne działanie przeciwutleniające było widoczne jako rezultaty przeprowadzonych *in vitro* eksperymentów (metoda z odczynnikiem ABTS, zdolność zmiatania: O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH<sup>•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). W teście z odczynnikiem ABTS, wyciąg etanolowy działał silniej niż użyty jako wzorzec roztwór Troloxu, czyli rozpuszczalnego w wodzie analogu witaminy E (IC<sub>50</sub> 0,14 mg/ml i 0,21 mg/ml, odpowiednio). W pozostałych eksperymentach zdolność zmiatania reaktywnych form tlenu przez wyciąg z *L. cladonioides* była porównywalna z substancją referencyjną (IC<sub>50</sub> 0,63 mg/ml i 0,50 mg/ml; 0,32 mg/ml i 0,18 mg/ml; 0,25 mg/ml i 0,27 mg/ml, odpowiednio dla wymienionych wyżej testów w przypadku ekstraktu i Troloxu) [Wei i wsp. 2012].

W badaniach prowadzonych na wyciągu metanolowym z *Pseudevernia furfuracea* i frakcjach otrzymanych przez ekstrakcję tego wyciągu odczynnikami o różnej polarności wykazano, że wyższą aktywnością antyoksydacyjną, charakteryzowały się frakcje o mniejszej polarności (dichlorometanowa > octanu etylu > wyciąg metanolowy). Przeprowadzony w tym samym doświadczeniu test mierzący wpływ badanych ekstraktów na peroksydację lipidów wykazał niską aktywność badanych próbek [Güvenç i wsp. 2012].

#### 1.4.4. Inne kierunki aktywności biologicznej

Udowodniono również właściwości **hamujące enzymy** przez metabolity wtórne porostów. Zdolność hamowania aktywności 5-lipooksygenazy, enzymu biorącego udział w przebiegu procesów zapalnych wykazywały: **kwas konfluentowy**, **barbatowy**, **lobarowy** oraz **(+)-protolichesterynowy**. Kwas protolichesterynowy posiadał ponadto

właściwości hamowania enzymów biorących udział w namnażaniu się wirusa HIV. Rezultaty badań wykazały, że związek ten hamował odwrotną transkryptazę HIV-1 (HIV-1 RT) ( $IC_{50} = 24 \mu M$ ), komórkową polimerazę DNA- $\beta$  ( $IC_{50} = 6 \mu g/ml$ ), a także ludzką ligazę DNA typu I ( $IC_{50} = 20 \mu M$ ). Hamowanie enzymu HIV-1 RT odbywa się przez wiązanie się z enzymem w miejscu, niebędącym jego centrum aktywnym [Pengsuparp i wsp. 1995, Tan i wsp. 1996, Müller 2001].

W innych badaniach wykazano aktywność kwasu **wirensowego**, izolowanego z *Pseudevernia furfuracea*, wobec trypsyny. Okazało się, że związek zmniejszał aktywność enzymu przy  $IC_{50} = 6,3 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$  [Proksa i wsp. 1994].

**Kwas konfluentowy** był wysoce aktywny wobec monoaminooksydazy B ( $IC_{50} = 0,22 \mu M$ ), enzymu odpowiadającego za katabolizm neurotransmiterów (w tym dopaminy). Związki hamujące MAO-B, mogą mieć znaczenie w poszukiwaniach leku na chorobę Parkinsona [Endo i wsp. 1994].

W badaniach testujących zdolność hamowania  $LTB_4$  kwas difraktowy i kwas (+)-**protolichesterynowy** wykazywały wysoką aktywność ( $IC_{50} = 8$  i  $9 \mu M$ ), co wskazywało na przeciwzapalne właściwości tych substancji. **Kwas gyroforowy** działał słabiej ( $IC_{50} > 60 \mu M$ ) [Kumar i Müller 1999].

Podjęto badania dotyczące wpływu metabolitów porostowych na **aktywność  $\alpha$ - oraz  $\beta$ -glukozydazy**, niezbędnej do prawidłowego trawienia węglowodanów oraz rozwoju wirusów w tym HBV czy HIV. Badania dotyczyły acetonowych, metanolowych i uzyskanych za pomocą dimetylosulfotlenku wyciągów z *Ramalina nervulosa*, *R. pacifica*, *R. celastri*. Otrzymane wyniki wykazały, że w stężeniu  $20 \mu g/ml$  najsilniej działały wyciągi metanolowe. Stopień hamowania  $\alpha$ -glukozydazy wynosił 87,88%, 76,84%, 69,98% w przypadku *R. nervulosa*, *R. pacifica* i *R. celastri* odpowiednio, co było wartością wyższą od otrzymanej dla wzorcowej akarbozy, substancji stosowanej w leczeniu cukrzycy. Wyciągi z badanych gatunków okazały się też silniejszymi inhibitorami  $\beta$ -glukozydazy, w porównaniu z wzorcową kastanosperminą (hamowanie o 89,21%, 69,38%, 61,96% i 59,98%, odpowiednio) [Verma i wsp. 2012].

Oceniano również **przeciwbólne** działanie porostów. Taki kierunek działania dla *Pseudevernia furfuracea* udowodniono oceniając wyniki testu przeprowadzonego na myszach, u których indukowano skurcze żołądka za pomocą p-benzochinonu. 60 minut po doustnym podaniu badanego wyciągu, myszom zaaplikowano dootrzewnowo ( $0,1 \text{ ml}/10 \text{ g m.c.}$ ) roztwór p-benzochinonu (PBQ; 2,5% w/v), a następnie przez 15 minut,

zaczynając 5 minut po wstrzyknięciu roztworu PBQ, mierzono liczbę skurczy żołądka. Działanie przeciwbólowe zostało porównane z grupą kontrolną i wyrażone jako różnica pomiędzy reakcją na ból w grupie odniesienia a grupą badaną. W przypadku podawania myszom wyciągu metanolowego z *P. furfuracea* w stężeniu 100 mg/kg zauważono o 24,2% niższą aktywność skurczową w porównaniu z grupą stanowiącą kontrolę oraz brak podrażnień śluzówki żołądka. Wybrany jako wzorzec kwas acetylosalicylowy zmniejszał dolegliwości badanych myszy o 43,6%, jednak u 5 z 6 badanych zwierząt powodował ostre zmiany zapalne przewodu pokarmowego [Güvenç i wsp. 2012].

Działanie przeciwbólowe wykazywał również **kwas difraktowy**. Depsyd podany doustnie myszom (200 mg/kg), w teście z kwasem octowym, zmniejszał ból o 47% w stosunku do grupy kontrolnej [Okuyama i wsp. 1995].

Aktywność **przeciwzapalną** metanolowego wyciągu z *Pseudevernia furfuracea* wykazano w badaniu na myszach, u których wywoływano stan zapalny poprzez podanie do prawej, tylnej łapy roztworu karageniny (0,5mg/25µl), po wcześniejszym podaniu doustnym badanego wyciągu. Otrzymane wyniki wykazały, że w czasie do 6 godzin po zaaplikowaniu ekstraktu w dawce 100 mg/kg m.c. poprawa wynosiła 14,6% do 27,5%. Jednocześnie nie obserwowano wystąpienia zmian zapalnych błony śluzowej żołądka. Rezultaty wskazywały na istotne, przeciwzapalne działanie testowanego wyciągu. Poziom działania *P. furfuracea* w porównaniu z równolegle stosowaną indometacyną wyniósł około 40% [Güvenç i wsp. 2012].

Badano ochronny wpływ wyciągu metanolowego z *Lobaria pulmonaria* na śluzówkę żołądka poddaną działaniu indometacyny. Testowany ekstrakt podawano doustnie pięciu grupom szczurów w stężeniach 50, 100, 200, 500 i 1000 mg/kg masy ciała. Jako substancja referencyjna została podana *p.o.* ranitydyna (50 mg/kg). Indometacynę (25 mg/kg) zaaplikowano 5 minut od podania szczurom badanego ekstraktu lub ranitydyny. Po czasie sześciu godzin uspiono badane szczury i oceniono stan śluzówki żołądka oraz stopień pokrycia jej wrzodami. Okazało się, że najwyższe ze stosowanych stężeń było nieznacznie wyższe od skutecznie działającego stężenia ranitydyny, natomiast w stężeniu 500 mg/ml wyciąg miał porównywalną aktywność. Ochronne działanie na śluzówkę żołądka, w zależności od stężenia wynosiło 29-77%. Wyciąg z *L. pulmonaria* posiadał także zdolność zmniejszania poziomu stresu oksydacyjnego w doświadczalnym uszkodzeniu błony śluzowej żołądka. Ustalono, że działanie gastroprotecyjne wyciągu może wynikać z jego zdolności do zmniejszania uszkodzeń oksydacyjnych śluzówki oraz hamowania infiltracji neutrofilów w błonę

śluzową żołądka. Stwierdzono także, że wyciąg podany doustnie w dawce 3000 mg/kg nie powodował śmierci szczurów w czasie 24 godzin od podania [Karakus i wsp. 2009].

W badaniach *in vitro* wykazano, że zastosowanie niskich stężeń (IC<sub>05</sub>) wtórnych metabolitów porostowych, stymulowało migrację komórek keratynocytów ludzkich (HaCaT) i dzięki temu korzystnie wpływało na **gojenie się ran**. Utworzoną monowarstwę z komórek HaCaT mechanicznie uszkodzono i wystawiono na działanie badanych związków. Wynik stanowiła ocena stopnia „zamknięcia się rany”, określona na podstawie rezultatów pomiaru oddalenia brzegów przeciętej monowarstwy komórek w czasie 0 i po 24 godzinach. Odniesienie stanowiła próba, w której czynnikiem zablizniającym był stosowany w praktyce klinicznej lizat płytkowy. Spośród testowanych związków porostowych najsilniej na migrację komórek monowarstwy działał kwas gyroforowy i kwas (+)-usninowy. Kwas ewernowy nie wpływał na stopień migracji komórek, natomiast kwasy salazynowy i wulpinowy dawały pośrednie rezultaty. Ciekawy wydaje się wynik połączenia działających najsilniej kwasu gyroforowego i (+)-usninowego, gdyż w tym przypadku stopień migracji keratynocytów ludzkich był największy. Ponadto okazało się, że wpływ związków porostowych na migrację komórek tworzących monowarstwę koreluje z obserwowanym efektem gojenia się rany. Współczynnik (%) obrazujący tempo gojenia się ran był najniższy dla kwasu ewernowego, miał średnią wartość dla kwasu salazynowego i wulpinowego, natomiast był najwyższy dla kwasu usninowego i gyroforowego oraz mieszaniny tych dwóch substancji. W przypadku badanej mieszaniny związków obserwowano efekt porównywalny nawet z działaniem lizatu płytkowego [Burlando i wsp. 2009].

Badano także wpływ wyciągu metanolowego z *Pseudevernia furfuracea* oraz frakcji powstałych przez ekstrakcję wyciągu metanolowego różnymi odczynnikami **na proces gojenia się ran**. Eksperyment został przeprowadzony na zwierzętach w modelu rany ciętej w sposób liniowy i modelu okrągłego wycięcia rany. W każdym przypadku rany smarowano maścią zawierającą wyciągi z *P. furfuracea*. Uzyskane wyniki wskazywały, że w przypadku rany ciętej, obliczony współczynnik określający wytrzymałość rany na rozciąganie był najwyższy w przypadku aplikowania wyciągu metanolowego oraz frakcji octanu etylu i po dziewięciu dniach leczenia wynosił 30,5% oraz 37,9% odpowiednio. W badaniach wpływu ekstraktów z *P. furfuracea* na gojenie się ran powstałych przez wycięcie, obkurczanie się rany oceniono na 35,32% i 61,11% dla wyciągu metanolowego oraz 40,30% i 88,38% dla frakcji octanu etylu, odpowiednio po 8

i 12 dniach leczenia. Inne testowane frakcje (dichlorometanowa i butanolowa) nie wykazywały statystycznie istotnego wpływu na gojenie się ran [Güvenç i wsp. 2012].

Ciekawe są wyniki badań dotyczące działania etanolowego wyciągu z *Lethariella cladonioides*, zawierającego kwasy: tamnolowy, skwamatowy, lekanorowy, norstiktowy, beomycesowy, barbatowy, usninowy, kanarion, wermikularynę i in. niezidentyfikowane substancje. Badania prowadzono na myszach, które początkowo otrzymywały zwykłą dietę (wg American Institute of Nutrition 1997 i 1980), a następnie zostały podzielone na 5 grup. W pierwszej grupie kontynuowano „zdrowe” żywienie, w pozostałych (2-5) dietę zmodyfikowano, w taki sposób, aby zawartość w niej tłuszczu i cholesterolu była wysoka (HFCD). Grupie 3-5 podawano wzrastające ilości wyciągu z porostu (400 mg/kg, 800 mg/kg i 1600 mg/kg na dzień). Po 6-tygodniach trwania eksperymentu zbadano gryzonie i ich wątroby. Okazało się, że w grupie otrzymującej wyłącznie pokarm obfity w tłuszcze poziom lipidów był najwyższy. Poziom triglicerydów TG, całkowitego cholesterolu TC i lipoprotein LDL w surowicy krwi myszy był niższy w grupach 3-5, w porównaniu z ich stężeniem we krwi gryzoni z grupy 2. Poziom lipoprotein HDL był najniższy w grupie odżywianej dietą wysokotłuszczową. Sytuacja wyglądała podobnie w przypadku wątrobowego poziomu TG i TC, które były najwyższe u zwierząt z grupy badanej nr 2. Poziom TG i TC w kale zwierząt był wyższy w grupach karmionych ekstraktem z badanego porostu. W eksperymencie określono również wątrobowy poziom dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), a także dialdehydu malonowego (MDA) uznanego za wskaźnik stresu oksydacyjnego. Okazało się, że poziom SOD, najniższy w grupie spożywającej pokarm o wysokiej zawartości tłuszczu, wzrastał w grupach przyjmującej równocześnie badany ekstrakt (800 mg/kg > 1600 mg/kg > 400 mg/kg). Zmianie ulegało również stężenie MDA, które w przypadku spożywania jedynie pokarmu wysokotłuszczowego wynosiło 7,69 nmol/mg białka, natomiast najbardziej zmniejszało się przy wprowadzeniu do diety wyciągu w ilości 800 mg/kg (6,45 nmol/mg białka). Wykonana sekcja wątroby badanych szczurów wykazała, że jej stan (rozmiar komórek wątrobowych i ilość zawartego w nich tłuszczu) był najlepszy w grupie otrzymującej dietę wysokotłuszczową i suplementowanej wyciągiem porostowym w dawce 800 mg/kg na dzień. W świetle uzyskanych w badaniu wyników, autorzy stwierdzili, że *L. cladonioides* może mieć znaczenie w prewencji i leczeniu schorzeń układu sercowo-naczyniowego, zwłaszcza w przypadku występującej hiperlipidemii i zwiększonego poziomu wolnych rodników w organizmie [Wei i wsp. 2012].

## 2. Charakterystyka badanych gatunków porostów

### 2.1. Wybór gatunków do badań

Do badań wybrano gatunki porostów występujące pospolicie na terenie Polski, nie objęte ochroną prawną, zawierające związki o mało poznanej aktywności biologicznej. Związki te, należące do różnych grup chemicznych, to głównie depsydy i depsydony oraz kwas (-)-usninowy. Z uwagi na powyższe założenia, które uniemożliwiły wybranie gatunków jednolitych pod względem systematyki, badane porosty należą do trzech rodzin i są przedstawicielami czterech rodzajów.

### 2.2. Systematyka

Rząd: LECANORALES Nannf (1932)

Rodzina: *Parmeliaceae*

Rodzaj: *Hypogymnia*

Gatunek: *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. (1896)

Rodzaj: *Parmelia*

Gatunek: *Parmelia sulcata* Taylor (1836)

Rodzina: *Lecideaceae*

Rodzaj: *Hypocenomyce*

Gatunek: *Hypocenomyce scalaris* (Ach. ex Lilj.) M. Choisy (1951)

Rodzina: *Cladoniaceae*

Rodzaj: *Cladonia*

Gatunek: *Cladonia uncialis* (L.) Weber ex Wigg. (1780)

[wg Purvis 1992]



## 2.3. Charakterystyka botaniczna i chemizm badanych gatunków porostów

### 2.3.1. *Hypogymnia physodes*



**Rycina 6.** Plecha *Hypogymnia physodes*

[<http://www.nagrzyby.pl/index.php?artname=stories&artmid=content&id=3943> (9.11.2012)].

Plecha gatunku *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. (Pustułka pęcherzykowata; syn. *Parmelia physodes* (L.) Ach.) jest listkowata, średnicę do 10 cm i jest luźno przytwierdzona do podłoża. Jej kształt przypomina rozetę, często o nieregularnym wyglądzie. Plecha ma nierzadko postać płatów o szerokości 2-3 mm. Górna powierzchnia plechy jest gładka, szara lub szarozielona, dolna ma kolor czarny, wzdłuż brzegów jasnobrazowy. Plecha *H. physodes* ma heteromeryczną budowę z korą na górnej i dolnej stronie. Soralia są typu wargowego i tworzą się na granicy warstwy korowej górnej oraz dolnej, natomiast białe lub białozielone soredia znajdują się na spodniej stronie kory górnej. Apotecja lekanorowe o średnicy 2-8 mm, są bardzo rzadko obecne. Porost wytwarza zarodniki 1-komórkowe, bezbarwne, elipsoidalne o wymiarach 6-9 x 4-5  $\mu\text{m}$ , po 8 w worku.

*H. physodes* rośnie na podłożach o kwaśnym odczynie (pH 4,5): na korze drzew szpilkowych, liściastych, drewnie, słomianych dachach, natomiast rzadko występuje na ziemi i podłożu skalnym. Jest to gatunek bardzo pospolity i powszechnie występuje na terenie naszego kraju, jak również w innych częściach Europy, Ameryce Północnej, Afryce Wschodniej a nawet w Himalajach [Wójciak 2007, Purvis 1992].

W wyniku przeprowadzonych dotąd prac w *H. physodes* stwierdzono obecność depsydów: **atranoryny**, **chloroatranoryny** (w części korowej plechy), a także depsydonów: **kwasy fizodowego**, **kwasy hydroksyfizodowego**, **kwasy fizodalowego**, **kwasy izofizodowego** oraz **kwasy protocetrarowego** (w części rdzeniowej) [Culberson 1979, Purvis i wsp. 1992, Huneck i Yoshimura 1999, Solhaug i wsp. 2009, Pavlovic i wsp. 2013]. Przeprowadzone badania ilościowe (metodą HPLC) związków znajdujących

się w *H. physodes* (Norwegia) wykazały, że spośród substancji występujących w rdzeniowej części plechy najwyższe stężenie posiadał kwas fizodalowy (2,7-8,4% suchej masy) i fizodowy (3,3-5,0%). Znacznie niższą koncentrację wykazywały kwas protocetrarowy (0,26-0,52%), a także substancje zawarte w części korowej: atranoryna (0,14-0,43%) i chloroatranoryna (0,03-0,18%) [Solhaug i wsp. 2009]. W badaniach wyciągu metanolowego otrzymanego z plech *H. physodes* zebranych z przemysłowych obszarów na terenie Polski (Śląsk-Kraków), procentowa zawartość każdego z kwasów: fizodowego, fizodalowego, hydroksyfizodowego, mieściła się w granicach 16,5%-25,8%, natomiast zawartość atranoryny wynosiła 1,7-3,1% [Białońska i Dayan 2005]. Udowodniono, że związki o charakterze depsydonów, występujące w plesze *H. physodes*, mogą posiadać zdolność wiązania kationów niektórych metali [Hauck i Hunek 2007]. Według danych piśmiennictwa kwas fizodalowy wykazywał niezwykle silną (95%) zdolność absorbowania jonów metali  $Fe^{3+}$ . Cechę tę posiadały również kwas fizodowy i protocetrarowy, jednak w stopniu znaczenie niższym od wymienionych wyżej związków (około 44 i 43%, odpowiednio). Zjawiska nie zaobserwowano dla jonów  $Fe^{+2}$ . Ponadto zdolność absorpcji kationów metali, jednak już w dużo mniejszym stopniu, dotyczyła jonów  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ . Badane depsydony nie wykazywały zdolności do kompleksowania jonów  $Cu^{2+}$ . Wykazano, że zawartość związków czynnych może wahać się w zależności od środowiska życia porostów (stopnia nasłonecznienia i zanieczyszczenia środowiska) [Hauck i Hunek 2007, Solhaug i wsp. 2009]. Dotychczas stwierdzone właściwości biologiczne związków i wyciągów z *H. physodes* opisano w rozdziałach: 3.1.1., 3.1.2., 3.1.5., 3.2.1.

### 2.3.2. *Parmelia sulcata*



**Rycina 7.** Plecha *Parmelia sulcata*

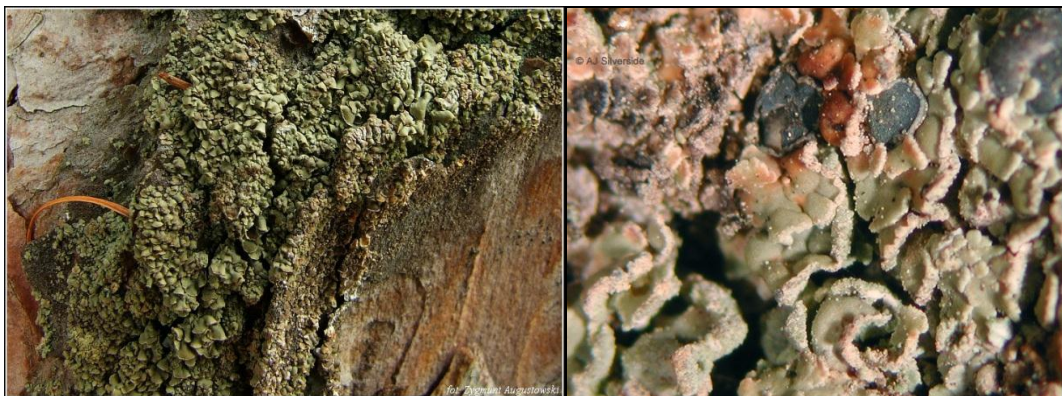
[[http://www.lichens.lastdragon.org/Parmelia\\_sulcata.html](http://www.lichens.lastdragon.org/Parmelia_sulcata.html) (9.11.2012)].

Gatunek *Parmelia sulcata* Taylor (Tarczownica bruzdkowana; syn. *Parmotrema sulcatum* (Taylor) M. Choisy) posiada plechę listkową, rozetkową, nieregularną o średnicy 5-20 cm. Plecha o barwie popielatej, niebieskawoszarej lub zielonkawoszarej, formuje płyty o szerokości do 0,5 cm, przylegające lub nieco zachodzące na siebie. Na powierzchni plechy występują białe pseudocyfelle, często tworzące wypukłą, delikatną siateczkę, na powierzchni których tworzą się podłużne, w postaci bruzdek lub koliste soralia z solediami o ziarnistej strukturze. Dolna strona plechy w środkowej części ma kolor czarny, natomiast na obwodzie jest brunatna z licznymi chwytnikami. Apotecja o czerwono-brunatnych tarczках o średnicy 2-5 mm są typu lekanorowego i występują bardzo rzadko. Porost wytwarza zarodniki 1-komórkowe, bezbarwne, elipsoidalne o wymiarach 13-16 x 6-8  $\mu\text{m}$ , umieszczone po 8 w worku.

*P. sulcata* rośnie na korze drzew liściastych i szpilkowych, występuje również na drewnie, słomianych dachach. Porost ten rzadko można spotkać na zasobnym w azot podłożu skalnym lub na glebie. Tarczownica bruzdkowana jest jednym z najszerzej rozpowszechnionych na kuli ziemskiej porostów. W Polsce występuje na terenie całego kraju [Wójciak 2007, Purvis i wsp. 1992].

Dotychczasowe badania wskazują, że *P. sulcata* syntetyzuje **atranorynę** (depsyd) i **kwaz salazynowy** (despydon) [Purvis i wsp. 1992, Culberson 1979]. W piśmiennictwie z początków wieku XX znajdują się wzmianki o obecności kwasu lobarowego czy protocetrarowego w plechach opisywanego gatunku [Culberson 1979]. Przebadane dotąd właściwości biologiczne związków i wyciągów z *P. sulcata* opisano w rozdziałach 3.1.1., 3.2.1.

### 2.3.3. *Hypocenomyce scalaris*



**Rycina 8.** Plecha *Hypocenomyce scalaris*

[[http://www.nagrzyby.pl/index.php?artname=gatunek&id=2955&page=1&atlas=atlas\\_lacinski](http://www.nagrzyby.pl/index.php?artname=gatunek&id=2955&page=1&atlas=atlas_lacinski)]  
 [[http://www.lichens.lastdragon.org/Hypocenomyce\\_scalaris.html](http://www.lichens.lastdragon.org/Hypocenomyce_scalaris.html) (9.11.2012)].

Gatunek *Hypocenomyce scalaris* (Ach. ex Lilj.) M. Choisy (paznokietnik ostrygowaty; syn. *Lecidea scalaris* (Ach.)) posiada plechę złożoną z drobnych łuseczek o średnicy 0,5-2,0 mm, o kolistym lub muszelnym kształcie. Łuseczki posiadające oliwkową, szaro-, żółtozieloną lub brunatną barwę, nakładają się na siebie dachówkowato a ich brzeg nie przylega do podłoża i jest lekko zadarty ku górze. Na krawędziach i po spodniej stronie plechy, wzdłuż brzegu, znajdują się biało-żółtawe, zielonkawe lub brązowe soledia o mączystej, ziarenkowej strukturze. Apotecja o średnicy 1,5-2,0 mm, czarne i płaskie, niebieskoszaro przyprószone, występują bardzo rzadko i przyczepione są delikatnie do łuseczkowatej plechy. *H. scalaris* wytwarza 1-komórkowe zarodniki o wymiarach 7-8 x 3-4 µm, umieszczone po 8 w worku.

Zajmowane przez *H. scalaris* podłoża to kora drzew szpilkowych i liściastych oraz drewno. Gatunek ten rzadko rośnie na podłożu skalnym. Paznokietnik ostrygowaty jest rozpowszechniony niemal na całej kuli ziemskiej. Występuje pospolicie w Europie, Ameryce Północnej, Australii i na obszarze byłego Związku Radzieckiego. W Polsce jest pospolity na terenie całego kraju [Wójciak 2007, Purvis i wsp. 1992].

Z *H. scalaris* wyizolowano dotąd **kwasy lekanorowy** [Huneck i Yoshimura 1999]. Badania aktywności biologicznej, dotyczyły kwasu lekanorowego pozyskiwanego z innych porostów niż *H. scalaris*, jak: *Parmotrema tinctorum*, *Parmotrema stuppeum*, *Ochrolechia androgyna*, *O. parella* i zostały omówione w rozdziale 3.1.3. Nie ma danych na temat działania biologicznego wyciągów otrzymanych z *H. scalaris*.

### 2.3.4. *Cladonia uncialis*



**Rycina 9.** Plecha *Cladonia uncialis*

[[http://www.lichens.lastdragon.org/Cladonia\\_uncialis\\_uncialis.html](http://www.lichens.lastdragon.org/Cladonia_uncialis_uncialis.html) (9.11.2012)].

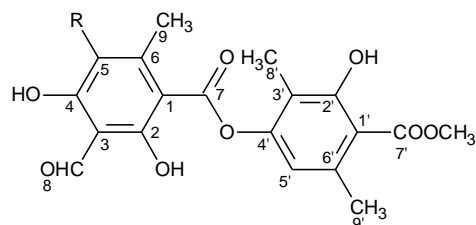
*Cladonia uncialis* (L.) Weber ex Wigg. (Chrobotek gwiazdkowaty; syn. *Lichen uncialis* L. 1753) wytwarza wielopostaciową plechę. Pojawiające się wczesnie łuseczki, należące do plechy pierwotnej dość szybko zanikają. Później tworzą się tzw. podecja (mają postać trzoneczków), o wysokości 1,5-6 cm, grubości 1-3 mm i zielonożółtym lub zielonoszarym zabarwieniu, często brunatniejącym na szczycie. Mają one wałeczkowaty kształt, rosną pionowo lub pokładają się, a na końcach rozgałęziają się widelkowato na 3-5 ostro zakończonych części. Podecja bez łusek i sorediów, posiadają często w kątach rozgałęzień otworek oraz pyknidia z czerwoną galaretą. Apotecja (średnica do 0,8 mm) występują rzadko i ulokowane są na szczytach podecjów. Porost wytwarza 1-komórkowe, bezbarwne zarodniki o wymiarach 3-3,5 µm, po 8 w worku.

*C. uncialis* porasta gleby. Chrobotek gwiazdkowaty rośnie w lasach szpilkowych, na wrzosowiskach, przydrożach a także wydmach. Jest to gatunek pospolicie występujący na terenie naszego kraju, jak również w pozostałej części Europy i Ameryce Północnej [Wójciak 2007, Purvis i wsp. 1992].

Metabolity wtórne *C. uncialis* to głównie **kwas (-)-usninowy** (dibenzofuran), **kwaskwamatowy** (depsyd). Według danych piśmiennictwa, niektóre z badanych próbek zawierały jeszcze kwas tamnolowy lub hypotamnolowy [Purvis i wsp 1992, Culberson 1979]. Wykryte dotąd właściwości biologiczne obecnego w badanym gatunku kwasu (-)-usninowego zaprezentowano w rozdziale 3.1.7. Kwas skwamatowy jak i wyciągi z *C. uncialis* nie były do tej pory badane (rozdział 3.1.4. i 3.2.2.).

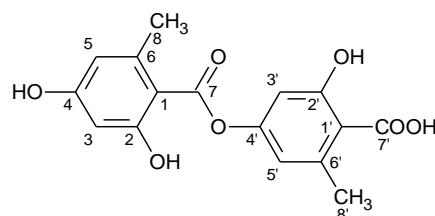
### 3. Aktywność biologiczna badanych porostów

#### 3.1. Aktywność biologiczna związków otrzymanych z badanych gatunków porostów

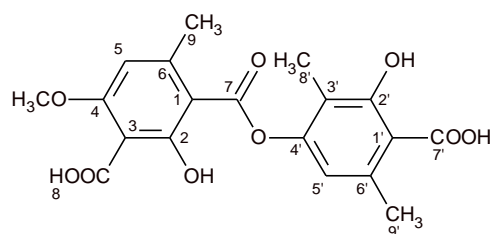


a) atranoryna R=H

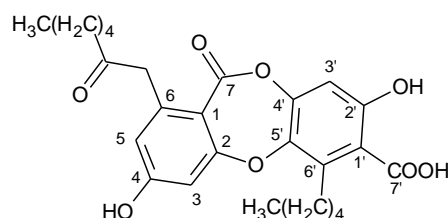
b) chloroatranoryna R=Cl



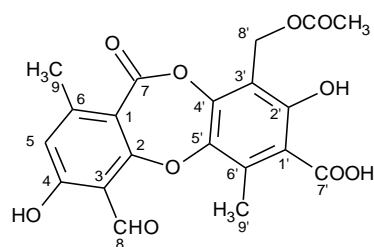
c) kwas lekanorowy



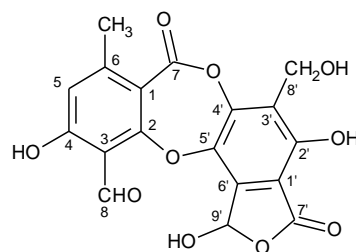
d) kwas skwamatowy



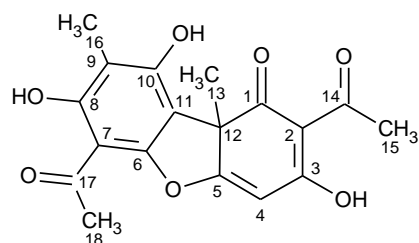
e) kwas fyzodowy



f) kwas fyzodalowy



g) kwas salazynowy



h) kwas usninowy

**Rycina 10.** Wzory związków wyizolowanych z badanych gatunkach porostów.  
a-d: depsydy; e-g: depsydony; h: pochodna dibenzofuranu [wg Huneck i Yoshimura 1999].

### 3.1.1. Atranoryna

Atranoryna jest szeroko rozpowszechnionym w porostach deksydem. Jej częste występowanie w plechach lichenizowanych grzybów przełożyło się na intensywność prac nad jej aktywnością biologiczną. **Przeciwdrobnoustrojowe** właściwości atranoryny badał Yilmaz i wsp. Za pomocą metody dyfuzyjno-krażkowej określił minimalne stężenie hamujące rozwój drobnoustrojów (MIC). Otrzymane wyniki wahały się w zależności od użytego szczepu między 15 a 500 µg związku naniesionego na krążek. Atranoryna była aktywna wobec *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, oraz *Aeromonas hydrophila*, natomiast inne testowane drobnoustroje cechowała mniejsza wrażliwość [Yilmaz i wsp. 2004]. Badano również działanie atranoryny wobec laseczek Gram-dodatnich z rodzaju *Bacillus*. Wartość wyznaczonego MIC wynosiła 31,0 µg/ml, natomiast dla stosowanej jako wzorzec streptomycyny MIC = 7,8 µg/ml. Określono równocześnie działanie atranoryny na szczepy *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Staphylococcus aureus* (MIC = 31,0 µg/ml) [Rancović i wsp. 2008]. Wykazano też, że atranoryna nie wpływała w istotny sposób na rozwój *Mycobacterium aurum* i *Mycobacterium tuberculosis* [Ingólfssdóttir i wsp. 1998, Honda i wsp. 2010]. Atranoryna nie działała na komórki grzybów strzępkowych [Türk i wsp. 2006].

Działanie atranoryny po 24-godzinnej inkubacji ze szczepami bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz komórkami grzybów oceniano metodą seryjnych rozcieńczeń. Atranorynę testowano wobec 10 typów drobnoustrojów (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Sarcinia lutea*, *Candida albicans*, *Cryptococcus diffluens*), a charakteryzująca siłę działania wartość MIC wynosiła 5,0-70,7 µg/ml. Atranoryna okazała się najsilniej działającą substancją spośród 7 testowanych w tym eksperymencie metabolitów porostów. Co ciekawe, wyniki badań wskazywały, że atranoryna wykazywała najsilniejsze działanie na szczepy Gram-ujemnych bakterii (*E. coli* i *P.vulgaris*; MIC = 8,3 µg/ml i 5,0 µg/ml, odpowiednio). Było ono porównywalne z powszechnie stosowanymi antybiotykami: erytromycyną i gentamycyną (4,7 i 4,6 µg/ml oraz 5,1 i 4,6 µg/ml, odpowiednio). Atranorynę cechowała również wysoka aktywność wobec badanych grzybów drożdżoidalnych (*C. albicans* i *C. diffluens* MIC = 17,0 µg/ml i 15,7 µg/ml, odpowiednio) [Neeraj i wsp. 2011]. Aktywność atranoryny wobec szczepów Gram-dodatnich (*Micrococcus luteus*, *S. aureus*, *B. subtilis*) i Gram-ujemnych (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) określono również w innym badaniu za pomocą metody dyfuzyjno-krażkowej. Stężenie testowanych roztworów

wynosiło 1 oraz 2 mg/ml. Roztwory w ilości 50  $\mu$ l zostały naniesione na krążki o średnicy 6,0 mm. Po inkubacji w odpowiednich warunkach, odczytano wielkość strefy zahamowania wzrostu. Otrzymane rezultaty pokazały, że atranoryna działała jedynie w wyższych stężeniach i tylko wobec *S. aureus* i *M. luteus* (12 i 9 mm, odpowiednio). W pozostałych przypadkach związek był nieaktywny. Dla stosowanej w stężeniu 0,5  $\mu$ g/ml lewofloksacyny jako substancji referencyjnej, strefa zahamowania wzrostu drobnoustrojów była równa 27 mm (dla *S. ureus*) i 38 mm (dla *B. subtilis*), natomiast dla badanego równocześnie kwasu usninowego w stężeniu 2 mg/ml, wielkość strefy inhibicji wzrostu badanych szczepów wynosiła 13 mm i 22 mm, odpowiednio [Nóbrega i wsp. 2012].

**Badania cytotoksyczności** atranoryny, przeprowadzone w warunkach *in vitro* wskazywały na brak działania toksycznego na komórki keratynocytów ludzkich (HaCaT) [Kumar i Müller 1999a] i słabą aktywność na komórki chłoniaka histiocytowego (U937) oraz białaczki promielocytowej (HL-60) [Toledo i wsp. 2003]. Ponadto atranoryna działała słabiej od kolchicyny na izolowane limfocyty szczurze (5,21 dpm i 3,5 dpm, odpowiednio) [Correché i wsp. 2002]. Badano również antyproliferacyjne/cytotoksyczne właściwości atranoryny dziewięciu różnych liniach komórek wywodzących się z nowotworów: jajnika (A2780), szyjki macicy (HeLa), piersi (MCF-7 i SK-BR-3), okrężnicy (HT-29), jelita grubego (HCT-116 P53<sup>+/+</sup> i HCT-116 P53<sup>-/-</sup>), białaczki promielocytowej (HL-60) oraz na ludzkiej linii nowotworowej limfoblastoidalnej T (Jurkat). Otrzymane wyniki wskazywały na zróżnicowane właściwości toksyczne depsydu, w zależności od stężenia i czasu ekspozycji. W badaniu stwierdzono, że atranoryna działa na komórki białaczki promielocytowej (HL-60; IC<sub>50</sub> = 93,5  $\mu$ M), a także (choć słabiej), na komórki raka jajnika, jelita grubego i Jurkat (IC<sub>50</sub> około 200  $\mu$ M). Dla pozostałych linii komórkowych wartość IC<sub>50</sub> > 200  $\mu$ M [Bačkorova i wsp. 2010].

Aktywność **antyoksydacyjną** atranoryny i kwasu lekanorowego wyizolowanych z *Parmotrema stuppeum* badano mierząc zdolność związków do utleniania cząsteczek  $\beta$ -karotenu. Oba związki, w stężeniu 200  $\mu$ g/ml (534 i 628  $\mu$ M) wykazywały podobny, lecz niski - w porównaniu z BHA, poziom aktywności antyoksydacyjnej (14% i 12% oraz 93%, odpowiednio) [Jayaprakasha i Rao 2000].

W celu oceny **przeciwbólowych właściwości** atranoryny wykonano tzw. test przeciągania u myszy. Skurcze brzucha u zwierząt wywoływano podając dootrzewnowo: 10 ml/kg 1% kwasu octowego. Atranorynę stosowano w stężeniu 25 mg/kg. Substancją odniesienia był kwas acetylosalicylowy aplikowany w dawce 50 mg/kg. Otrzymane



rezultaty wykazały, że atranoryna hamuje skutki działania kwasu octowego w 87%, natomiast aspiryna, chociaż stosowana w dwukrotnie w wyższych stężeniach hamowała skurcze tylko w 68%. Dodatkowo atranorynę charakteryzowała niska toksyczność ( $LD_{50} > 500$  mg/kg), co stanowiło dawkę ponad 20-krotnie wyższą od wywołującej efekt przeciwbólowy [Maia 2002]. Wyniki kolejnych badań potwierdzające antynocyceptywne działanie depsydu zostały opublikowane przez Melo i wsp. W tym celu przeprowadzono na myszach test przeciągania oraz test formalinowy. Rezultaty uzyskane w teście przeciągania, w którym atranorynę aplikowano zwierzętom doustnie w dawkach 100, 200 i 400 mg/kg m.c., natomiast związek referencyjny (aspiryna) w dawce 200 mg/kg m.c. ukazały, że ból wywołany podaniem dootrzewnowym 10 ml/kg m.c. 0,85% roztworu kwasu octowego, był przez atranorynę hamowany zależnie od dawki (13,4%, 52,6% i 61,3%, odpowiednio). Właściwości przeciwbólowe aspiryny wyniosły natomiast 90,7%. W tych samych badaniach zwierzętom podano podskórnie do tylnej łapy 20  $\mu$ l 1% roztworu formaliny. W przebiegu tzw. testu formalinowego, obserwowano zachowanie zwierząt w dwóch fazach: po 5 i po 15-30 minutach od podania roztworu formaliny. W pierwszej fazie doświadczenia podanie atranoryny nie powodowało zmian w zachowaniu gryzoni w porównaniu z grupą kontrolną. Po 15-30 minutach działanie atranoryny w dawce 400 mg/kg masy ciała okazało się porównywalne z użytym jako substancja referencyjna kwasem acetylosalicylowym (64,8% i 69,9% odpowiednio). Aktywność antynocyceptywna badanego depsydu była zależna od dawki [Melo i wsp. 2008].

Opisano również **fotoprotekcyjne** właściwości atranoryny. Wykonano eksperyment, w którym po podaniu atranoryny oceniono stopień inhibicji wiązania się z białkami ludzkiego osocza 8-metoksyporalenu (8-MOP), znanego jako substancja fotouczulająca. Okazało się, że wzrost stężenia depsydu w badanej próbce po poddaniu jej promieniowaniu UVA, powodował spadek łączenia się 8-MOP z białkami i w stężeniu 10 mM stopień inhibicji wynosił 20,1%. Sugeruje to fotoprotekcyjne działanie związku [Fernández i wsp. 1998].

Atranoryna posiada również właściwości **hamujące enzymy**. Rezultaty badań wskazują, że atranoryna wpływała hamująco na biosyntezę  $LTB_4$  poprzez blokowanie 5-LOX, w komórkach wielojądrzastych leukocytów bydlęcych ( $IC_{50} = 6$   $\mu$ M), co sugeruje potencjalnie przeciwzapalne właściwości związku. W tym samym eksperymencie wykazano, że mechanizm hamujący lipooksygenazę jest prawdopodobnie związany z bezpośrednim oddziaływaniem na enzym, nie zaś z właściwościami oksydacyjno-

redukcyjnymi atranoryny [Kumar i Müller 1999]. Z danych piśmiennictwa wynika, że atranoryna wpływała także na biosyntezę prostaglandyn w mikrosomach nerki królika i stymuluje porostowe enzymy: ureazę i arginazę [Proksa i wsp. 1994]. Bugni i wsp. badał właściwości atranoryny jako inhibitora cyklooksygenaz, enzymów uczestniczących w przebiegu procesów zapalnych. W prowadzonym eksperymencie oceniono też wpływ substancji badanej na poziom wytwarzanej przez COX prostaglandyny  $H_2$  ( $PGH_2$ ). Uzyskane wyniki wskazywały, że atranoryna hamowała COX-1 w zależności od dawki sposób, natomiast w stężeniu  $17 \mu\text{g/ml}$  ( $45 \mu\text{M}$ ) powodowała spadek aktywności enzymu o 50%. Zdolność blokowania COX-2 była mniejsza i w tym samym zakresie stężeń atranoryna powodowała spadek aktywności enzymu o 40%. W tym przypadku nie zaobserwowano zależnej od dawki relacji enzym-atranoryna. Substancją referencyjną w opisanym eksperymencie był kwas acetylosalicylowy, który w stężeniu  $50 \mu\text{M}$  hamował COX-1 i COX-2 w 59% i 42%, odpowiednio [Bugni i wsp. 2009]. Przeprowadzone badania świadczą również o właściwościach hamujących elastazę truskową świń (podana w stężeniu  $100 \mu\text{M}$  atranoryna hamowała enzym w 88%) oraz hamujących tripsynę (atranoryna w stężeniu  $500 \mu\text{M}$  powodowała inhibicję tripsyny w 76,7%;  $IC_{50}$   $1,8 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ ) [Proksa i wsp. 1994]. Atranoryna okazała się również inhibitorem wzrostu roślin wyższych [Huneck 1999].

Celem kolejnych badań było określenie właściwości **przeciwzapalnych** oraz **cytotoksycznych** atranoryny wobec fibroblastów mysich, a także **toksyczności** ostrej (dawka pojedyncza) i podostrej (30 dni), po podaniu doustnym u gryzoni. Aktywność przeciwzapalna była badana na szczurach w modelu odczynu zapalnego wywołanego podaniem do prawej, tylnej łapy szczurów 1% roztworu karageniny. Badaną atranorynę aplikowano doustnie trzem grupom zwierząt w dawkach 50, 100 i 200 mg/kg m.c., na godzinę przed podaniem roztworu karageniny. Substancją referencyjną był kwas acetylosalicylowy (300 mg/kg m.c. *p.o.*). Efekt działania badanych związków sprawdzono 3 godziny po wstrzyknięciu karageniny. Okazało się, że atranoryna podana w dawce 100 i 200 mg/kg m.c., hamowała powstanie odczynu zapalnego o 29,3% i 32,9%. Stosowany dla porównania kwas acetylosalicylowy wykazywał działanie silniejsze (76,4%). W kolejnej części eksperymentu zbadano wpływ atranoryny na migrację leukocytów wywołaną podaniem dootrzewnowym samcom myszy 500 mg karageniny. Podanie doustne myszom atranoryny w dawkach 50, 100 i 200 mg/kg (godzinę przed iniekcją karageniny), powodowało inhibicję migracji leukocytów, a stopień hamowania obserwowany po 4 godzinach od włączenia substancji wywołującej odczyn zapalny

wynosił odpowiednio 31,9; 35,9; 42,5%. Substancją referencyjną był wstrzyknięty podskórnice deksametazon (2 mg/kg), który w 92,2% hamował migrację leukocytów w miejscu stanu zapalnego. Następnym etapem badań było określenie toksycznego działania atranoryny. Toksyczność podostra została oceniona na szczurach (20 samców i 20 samic). Przez 30 dni zwierzętom podawano atranorynę w dawce 50 mg/kg. Uzyskane wyniki wskazywały, że atranoryna, nie powodowała zmian w przyroście masy ciała zwierząt, w porównaniu z próbą kontrolną. Nie zauważono także różnic w masie płuc, żołądka, wątroby i serca, także makro- i mikroskopowy obraz organów był prawidłowy i odpowiadający płci gryzoni. Niewielkie różnice w masie organów dotyczyły jedynie nerek samic szczurów. U samic, którym podawano atranorynę, była ona niższa w porównaniu z nerkami samic grupy kontrolnej (1,54 g i 1,91 g, odpowiednio). Przeprowadzone badania hematologiczne i biochemiczne krwi oraz histopatologiczne (płuca, serce, wątroba, nerki, jelita) wskazywały na brak różnic między zwierzętami leczonymi i grupą kontrolną. Toksyczność ostrą badano na szczurach jako skutek jednorazowego podania 5 g atranoryny. Dawka ta nie spowodowała śmierci zwierząt przez 14 dni obserwacji. Przez ten czas nie odnotowano również żadnych objawów toksyczności lub zmian w zachowaniu się badanych zwierząt. Należy jednak zauważyć, że w pierwszych 24 godzinach po podaniu atranoryny zwierzęta charakteryzowała zmniejszona aktywność ruchowa i stan letargu. Wykonane badania hematologiczne i biochemiczne krwi jak również makro i mikroskopowe badania organów, nie wykazywały odchyłań. Kolejna faza eksperymentu zakładała ocenę cytotoksycznych właściwości atranoryny, wobec mysich fibroblastów (L929). Oznaczenie przeprowadzono korzystając z często stosowanej metody MTT. Otrzymane rezultaty wykazały, że atranoryna w stężeniu 0,01-0,16 mg/ml nie posiadała działania toksycznego na badaną linię L929. Wszystkie uzyskane wyniki wskazywały na przeciwzapalne właściwości atranoryny, których mechanizm może być związany z wpływem na mediatory stanu zapalnego. Brak objawów toksyczności ostrej i podostrej jak i działania cytotoksycznego na fibroblasty mysie, czyni atranorynę związkami posiadającym korzystne cechy dla substancji o charakterze leczniczym [Melo i wsp. 2011].

### 3.1.2. Chloroatranoryna

Chloroatranoryna od atranoryny różni się obecnością atomu chloru przy pierścieniu aromatycznym. Badania dotyczące właściwości biologicznych chloroatranoryny są ograniczone, przypuszczalnie z powodu rzadszego występowania

związku oraz trudności w odseparowaniu jej od występującej często równocześnie atranoryny. Dane piśmiennictwa wskazują, że chloroatranoryna posiada aktywność przeciwbakteryjną oraz przeciwgrzybiczą (grzyby strzępkowe i drożdżoidalne). Uzyskane w eksperymencie wartości MIC dla bakterii zarówno Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych wynosiły MIC = 7,7 - 15,3 mM. Związek działał silniej na szczepy *Aeromonas hydrophila* i *Listeria monocytogenes*, słabiej na *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica*. Minimalne stężenie hamujące rozwój grzybów (*Candida albicans* i *Candida glabrata*) wynosiło MIC = 30,6 mM. Chloroatranoryna była nieaktywna wobec większości bakterii Gram-ujemnych (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*) oraz Gram-dodatniego szczepu *Streptococcus faecalis*. Silniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe chloroatranoryny wynika być może z obecności w cząsteczce atomu chloru, którego związki posiadają właściwości przeciwdrobnoustrojowe [Türk i wsp. 2006].

Bugni i wsp. badał wpływ chloroatranoryny na cyklooksyzgenazę (COX-1 i COX-2). W przeprowadzonym eksperymencie dowiedziono, że związek w stężeniu 17 µg/ml – 0,17 µg/ml powodował zmniejszenie aktywności COX-1 o 40%, natomiast nie wpływał na aktywność COX-2. Sugeruje to przeciwzapalne właściwości związku [Bugni i wsp. 2009].

### 3.1.3. Kwas lekanorowy

Kwas lekanorowy posiada słabe działanie **przeciwbakteryjne**. Izolowany z *Parmotrema tinctorum* związek, nie był aktywny wobec *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* (MIC > 1 mg/ml) oraz wobec patogenów roślin: *Xanthomonas campestris vesicatoria*, *Ralstonia solanacearum*. Inna aktywność charakteryzowała otrzymane na drodze półsyntezy pochodne kwasu lekanorowego, gdyż były od 1 do 128 razy bardziej aktywne od związku macierzystego. Wyjątek stanowił szczep *E. coli*, który nie był wrażliwy na żaden z badanych związków [Gomes i wsp. 2003]. Inne są wyniki badań Ranković i Mišić, którzy również testowali aktywność przeciwdrobnoustrojową kwasu lekanorowego (izolacja z *Ochrolechia androgyna*). W badaniu wykonano oznaczenie na bakteriach Gram-dodatnich: *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*; Gram-ujemnych: *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* oraz na grzybach: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinerea*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor mucedo*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium purpurescens*, *Penicillium verrucosum*, *Trichoderma harsianum*.

Kwas lekanorowy wykazywał porównywalne działanie przeciwbakteryjne z badanym równocześnie kwasem protocetrarowym (MIC od 0,062 do 0,125 mg/ml) a ponadto był związkiem o najsilniejszym działaniu przeciwgrzybiczym spośród testowanych równolegle: kwasu fumaroprotocetrarowego, protocetrarowego i stiktowego. Kwas lekanorowy w stężeniu 0,062 mg/ml, hamował wzrost 3 z 10 badanych szczepów grzybów. Jako wzorce stosowano streptomycynę i ketokonazol (MIC od 1,95 do 31,25 µg/ml). Otrzymane rezultaty wskazywały, że kwas lekanorowy działał od 4 do 32 razy słabiej niż stosowane leki [Ranković i Mišić 2008].

Aktywność przeciwbakteryjną kwasu lekanorowego oraz sześciu innych substancji izolowanych z porostów, o strukturze depsydów i depsydonów (atranoryna, kwas alektoronowy, kwas  $\alpha$ -kollatolikowy, kwas fumaroprotocetrarowy, kwas hypoprotocetrarowy, kwas protocetrarowy) testowano na 11 szczepach drobnoustrojów. Kwas lekanorowy działał jedynie na sześć spośród badanych szczepów bakteryjnych (*Bacillus subtilis* > *B. cereus* > *Cryptococcus diffluens* > *Escherichia coli* > *Streptococcus faecalis* > *Sarcinia lutea*). Badany depsyd nie był aktywny wobec: *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*. Minimalne stężenie hamujące (MIC) dla kwasu lekanorowego wynosiło od 24,6 µg/ml do 519,7 µg/ml, co dowodziło, że posiadał on najslabsze spośród testowanych substancji działanie przeciwdrobnoustrojowe. Aktywność wzorców (erytromycyna i gentamycyna) była w przypadku wszystkich mikroorganizmów rzędu MIC 4-6 µg/ml [Neeraj i wsp. 2011].

W innym badaniu oceniono aktywność przeciwdrobnoustrojową kwasu lekanorowego, stosując metodę dyfuzyjno-krażkową. Krażki o średnicy 6,0 mm nasączano roztworem kwasu lekanorowego (1 mg/ml i 2 mg/ml) i nakładano na podłoże z hodowlą drobnoustrojów. Po 24-godzinnej inkubacji zmierzono wielkość strefy zahamowania wzrostu bakterii. Kwas lekanorowy działał na bakterie Gram-dodatnie (*Micrococcus luteus* < *Staphylococcus aureus* < *Bacillus subtilis*), natomiast nie był aktywny wobec szczepów Gram-ujemnych (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). Średnica strefy inhibicji w przypadku, gdy odnotowano działanie wynosiła 10-21 mm (10-19 mm dla stężenia 1 mg/ml i 15-21 mm dla stężenia 2 mg/ml). Dla stosowanej w stężeniu 0,5 µg/ml substancji referencyjnej (lewofloksacyny) strefa inhibicji wynosiła: 33 mm (*M. luteus*), 27 mm (*S. aureus*) oraz 38 mm (*B. subtilis*) [Nóbrega i wsp. 2012].

**Właściwości przeciwnowotworowe** kwasu lekanorowego nie są dobrze poznane, jednak dostępne w piśmiennictwie wyniki badań *in vitro* wskazują, że jest to związek

o małej toksyczności. Depsyd, badano na różnych typach nowotworów ludzkich i zwierzęcych. Eksperymenty prowadzono na komórkach raka: krtani (HEp-2), piersi (MCF7) i nerek (786-0) oraz mysiego czerniaka (B16-F10), a wartość współczynnika  $IC_{50}$  była wyższa niż 50  $\mu\text{g/ml}$  ( $> 150 \mu\text{M}$ ) [Bogo i wsp. 2010]. Badano również wpływ kwasu lekanorowego na mysie komórki fibroblastów (L-929), komórki białaczki (K562) i na komórki raka macicy (HeLa). W każdym przypadku, kwas lekanorowy okazał się związkiem nietoksycznym [Ivanova i wsp. 2010].

**Właściwości antyoksydacyjne** kwasu lekanorowego badano w teście z odczynnikiem DPPH<sup>•</sup>. Określona w eksperymencie wartość stężenia przy której związek zmiatał 50% rodnika DPPH<sup>•</sup> wynosiła  $IC_{50} = 42 \text{ mM}$  i była wyższa od badanego równocześnie: kwasu orselinowego (5 mM), rezorcynolu (1,8 mM), orcynolu (2,9 mM) oraz kwasu galusowego, który jest bardzo silnym antyoksydantem ( $6,4 \times 10^{-3} \text{ mM}$ ) [Lopes i wsp. 2008]. Aktywność antyoksydacyjną kwasu lekanorowego badał również Thadhani i wsp. Okazało się, że kwas lekanorowy hamował powstawanie wolnych rodników nadtlenkowych w stężeniu niższym niż zastosowany w teście wzorzec galusan propylu (91,5  $\mu\text{M}$  i 106,0  $\mu\text{M}$  odpowiednio) [Thadhani i wsp. 2011].

Prowadzone badania wskazywały na **przeciwzapalne właściwości** kwasu lekanorowego. Depsyd kompetycyjnie hamował dekarboksylazę histydyny zarodków szczurów ( $IC_{50} = 3,7 \times 10^{-6} \text{ M}$ ), nie wpływał natomiast na dekarboksylazę aminokwasów aromatycznych, nawet w stężeniu  $1,1 \times 10^{-4} \text{ M}$ . Ponadto podany dootrzewnowo kwas lekanorowy, zmniejszał obrzęk łapy szczurów laboratoryjnych. Efekt działania po 3 i 5 godzinach od podania badanego związku był porównywalny (łagodził obrzęk w 25% natomiast kwas acetylosalicylowy w 39 i 35%, odpowiednio). Toksyczność kwasu lekanorowego była niezwykle niska, gdyż po podaniu myszom dożylnie 200 mg/kg nie wykazywał działania toksycznego. Równocześnie stwierdzono, że kwas lekanorowy jest nietrwały i po podaniu zwierzętom laboratoryjnym ulega rozkładowi do kwasu orseliniowego, a następnie orcynolu. Mogło to mieć wpływ na gorsze wyniki testów aktywności przeciwzapalnej [Umezawa i wsp. 1974]. Kwas lekanorowy posiadał także zdolność hamowania białkowej fosfatazy tyrozynowej (PTPB1), enzymu związanego z występującą w cukrzycy typu 2, insulinoopornością. Zjawisko inhibicji enzymu następowało przy wartości  $IC_{50} = 31 \mu\text{M}$  [Seo i wsp. 2009]. Udowodniono także, że kwas lekanorowy hamował rozwój pasożytów grzybów [Lawrey 1999].

### 3.1.4. Kwas skwamatowy

Dostępne piśmiennictwo nie dostarcza danych na temat aktywności biologicznej kwasu skwamatowego. Literatura opisuje jedynie działanie wyciągów, w których stwierdzono (metoda HPLC) obecność tego depsydu. Aktywność wyciągów opisano w rozdziałach 1.4.2.-1.4.4.

### 3.1.5. Kwas fizodowy i jego pochodne

Kwas fizodowy to stosunkowo rzadko występujący w porostach depsydon, o którego aktywności biologicznej wiadomo niewiele. Badano aktywność **antybiotyczną** kwasu fizodowego na różnych typach mikroorganizmów. Okazało się, że testowany depsydon działał na szczepy bakterii Gram-dodatnich: *Staphylococcus aureus* (25 µg/ml) oraz *Mycobacterium smegmatis* (100 µg/ml). Substancją wzorcową był siarczan streptomycyny, który na wymienione mikroorganizmy działał w stężeniu: 5,0 i 1,25 µg/ml, odpowiednio. Kwas fizodowy nie wpływał na rozwój bakterii *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* i grzyba dożdżoidalnego *Candida albicans* (>100 µg/ml) [Gollapudi i wsp. 1994]. Przeciwdrobnoustrojowe właściwości kwasu fizodowego badał również Türk i wsp. Depsydon słabiej od testowanych równolegle depsydów (chloroatranoryny i kwasu oliwatorowego) hamował wzrost takich szczepów jak: *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* (MIC = 53,1µM), nie działał natomiast na bakterie: *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, *Salmonella typhimurium* oraz na wszystkie testowane grzyby strzępkowe. Równocześnie kwas fizodowy działał silniej od chloroatranoryny, lecz słabiej od kwasu oliwatorowego na szczepy: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* (MIC = od 6,6 do 13,3 µM). Niższą aktywność przeciwgrzybiczą kwasu fizodowego od kwasu oliwatorowego (depsyd o analogicznej budowie do kwasu fizodowego), tłumaczono strukturą cząsteczki, która wskutek obecności wiązania eterowego i estrowego nie ma możliwości rotacji wokół wiązania. Odróżnia ją to od depsydów, pozbawionych blokady przestrzennej a zmieniając położenie w przestrzeni mogą zająć „centrum inhibicji” zlokalizowane w komórkach grzyba [Türk i wsp. 2006]. W innych badaniach aktywność przeciwdrobnoustrojowa kwasu fizodowego była niższa niż (MIC od 1 do 0,5 mg/ml) testowana równolegle atranoryna,

kwas gyroforowy czy usninowy. Najsilniej (MIC = 0,5 mg/ml) związek ten działał na *Botrytis cinere* i *Paecilomyces variotti* [Ranković i wsp. 2008].

Z *Hypogymnia tubulosa* został wyizolowany kwas 3-hydroksyfyzodowy, którego aktywność przeciwdrobnoustrojową przebadano na 13 szczepach bakterii, 2 grzybach drożdżoidalnych i 10 grzybach strzępkowych. Pochodna kwasu fizodowego była aktywna wobec 9 spośród wszystkich badanych mikroorganizmów (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Candida albicans*) a wartość MIC wahała się między 0,08 - 2,57  $\mu\text{M}$  (1,95 – 62,5  $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ ). Niezwykle interesująca może wydawać się silna aktywność związku wobec *C. albicans* zwłaszcza, że badane równolegle wyciągi z *H. tubulosa* były nieaktywne dla tego drożdżoidalnego grzyba [Yilmaz i wsp. 2005].

Badano też mutagenne właściwości kwasu fizodowego i fizodalowego. W tym celu na dwóch szczepach *Salmonella typhimurium* (TA98 i TA100) przeprowadzono test Ames. Okazało się, że kwas fizodalowy wykazywał zależną od dawki mutagenność na szczepach TA100 [Shibamoto i Wei 1984, Osawa i wsp 1991].

Kwas fizodowy posiadał także właściwości **hamujące działanie enzymów**. Opisano zdolność depsydonu do blokowania integrazy HIV-1, enzymu spełniającego ważną rolę w procesie uaktywniania replikacji wirusa HIV. Kwas fizodowy jest więc substancją o potencjalnym znaczeniu w walce z wirusem niedoboru odporności [Müller 2001, Neamati 1997]. Ponadto kwas fizodowy, wykazywał aktywność wobec elastazy trzustkowej oraz trypsyny. Stopień inhibicji enzymatycznej zbadany w testach, wynosił około 20% dla elastazy (w stężeniu 100  $\mu\text{M}$ ) i trypsyny (w stężeniu 500  $\mu\text{M}$ ). Aktywność kwasu hydroksyfyzodowego wobec enzymów trzustkowych była wyższa. Poziom hamowania elastazy trzustkowej wynosił 74,3% przy stężeniu 100  $\mu\text{M}$  badanego związku. Wyniki wykazały, że hydroksylowa pochodna kwasu fizodowego zastosowana w stężeniu 500  $\mu\text{M}$  hamowała działanie trypsyny w 29,7% [Proksa i wsp. 1994].

W 2012 roku równolegle z przygotowywaną rozprawą doktorską ukazała się praca dotycząca aktywności biologicznej związków otrzymanych z badanego *H. physodes*. Wyizolowane z *H. physodes* kwasy: fizodalowy, fizodowy, 3-hydroksyfyzodalowy oraz izofyzodowy poddano badaniu na szczurzych tymocytach - komórkach układu odpornościowego. W eksperymencie oceniano wpływ wymienionych wyżej depsydonów na proliferację, żywotność, produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) i potencjał błony mitochondrialnej (MMP). Uzyskane wyniki wykazały, że najsilniej na badane komórki



działał kwas fizyodalowy. Związek ten był aktywny w stężeniach niższych niż pozostałe metabolity wtórne. Spadek proliferacji tymocytów obserwowano w stężeniu 1 µg i 10 µg/dołek (kwas fizyodalowy) lub 10 µg/dołek (dla kwasu fizodowego i 3-hydroksyfizodowego). Wzrost stężenia kwasu izofizodowego powodował nieistotny statystycznie spadek proliferacji badanych komórek. Dla oceny żywotności komórek wykonano test z syntetycznym oktapeptydem CCK (CCK-8). Spośród badanych kwasów znaczący wzrost cytotoksyczności wystąpił w przypadku kwasu fizyodalowego (1 i 10 µg/dołek). Kwasy fizodowy i 3-hydroksyfizodowy działały słabiej (10 µg/dołek). Wzrastające stężenia kwasu izofizodowego nie wpływały na żywotność tymocytów. Badania wpływu depsydonów na produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) czy potencjał błony mitochondrialnej wykazały, że w obu przypadkach najsilniejszy wpływ na badane parametry miał kwas fizyodalowy (0,1, 1 i 10 µg/dołek), słabsze kwas fizodowy (10 µg/dołek). Obserwowano również, że wraz ze wzrostem produkcji ROS spadał potencjał błony mitochondrialnej (MMP). Ekspozycja tymocytów na wzrastające stężenia kwasu 3-hydroksyfizodowego i izofizodowego nie wpływała na poziom ROS w komórkach jak również na potencjał MMP. Wyniki przeprowadzonego eksperymentu sugerują, że toksyczny wpływ na badane komórki miał wzrastający poziom reaktywnych form tlenu i spadek mitochondrialnego potencjału błonowego, obserwowane w przypadku poddania tymocytów działaniu kwasu fizyodalowego i fizodowego [Pavlovic i wsp. 2013].

### 3.1.6. Kwas salazynowy

Kwas salazynowy, związek o strukturze depsydonu posiada aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus aureus*. Związek działał nieco słabiej wobec *Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella typhimurium*. Ponadto badany depsydon był aktywny wobec grzybów: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium notatum*, jednak w stężeniu 2-4-krotnie wyższym w porównaniu z badanymi bakteriami. Kwas salazynowy nie był aktywny wobec *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica*, *Streptococcus faecalis* [Candan i wsp. 2007]. Kwas salazynowy nie wpływał na *Mycobacterium aurum* szczep, którego wrażliwość na działanie antybiotyków jest podobna do *Mycobacterium tuberculosis* [Ingólfssdóttir i wsp. 1998]. Wyniki badań opublikowane w 2010 roku potwierdziły brak aktywności testowanego depsydonu na *M. tuberculosis* (MIC = 250 µg/ml) [Honda i wsp. 2010].

**Aktywność cytotoksyczna** kwasu salazynowego była testowana na limfocytach izolowanych ze szczurzej śledziny. Otrzymane w badaniach rezultaty świadczyły o wysokiej aktywności kwasu salazynowego, tylko 1,34 razy słabszej od zastosowanej referencyjnie kolchicyny [Correché i wsp. 2002]. Związek ten posiadał również właściwości apoptotyczne [Correché i wsp. 2004]. Aktywność kwasu salazynowego określono wobec ludzkich komórek MM98 (złośliwy międzybłoniak), A431 (rak sromu) oraz HaCaT (keratynocyty). Rezultaty świadczyły o niskiej toksyczności depsydonu wobec komórek nowotworowych, wyższej dla raka mezotelium niż sromu (MM98:  $IC_{50} = 159 \mu M$  i  $> 1,9 mM$ , w testach CV i NRU; A431:  $IC_{50} > 2,8 mM$  i  $> 1,9 mM$ , CV i NRU). Toksyczność kwasu salazynowego była znacznie wyższa dla ludzkich keratynocytów, jednak siła działania różniła się w zależności od typu zastosowanych testów (HaCaT:  $IC_{50} = 48 \mu M$  i  $907 \mu M$ , CV i NRU) [Burlando i wsp. 2009].

Badano również **neuroprotektoryjne** właściwości kwasu salazynowego. Eksperymenty obejmowały ocenę właściwości cytotoksycznych i antyoksydacyjnych związku. Otrzymane rezultaty wykazały niewielką toksyczność kwasu salazynowego wobec komórek gwiazdki (U373 MG). W najwyższym testowanym stężeniu (50  $\mu g/ml$ ) depsydon zmniejszał żywotność komórek do około 80% [De Paz i wsp. 2010].

**Właściwości przeciwutleniające** depsydonu badano stosując test ORAC (ang. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) oparty na pomiarze zmniejszania się poziomu utlenionej fluoresceiny pod wpływem stosowanego antyoksydanta. Uzyskane wyniki przedstawione jako równoważnik Troloxu (2,74  $\mu mol(TE)/mg$  próbki), potwierdziły przeciwutleniające właściwości związku. Następnie wykonano testy, które dowiodły ochronnego wpływu depsydonu na komórki narażone na działanie  $H_2O_2$ . Preinkubowane (24h) z różnymi stężeniami kwasu salazynowego komórki (U373 MG) poddawano następnie działaniu  $H_2O_2$ . Kwas salazynowy zwiększał przeżycie komórek, zmniejszając równocześnie poziom powstałych w komórkach reaktywnych pochodnych tlenu (ROS). Na podstawie otrzymanych wyników autorzy wnioskowali o potencjalnym zastosowaniu kwasu salazynowego w chorobach o podłożu neurodegeneracyjnym (choroba Alzheimera i Parkinsona) [De Paz i wsp. 2010].

Kwas salazynowy, podobnie jak kwas fazydowy, posiada zdolność **hamowania enzymów**. Związek ten blokuje integrzę HIV-1, co ma znaczenie w procesie poszukiwania leków do walki z nieulecznym jak dotąd zakażeniem wirusem HIV [Neamati 1997, Müller 2001].

Wyniki badań o charakterze *in vitro* wykazały, że kwas salazynowy w stężeniu 50 µg/ml hamował  $\alpha$ - oraz  $\beta$ -glukozydazę w 55,1% i 52,3%, odpowiednio. Obliczony parametr IC<sub>50</sub> wskazujący stężenie, przy którym aktywność enzymu  $\alpha$ - oraz  $\beta$ -glukozydazy blokowana była w 50% wynosił 18,1 i 13,8 µg/ml, odpowiednio [Verma i wsp. 2012].

### 3.1.7. Kwas usninowy

Kwas usninowy to żółty barwnik o strukturze dibenzofuranu, który występuje w wielu gatunkach porostów [Ingólfssdóttir 2002]. Związek istnieje w przyrodzie w formie dwóch enancjomerów: kwasu (+) i (-)-usninowego.

Aktywność biologiczna kwasu usninowego zaczęła wzbudzać zainteresowanie już w pierwszej połowie XX wieku. W 1946 roku Bargellini udowodnił, że związek ten działał na *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae* i *Bacillus subtilis*, ale nie wpływał na bakterie Gram-ujemne. Rok później wykazano, że wyizolowany z *Ramalina reticulata* kwas (+)-usninowy, hamował rozwój *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. Okazało się także, że prątki *M. tuberculosis avium* są bardziej odporne na użyty w doświadczeniu kwas usninowy niż *M. tuberculosis hominis*. W 1948 roku z porostu należącego do rodziny *Usneaceae*, wyizolowano, ewozynę (ang. *evosin*). Jak się okazało była to mieszanina kwasu ewernowego i usninowego oraz dwóch nieznanymi substancji, którą charakteryzowała wysoka aktywność wobec *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp. a także *M. tuberculosis*. Ewozynę wykorzystywano do leczenia chorób skóry m.in.: gruźlicy skóry, czyraków czy liszaju. Należy nadmienić, że znalazła ona zastosowanie w leczeniu nie tylko bakteryjnych zakażeń, lecz także w przypadku problemów skórnych pochodzenia grzybiczego (np. *Trichophyton* sp.) [Bustinza 1952, Ahmadjian i Hale 1977].

W latach 80. badano działanie kwasu usninowego wobec bakterii wywołującej próchnicę: *Streptococcus mutans*. Okazało się, że testowany szczep, był bardziej wrażliwy na działanie kwasu (+)-usninowego niż (-)-usninowego, a prawoskrętny izomer kwasu usninowego, dodany do płynu do płukania ust w stężeniu 1% zapobiegał powstawaniu próchnicy i kamienia nazębnego [Ingólfssdóttir 2002, Cocchietto i wsp. 2002]. W innym doświadczeniu kwas usninowy hamował wzrost wzorcowych oraz klinicznych szczepów *Staphylococcus* sp., *Enterococcus* sp., a także niektórych bakterii beztlenowych [Lauterwein i wsp. 1995]. Rezultaty prowadzonych prac dowiodły, że kwasy (+)- i (-)-usninowy były aktywne wobec *Mycobacterium tuberculosis*

i *Mycobacterium tufo* [Cocchietto i wsp. 2002, Krishna i Venkataramana 1992, Tay i wsp. 2004]. Ponadto kwas (+)-usninowy działał na *Mycobacterium aurum* silniej (MIC = 32 µg/ml) od ryfampicyny, streptomycyny i izoniazydu (MIC = 2,0, 0,25 i 0,03 mg/ml, odpowiednio) [Ingólfssdóttir 2002]. Perry i wsp., stosując metodę dyfuzyjno-krażkową, przebadła ponad 60 gatunków porostów występujących na obszarze Nowej Zelandii oraz kilka otrzymanych z nich związków. Jedną z badanych substancji był kwas usninowy, który okazał się aktywny wobec *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* [Perry i wsp. 1999]. Testowano również aktywność kwasu (+)-usninowego i jego soli sodowej na antybiotykooporne szczepy kliniczne *Staphylococcus aureus* (MRSA - ang. *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) oraz *Enterococcus* sp. (VRE - ang. *vancomycin-Resistant Enterococci*). Wyniki wskazywały na skuteczność kwasu (+)-usninowego i jego soli sodowej wobec opornych na metycylinę, klinicznych szczepów *S. aureus* (MRSA) oraz opornych na wankomycynę *Enterococcus* sp. (VRE). Okazało się, że sól sodowa działała silniej niż kwas usninowy. Tłumaczono to różnicą w rozpuszczalności badanych związków [Elo i wsp. 2007]. Kwas (-)-usninowy hamował wzrost rzęsistka pochwowego (*Trichomonas vaginalis*) oraz grzybowych patogenów roślin [Wu i wsp. 1995, Ingólfssdóttir 2002]. Testowano również przeciwwirusowe właściwości kwasów usninowych. Wyniki wskazywały, że silniejsze właściwości przeciwwirusowe wobec wirusa Epsteina-Barr, wykazywał kwas (+)-usninowy [Ingólfssdóttir 2002]. Badano działanie kwasu (+)-usninowego na promastygotyczne formy trzech szczepów pierwotniaków z rodzaju *Leishmania*. Podanie doustne i podskórne kwasu usninowego myszom zainfekowanym *Leishmania amazonensis* nie przyniosło efektu leczniczego. Natomiast po podaniu do chorobowo zmienionych tkanek nastąpił znaczący spadek ilości pasożytów [Fournet i wsp. 1997].

**Aktywność przeciwnowotworową** kwasu usninowego badano już w latach 70. XX wieku. Jednym z pierwszych eksperymentów testujących aktywność przeciwnowotworową kwasu usninowego przeprowadzili Kupchan i Kopperman. Rezultaty badań wskazywały na działanie kwasu (-)-usninowego u myszy z wszczepionym rakiem płuc Lewisa [Kupchan i Kopperman 1975]. Wyniki prowadzonych później badań, wykazały, że kwas usninowy wpływał na wzrost i rozwój różnego typu komórek, m.in. udowodniono antyproliferacyjne działanie kwasu (+)-usninowego na keratynocyty ludzkie (HaCaT; IC<sub>50</sub>=2,1 µM) [Kumar i Müller 1999a]. W innych badaniach oceniana w teście z fioletem krystalicznym (CV) i czerwiecią fenolową (NRU) cytotoksyczność kwasu (+)-usninowego dla keratynocytów ludzkich

(HaCaT), była niższa i wartość  $IC_{50}$  wynosiła odpowiednio 35 i 76  $\mu M$  [Burlando 2009]. Opublikowano również wyniki badań *in vitro*, w których prawoskrętny izomer kwasu usninowego, redukował liczbę komórek linii K-562 (białaczka), HEC-50 (rak endometrium), natomiast izomer lewoskrętny był aktywny wobec komórek P388 i L1210 (mysia białaczka) [Müller 2001, Ingólfssdóttir 2002]. Cardarelli i wsp. potwierdzili aktywność kwasu usninowego na linii komórek białaczki (K-562) i raka endometrium (HEC-50; Ishikawa). Okazało się, że kwas usninowy podany na komórki w stężeniu 50  $\mu g/ml$  hamował proliferację obu typów testowanych linii nowotworowych, lecz z różnym nasileniem (40-70%) [Cardarelli i wsp. 1997].

Kwas (+)-usninowy, rozpuszczony w 10% roztworze HP $\beta$ CD (2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstryny), został także przetestowany wobec komórek raka piersi (T47D), trzustki (Panc-1) oraz prostaty (PC-3). Otrzymane rezultaty wskazywały na wysoką aktywność badanego związku. Kwas usninowy zmniejszał żywotność komórek wymienionych wyżej linii o 50%, odpowiednio w stężeniu  $IC_{50} = 2,9; 4,3$  i  $8,2 \mu g/ml$ . Wykonane dodatkowe badania wykluczyły toksyczny wpływ zastosowanego rozpuszczalnika na komórki [Kristmunndsdóttir i wsp. 2005].

Badano wpływ kwasu (+) i (-)-usninowego na proliferację komórek raka piersi (T-47D) oraz raka trzustki (Capan-2). Otrzymane w teście ze znakowaną tymidyną, rezultaty wskazywały, że niezależnie od typu badanego izomeru kwasu usninowego, obserwowano hamowanie syntezy DNA w obu typach komórek, a siłę tego działania charakteryzował parametr  $IC_{50} = 4,2$  i  $4,0 \mu g/ml$  (T47D) oraz  $5,3$  i  $5,0 \mu g/ml$  (Capan-2), odpowiednio dla kwasu (+) i (-)-usninowego [Einarsdóttir i wsp. 2010].

W eksperymencie opisanym przez Mayer i wsp., komórki raka piersi (MCF7 i MDA-MB-231) były ekspozowane na działanie kwasu usninowego. Związek okazał się toksyczny wobec badanych linii komórek ( $IC_{50} \approx 20 \mu M$ ). Badany w tym samym eksperymencie wpływ kwasu usninowego na komórki raka płuc (H1299) był porównywalny z aktywnością wobec komórek raka piersi [Mayer i wsp. 2005].

Kolejne eksperymenty dowodzące działania kwasu (+)- i (-)-usninowego na komórki nowotworowe prowadzili Bazin i wsp. Do badań nad cytotoksycznością obu enancjomerów wykorzystano sześć linii komórkowych, w tym dwie mysie (L1210 - białaczka; 3LL - rak płuca Lewis'a) oraz cztery ludzkie (K-562 - białaczka; DU145 - rak prostaty; MCF7 - rak piersi; U251 - glejak). Uzyskane wyniki wykazały, że związkiem o wyższej aktywności w stosunku do większej liczby badanych komórek był kwas (-)-usninowy, dla którego wartość  $IC_{50}$  wobec badanych komórek wahała się od 17,4 do 51,7

$\mu\text{M}$  (dla kwasu (+)-usninowego od 19,5 do 105,4  $\mu\text{M}$ ). Izomer prawoskrętny działał nieco silniej niż izomer lewoskrętny tylko na dwie linie: 3LL i U251. W tym przypadku 50% komórek przeżywało przy stężeniu 19,5 i 23,0  $\mu\text{M}$  oraz 19,7 i 35,1  $\mu\text{M}$ , odpowiednio dla kwasu (+)- i (-)-usninowego [Bazin i wsp. 2008].

Aktywność cytotoksyczną kwasu (+)-usninowego badano również (test MTT) na komórkach raka: jajnika (A2780), szyjki macicy (HeLa), piersi (MCF-7 i SK-BR-3), okrężnicy (HT-29), jelita grubego (HCT-116 P53<sup>+/+</sup> i HCT-116 P53<sup>-/-</sup>), białaczki promielocytowej (HL-60), ludzkiej linii nowotworowej białaczki limfoblastoidalnej T (Jurkat). Okazało się, że związek ten był w różnym stopniu aktywny wobec wszystkich wymienionych linii komórek nowotworowych ( $48,5 < \text{IC}_{50} < 199,2 \mu\text{M}$ ). Najsilniejsze działanie kwasu (+)-usninowego odnotowano na komórki białaczki promielocytowej ( $\text{IC}_{50} = 48,5 \mu\text{M}$ ) oraz raka jajnika ( $\text{IC}_{50} = 75,9 \mu\text{M}$ ) [Bačkorova i wsp. 2011].

Z innych badań, w których uzyskane wyniki porównywano z etopozydem wynikało, że kwas usninowy działał toksycznie na komórki raka okrężnicy (HCT-116;  $\text{IC}_{50} = 17,7 \mu\text{M}$ ), raka szyjki macicy (HeLa;  $\text{IC}_{50} = 23,7 \mu\text{M}$ ) oraz linie nowotworowe komórek raka piersi (MCF-7;  $\text{IC}_{50} = 75,7 \mu\text{M}$ ). Siła działania była większa niż etopozydu dla linii komórek nowotworowych HCT-116 i HeLa, natomiast porównywalna z nim dla komórek MCF-7. Pochodna dibenzofuranu, w stężeniach 2,5-100  $\mu\text{M}$  nie wpływała na żywotność komórek mysich fibroblastów embrionalnych [Brisdelli i wsp. 2012].

Działanie kwasu (+)-usninowego testowano na komórkach raka sromu (A431) oraz nowotworu mezotelium (MM98) (testy z fioletem krystalicznym - CV i czerwienią fenolową - NRU). Okazało się, że badany dibenzofuran był aktywny wobec obu typów nowotworów ( $\text{IC}_{50} = 39 \mu\text{M}$ , CV i  $72 \mu\text{M}$ , NRU oraz  $\text{IC}_{50} = 23 \mu\text{M}$ , CV i  $64 \mu\text{M}$ , NRU; odpowiednio) [Burlando i wsp. 2009].

Ivanova i wsp. określili właściwości cytotoksyczne kwasu usninowego wobec komórek nowotworu szyjki macicy (HeLa) oraz antyproliferacyjne działanie kwasu usninowego na komórki mysich fibroblastów (L-929) i ludzkiej białaczki (K-562). W każdym przypadku odnotowano aktywność badanego kwasu usninowego, a wartość  $\text{IC}_{50}$  wynosiła: 5,1; 1,4 i 5,5  $\mu\text{g/ml}$  odpowiednio dla wymienionych typów komórek [Ivanova i wsp. 2010].

Próbowano również ustalić mechanizm działania przeciwnowotworowego kwasu usninowego, badając jego wpływ na aktywację białka p53 (supresor nowotworowy) w komórkach raka piersi MCF-7. Okazało się, że kwas usninowy nie wpływał na poziom białka p53, co sugeruje inny niż zależny od tego transkrypcyjnego czynnika sposób

działania przeciwnowotworowego [Mayer i wsp. 2005]. W innym eksperymencie testowano także wpływ kwasu usninowego na mikrotubule komórek raka piersi (MCF7) i raka płuc (H1299). Okazało się, że badany dibenzofuran w zastosowanym stężeniu (29  $\mu\text{M}$ ), nie powodował zmian w morfologii mikrotubul, a działanie przeciwnowotworowe miało inne podłoże [O'Neill i wsp. 2010].

Dostępne w piśmiennictwie wyniki dowodzą, że kwas usninowy posiada działanie antymitotyczne, co stwierdzono oceniając wpływ związku na wzrost *Fusarium moniliforme*. Już w bardzo niskich stężeniach (1  $\mu\text{g/ml}$ ) następowało zahamowanie wzrostu grzyba (o 9 %). Najwyższe testowane stężenie (100  $\mu\text{g/ml}$ ) hamowało jego wzrost w 51% [Cardarelli i wsp. 1997, Müller 2001].

Rezultaty innych badań wykazały, że kwas usninowy jest inhibitorem etapu promocji nowotworów wywołanych, posiadającym onkogenny potencjał wirusem Epsteina-Barr. Okazało się, że enancjomer prawoskrętny posiadał wyższą aktywność od odmiany lewoskrętnej (kwas (+)-usninowy  $\text{IC}_{50}=1,0 \mu\text{M}$ ) [Yamamoto i wsp. 1995, Müller 2001].

W piśmiennictwie dostępne są informacje na temat **antyoksydacyjnego** działania kwasu usninowego. Przedstawione wyniki wskazywały na niską aktywność antyoksydacyjną badanego dibenzofuranu. Brisdelii i wsp. prowadzili eksperymenty, w których dowiedli, że kwas usninowy w stężeniu 0,8 mM, nie wykazywał istotnej zdolności redukcji rodnika DPPH $\cdot$ . Związek ten w stężeniu 50  $\mu\text{M}$ , nie chronił komórek HeLa (rak szyjki macicy) przed toksycznym działaniem RFT, jednak nie zwiększał komórkowego poziomu RFT [Brisdelli i wsp. 2012].

Zbadano również, że u szczurów kwas usninowy zwiększał poziom enzymów stanowiących barierę antyoksydacyjną organizmu: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydazy glutationu (GPx) oraz glutationu (GSH) i zmniejsza ilość katalazy (CAT) i reduktazy glutationowej (GR). Ponadto, kwas usninowy zmniejszał peroksydację lipidów w żołądku badanych szczurów i infiltrację tkanek przez neutrofile. Otrzymane wyniki dowodzą, że kwas usninowy posiadał działanie gastroprotekcyjne na doświadczalne wrzody indukowane indometacyną. Autorzy przypuszczają, że ochronny wpływ pochodnej dibenzofuranu na śluzówkę żołądka może być związany ze zdolnością kwasu usninowego do zmniejszania stresu oksydacyjnego oraz nacieku śluzówki żołądka przez neutrofile [Odabasoglu i wsp. 2006].

Kwasu usninowy hamował  $\alpha$ - oraz  $\beta$ -glukozydazę w stężeniu 50  $\mu\text{g/ml}$  w 56,3% i 52,9%, odpowiednio. Stężenie kwasu usninowego hamujące aktywność enzymu w 50%

wyniosło 17,7  $\mu\text{g/ml}$  dla  $\alpha$ -glukozydazy oraz 18,9  $\mu\text{g/ml}$  dla  $\beta$ -glukozydazy [Verma i wsp. 2012].

Właściwości **neuroprotektcyjne** kwasu usninowego przetestował De Paz i wsp. Pochodna dibenzofuranu wykazywała aktywność antyoksydacyjną (test ORAC 2,95  $\mu\text{mol}$  (TE)/mg próbki) i działała ochronnie na komórki gwiazdziaka poddane działaniu  $\text{H}_2\text{O}_2$ , zwiększając ich żywotność oraz powodując zmniejszenie poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach. Aktywność cytotoksyczną kwasu usninowego na badane U373 MG odnotowano już w stężeniu 25  $\mu\text{g/ml}$  (zmniejszyła przeżywalność komórek o 20%) [De Paz i wsp. 2010].

Ponadto prowadzone eksperymenty udowodniły działanie **przeciwzapalne**, **przeciwgorączkowe** i **przeciwbólowe** kwasu usninowego [Ingólfssdóttir 2002]. Przeciwgorączkowe właściwości były testowane na myszach po podaniu podskórnym 50 mg/kg LPS (lipopolisachryd). Otrzymane wyniki wskazywały na działanie obniżające podwyższoną temperaturę ciała przez kwas usninowy przy podaniu doustnym, w dawce 100 i 300 mg/kg. Kwas usninowy nie wykazywał działania hipotermicznego po podaniu *p.o.* w dawce nawet 300 mg/kg. Doświadczenie, w którym badano przeciwbólowe właściwości kwasu usninowego wykazało, że związek ten w teście z użyciem kwasu octowego był skuteczny po podaniu *p.o.* w stężeniu 30 i 100 mg/kg i zmniejszył odczuwanie bólu w ponad 50%, w prównaniu z kontrolą. Rezultat ten potwierdziły również wyniki testu ściskania ogona, w którym kwas usninowy działał porównywalnie z aminofenazonem podanym doustnie w dawce 50 mg/kg [Okuyama i wsp. 1995]. O przeciwzapalnym działaniu kwasu usninowego świadczą wyniki badań, które wykazały, że kwas (+)-usninowy posiadał zdolność hamowania syntezy leukotrienów  $\text{B}_4$  ( $\text{IC}_{50}$  42  $\mu\text{M}$ ). [Kumar i Müller 1999]. Ponadto w badaniach na zwierzętach (szczury) wykazano, że kwas usninowy posiada istotne właściwości gastroprotektcyjne. Otrzymane wyniki wskazywały, że po podaniu doustnym (w dawkach: 25, 50, 100 i 200 mg/kg), kwas usninowy widocznie zmniejszał stopień uszkodzeń śluzówki żołądka indukowanych indometacyną. Obserwowany efekt leczniczy był silniejszy od wywołanego podaniem ranitydyny ( $\text{H}_2$ -bloker) [Odabasoglu i wsp. 2006].

W badaniach prowadzonych przez Rancan i wsp. określono właściwości **fotochromne** kwasu usninowego, których miarą był wyznaczony wskaźnik ochrony przeciwśłonecznej (ang. *UV protection factor*). W tym celu niewielki fragment skóry pleców pięciu ochotników, smarowano roztworem kwasu usninowego ( $2,5 \times 10^{-2}$  M w glikolu propylenowym i chloroformie 1:1). Stężenie związku na powierzchni skóry



wynosiło 0,04 mg/cm<sup>2</sup>. Jako kontrolę stosowano preparat Nivea sun Spray LSF 5. Następnie przez 15 min skórę naświetlano promieniowaniem o długości 295 nm i 315-340 nm. Okazało się, że wyznaczony w eksperymencie współczynnik ochrony skóry był niemal identyczny dla kwasu usninowego i preparatu Nivea (4,1 i 4,2; odpowiednio). Oceniano też w testach *in vitro*, działanie kwasu usninowego jako filtr UV. Zawiesinę komórek pokrytą warstwą badanej substancji poddawano działaniu promieniowania UV i za pomocą metody z użyciem błękitu trypanowego oceniano poziom przeżywalności komórek. Ponieważ wyniki testu są odzwierciedleniem stanu błony komórkowej, dlatego czynnik obliczany na jego podstawie to wskaźnik ochrony błony (MPF ang. *membrane protection factor*). Dla substancji referencyjnej, którą był metoksycynamonian oktylu (OMC), MPF wynosił 3,2 (UVB), natomiast dla kwasu usninowego był wyższy (4,5) [Rancan i wsp. 2002].

Wyniki wielu badań, zgodnie z tym jak przedstawiono wyżej, wskazują na ciekawe właściwości biologiczne kwasu usninowego. Niestety prowadzone doświadczenia ujawniły jego hepatotoksyczne oraz alergogenne właściwości [Ingólfssdóttir 2002; Galanty 2012]. Toksyczność kwasu usninowego jest ważnym zagadnieniem, gdyż związek ten wchodzi aktualnie w skład dostępnych w internecie suplementów diety wspomagających odchudzanie. Z danych piśmiennictwa wiadomo, że Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) zarejestrowała 21 zgłoszeń dotyczących pojawienia się zaburzeń funkcjonowania wątroby (w tym jednej śmierci), po kuracji czystym kwasem lub suplementami diety zawierającymi kwas usninowy [Guo i wsp. 2008, Sonko i wsp. 2011, Sahu i wsp. i wsp. 2012]. Z tego powodu kwas usninowy został wytypowany w USA przez Narodowy Program Toksykologiczny (National Toxicology Programm, NTP), do szczegółowych badań [Sonko i wsp. 2011]. Eksperymenty mające ustalić toksyczne właściwości kwasu usninowego prowadzono w różnych warunkach i modelach badawczych (*in vitro* oraz *in vivo*), a większość z przeprowadzonych badań dotyczyła wpływu kwasu usninowego na wątrobę.

Pierwsze dane na temat toksyczności kwasu usninowego pochodzą już z lat 50. ubiegłego wieku. Podawany wówczas podskórnie kwas usninowy samicom świnek morskich z gruźlicą (20 mg/zwierzę przez 6 dni, a następnie 10 mg/zwierzę przez 24 dni), powodował słabszy przyrost wagi u zwierząt, utrzymujący się jeszcze przez 2 tygodnie po zaprzestaniu kuracji [Marshak i wsp. 1950]. W innych, przeprowadzonych dużo później badaniach kwas usninowy podawano dootrzewnowo zwierzętom laboratoryjnym przez pięć dni, w dawce 50 lub 200 mg/kg na dzień. Po tym czasie zbadano krew gryzoni a ich

wątroby poddano badaniu histopatologicznemu. Uzyskane wyniki wskazywały, że po pięciodniowym podawaniu zwierzętom kwasu (+)-usninowego poziom enzymów wątrobowych (AST, ALT) mieścił się w garnicach normy, jednak badanie mikroskopowe wycinka wątroby pokazało, że mitochondria komórek i retikulum endoplazmatyczne są powiększone, zwłaszcza przy stosowaniu wyższej z badanych dawek. Częścią eksperymentu były również testy *in vitro* prowadzone na izolowanych hepatocytach szczurzych i izolowanych z wątroby mitochondriach. Eksperymenty wykonane na hepatocytach wykazały zależny od dawki (0,01 mM; 0,1 mM; 1,0 mM) wzrost uwalniania transaminaz (ALT, AST), dialdehydu malonowego (MDA; wskaźnik peroksydacji lipidów) oraz spadek poziomu glutationu (GSH; ochrona przed stresem oksydacyjnym). Podobne skutki co 1,0 mM roztwór kwasu usninowego wywoływał CCl<sub>4</sub>, który z uwagi na hepatotoksyczne właściwości zastosowano jako substancję referencyjną. Połączenie kwasu usninowego i czterochlorku węgla potęgowało stopień cytotoxyczności. Kwas (+)-usninowy, wraz ze wzrostem dawki, stymulował proces oddychania komórkowego w izolowanych z wątroby szczurów mitochondriach, a także aktywność ATP-azy. Rezultaty prowadzonych eksperymentów, pozwalają wnioskować o mechanizmie hepatotoksycznego działania, polegającym na oddziaływaniu kwasu usninowego lub jego metabolitów na integralność błony komórkowej mitochondriów i zaburzenia funkcji tych komórkowych struktur [Pramyothin i wsp. 2004].

Określony został wpływ kwasu usninowego w różnych stężeniach, na funkcje mitochondriów oraz żywotność pierwotnych hepatocytów szczurzych, wykorzystując w tym celu metodę ze znakowaną stabilnym izotopem <sup>13</sup>C glukozą. Rezultaty badań wykazały, że związek działał w sposób zależny od czasu inkubacji i zastosowanej dawki. Obliczona wartość IC<sub>50</sub> wynosiła 29, 22, 14 i 2 μM odpowiednio dla inkubacji trwającej 2, 4, 6 i 24 godziny. Badany w tym samym eksperymencie poziom komórkowego ATP ulegał wyczerpaniu w zależności od czasu działania i dawki kwasu usninowego. Obliczona wartość IC<sub>50</sub>, wskazująca stężenie kwasu usninowego, powodujące spadek zawartości ATP w komórkach o połowę, wynosiła odpowiednio: 7, 6 i 1 μM dla 2, 4 i 24-godzinnej inkubacji. Po narażeniu komórek na działanie kwasu usninowego w stężeniu 1 i 5 μM, zauważalne było zwiększenie produkcji <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, które jednak spadało gdy stężenie ksenobiotyku osiągało 10 μM. Zwiększenie wytwarzania dwutlenku węgla wskazywało, że niskie dawki kwasu usninowego powodują przesunięcie metabolizmu komórkowego w stronę oksydatywnej fosforylacji, umożliwiającej kompensowanie spadku poziomu ATP, wywołane obecnością w komórkach kwasu usninowego. Sugeruje

to występowanie progu tolerancji ( $5 \mu\text{M}$ ), powyżej którego komórka nie radzi sobie z toksycznym efektem kwasu usninowego. Ponadto, wysokie stężenie kwasu usninowego ( $10 \mu\text{M}$ ), powodowało również zmniejszenie glukoneogenezy [Sonko i wsp. 2011].

W innym badaniu do określenia toksyczności wykorzystano mysie hepatocyty z pierwotnej hodowli, które poddano działaniu kwasu usninowego w stężeniu  $5 \mu\text{M}$ . Po trwającej 16 godzin inkubacji następowała śmierć 98% komórek, raczej na skutek nekrozy niż apoptozy. Niekorzystne działanie kwasu usninowego polegało także, na hamowaniu i rozprzęgnięciu transportu elektronów w mitochondriach oraz indukowaniu zjawiska stresu oksydacyjnego przez generowanie wolnych rodników, co miało duży wpływ na zjawisko hepatotoksyczności badanego związku [Guo i wsp. 2008].

Badania wpływu kwasu (+)-usninowego na stan zdrowia domowych owiec przeprowadził Dailey i wsp. Wsunął on hipotezę, że zwierzęta chorują po zjedzeniu porostu *Xanthoparmelia chlorochroa*, zawierającego kwas usninowy. Eksperyment zakładał by owce spożywały 323-776 mg/kg kwasu usninowego na dzień (maksymalnie przez 7 dni). Po tym czasie, w zachowaniu zwierząt odnotowywano takie objawy kliniczne jak: senność, jadłowstręt czy zaburzenia trawienia. Ponadto, poziom kinazy kreatyniny, aminotransferazy asparaginianowej i dehydrogenazy mleczanowej był znacznie podwyższony u wykazujących objawy zatrucia owiec. Średnia dawka śmiertelna kwasu usninowego dla owiec wahała się od 485 do 647 mg/kg. Pośmiertne badania zdechłych owiec wykazały znaczne zmiany występujące w mięśniach szkieletowych [Dailey i wsp. 2008].

Piśmiennictwo donosi o 7 przypadkach hepatotoksycznego działania kwasu usninowego po zażyciu suplementu diety LipoKinetix (Syntrax, Cape Girardeau, MO, USA). Preparat zawierał: 100 mg kwasu usninowego oraz chlorowoderek norefedryny, chlorowoderek johimbiny, kofeinę i był zalecany w dawce 1-2 kapsułek 3 razy dziennie. Stosowany w kuracjach odchudzających specyfik spowodował u pacjentów zapalenie wątroby, które ustąpiło po odstawieniu preparatu [Favreau i wsp. 2002]. Opublikowano też opis 2 innych przypadków pacjentów z zapaleniem wątroby, które rozwinęło się na skutek zażywania tego samego preparatu. Jeden z nich wymagał przeprowadzenia przeszczepu wątroby. Wiadomo, że po tych doniesieniach firma produkująca preparat usunęła z jego składu kwas usninowy i produkowała go pod nazwą AdipoKinetix [Guo i wsp. 2008].

Inne prace dotyczyły skutków ubocznych działania preparatu UCP-1 (BDC Nutrition, Richmond, KY). Produkt przeznaczony do stosowania w kuracjach

odchudzających zawierał w jednej kapsułce: 150 mg kwasu usninowego, 525 mg L-karnityny i 1050 mg pirogronianu wapnia. Sanchez i wsp. doniósł o wystąpieniu objawów hepatotoksyczności u dwóch pacjentów, zażywających preparat przez okres 3 miesięcy w zalecanych dawkach (3 razy 3), w tym o jednym przypadku ostrej niewydolności wątroby wymagającej natychmiastowego przeszczepu [Sanchez i wsp. 2006].

Pomimo szerokiej aktywności biologicznej kwasu usninowego, stowanie go wewnątrznie w terapii różnych chorób, jest dyskusyjne z uwagi na jego właściwości hepatotoksyczne. Interesujące właściwości związku skłaniają jednak do badań nad sposobami zmniejszenia jego toksycznego działania. Celem prac prowadzonych przez Da Silva-Santos i wsp. było zbadanie przeciwnowotworowej aktywności kwasu usninowego umieszczonego w nanokapsułkach, sporządzonych z kopolimerów kwasu mlekowego i glikolowego (PGLA). Badania przeprowadzono na myszach, z wszczepionymi komórkami Sarcoma-180. Leczenie zapoczątkowano 24 godziny po wszczepieniu komórek guza. Dzienna dawka czystego kwasu usninowego podawanego *i.p.* oraz kwasu usninowego w nanokapsułkach *p.o.* wynosiła 15 mg/kg i była podawana przez 7 dni. Po tym czasie zwierzęta uśpiono i rozpoczęto badania hematologiczne, a także ocenę stanu narządów wewnętrznych. Wszystkie myszy przeżyły eksperyment, a w ich zachowaniu nie zauważono żadnych zmian, w porównaniu z okresem przed zastosowaniem leczenia. Terapia kwasem usninowym pozwoliła na zmniejszenie szybkości rozwoju a także rozmiaru i masy guza, w porównaniu ze zwierzętami, u których nie zastosowano leczenia. Ponadto, guz reagował lepiej na leczenie kwasem usninowym w nanokapsułkach, a stopień zahamowania rozwoju nowotworu wynosił 69,7% dla nanokapsułek i 43,3% dla czystego związku, co potwierdzono badaniami histopatologicznymi. W eksperymencie oceniono także zmiany w morfologii wątroby u zwierząt leczonych zawiesiną kwasu usninowego oraz kwasem w nanokapsułkach. Okazało się, że stopień uszkodzenia badanego organu i stopień nacieku limfoidalnego, były większe w przypadku gryzoni, którym podawano kwas usninowy w zawieszynie. Ani nerki ani śledziona nie wykazywały uszkodzeń. Rezultaty badań hematologicznych ukazały, że kwas usninowy podany w obu badanych formach, nie wpływał na profil hematologiczny krwi. Na siłę aktywności związku miało najprawdopodobniej wpływ mniejsze rozdrobnienie, charakterystyczne dla nanokapsułek, co zmienia w korzystny sposób biodostępność substancji badanej. Toksyczność podostra kwasu usninowego była badana przez 15 dni po aplikowaniu zwierzętom czystego kwasu usninowego lub nanokapsułek z kwasem usninowym,

w dawce 15 mg/kg. Uzyskane wyniki wskazywały, że nekrozę komórek wątroby powodował zarówno kwas usninowy podawany w zawieszynie jak i w postaci nanokapsulek. Zauważone zmiany w wątrobie zwierząt leczonych zawiesziną kwasu usninowego były znacznie większe. Rezultaty przeprowadzonych badań sugerują, że odpowiednia forma podania kwasu usninowego może zdecydowanie zmniejszyć jego szkodliwość. Jest to korzystne, gdyż dzięki temu coraz bardziej realne staje się wprowadzenie kwasu usninowego do leczenia m.in. w terapii nowotworów [Da Silva-Santos i wsp. 2006].

Dostępna jest również praca badająca właściwości kwasu usninowego podawanego w polimerowych mikrokapsułkach. Wiadomo, że taka postać leku, może zwiększyć aktywność terapeutyczną badanej substancji przy równoczesnym zmniejszeniu działań niepożądanych. W przypadku kwasu usninowego mikroenkapsulacja nie miała znaczenia dla kinetyki kwasu usninowego i nie zmieniała jego cytotoksyczności *in vitro* wobec komórek raka wątroby (Hep-2), natomiast powodowała wzrost przeciwnowotworowego działania związku o 21% (badania *in vivo* na mysim mięsaku-180). Wykonane eksperymenty świadczą o korzystnym wpływie procesu mikrokapsułkowania kwasu usninowego w kontekście skuteczniejszej chemioterapii [Ribeiro-Costa i wsp. 2004].

## 3.2. Aktywność biologiczna wyciągów z badanych porostów

### 3.2.1. *Hypogymnia physodes* i *Parmelia sulcata*

Aktywność **przeciwdrobnoustrojową** metanolowych wyciągów z *H. physodes* i *P. sulcata* oceniano metodą z resazuryną. Działanie wyciągu badano na 29 typach mikroorganizmów (15 szczepach bakteryjnych - obejmujących szczepy wzorcowe i kliniczne, 10 gatunkach grzybów strzępkowych i 4 drożdżoidalnych). W zależności od grupy testowanych drobnoustrojów, aktywność różniła się. Badania wykazały, że *H. physodes* charakteryzuje się silniejszą niż *P. sulcata* aktywnością przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą. Porost *H. physodes* wykazywał najwyższą aktywność wobec *Bacillus* sp. (MIC =  $7,81 \times 10^{-2}$  do  $3,91 \times 10^{-2}$  mg/ml), *Enterococcus faecalis* (MIC =  $7,81 \times 10^{-2}$  do 5,0 mg/ml), *Staphylococcus aureus* (MIC =  $3,91 \times 10^{-2}$  do  $3,13 \times 10^{-1}$  mg/ml) i *Pseudomonas aeruginosa* (MIC =  $6,25 \times 10^{-1}$ ). *P. sulcata*, porównywalnie z *H. physodes* działała na szczepy *Bacillus* sp., *S. aureus* i *P. aeruginosa*. Wyciągi metanolowe z *P. sulcata* i *H. physodes* działały słabiej przeciwgrzybiczo niż przeciwbakteryjnie.

Porost *H. physodes* wykazywał szczególnie wysoką aktywność, silniejszą od flukonazolu, wobec szczepu wzorcowego *Aspergillus niger* (MIC=9,83×10<sup>-3</sup> i 6,25×10<sup>-2</sup> mg/ml dla wyciągu i flukonazolu, odpowiednio). Aktywność wobec szczepu klinicznego tego gatunku grzyba była znacznie niższa (MIC = 5,0 i 5,0×10<sup>-1</sup> mg/ml dla wyciągu metanolowego z *H. physodes* i flukonazolu, odpowiednio). Wyciąg metanolowy z *P. sulcata* działał najsilniej przeciwgrzybiczo na *Aspergillus fumigatus* MIC < 9,83×10<sup>-3</sup>. Wykazane w badaniach minimalne stężenie hamujące rozwój grzybów wahało się dla omawianych wyciągów z obu gatunków grzybów od 9,83×10<sup>-3</sup> do 10 mg/ml [Mitrović i wsp. 2011].

Aktywność **cytotoksyczna** wyciągów acetonowych z *P. sulcata* była badana na komórkach FemX oraz LS174 (komórki czerniaka i raka okrężnicy). Otrzymane wyniki świadczyły o silnym działaniu wyciągu (IC<sub>50</sub> = 18,44 µg/ml dla FemX i 22,95 µg/ml dla LS174). Badane równocześnie ekstrakty z *P. caperata* i *P. saxatilis* były jeszcze bardziej aktywne (IC<sub>50</sub> od 9,55 do 17,48 µg/ml) [Kosanić i wsp. 2012].

W drugiej połowie 2012 roku opublikowano wyniki badań nad właściwościami cytotoksycznymi metanolowego wyciągu z *H. physodes*. Prowadzone eksperymenty dotyczyły wpływu wyciągu na żywotność komórek raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231 za pomocą testów MTT i ATP. Oceniono wpływ ekstraktu na występowanie w komórkach zjawiska apoptozy, co określano za pomocą badania rozszczepiania cytokeratyny 18 przez kaspazę 3 wykrywanego za pomocą ciała monoklonalnego M30. Wyniki przeprowadzonych badań wskazywały (test MTT) na właściwości cytotoksyczne wyciągu, wobec badanych linii komórkowych (IC<sub>50</sub> = 50 i 44 µg/ml) po 72 godzinnej inkubacji. Pod wpływem wyciągu metanolowego z *H. physodes*, w sposób zależny od dawki wzrastał poziom wewnątrzkomórkowego ATP w obu typach badanych linii komórek (25-100 µg/ml). Zjawisko apoptozy badano mierząc w komórkach poziom markera programowanej śmierci komórki - antygeny M30. Rezultaty wykazały, że wyciąg metanolowy w stężeniu 100 µg/ml po 72-godzinnej inkubacji wywoływał apoptozę w komórkach MCF-7 natomiast nie wpływał w ten sposób na komórki MDA-MB-231. Analiza obrazu pod mikroskopem fluorescencyjnym wykazała, że wyciąg metanolowy spowodował fragmentację jądra w komórkach MCF-7, natomiast w komórkach MDA-MB-231 nie wywołał podobnych zmian. Obserwacja ta potwierdza, że zjawisko apoptozy dotyczyło komórek MCF-7. Zbadano także właściwości genotoksyczne wyciągu na komórkach limfocytów ludzkich, stosując test aberacji chromosomalnych oraz test mikrojądrowy. Uzyskane wyniki dowiodły,

że genotoksyczne działanie wyciągu występowało przy relatywnie wysokich stężeniach (> 125 µg/ml), w porównaniu z jego cytotoksyczną aktywnością. Rezultaty eksperymentu wskazują, że *H. physodes* może być źródłem substancji o interesujących terapeutycznych właściwościach [Ari i wsp. 2012].

Testowano również aktywność **antyoksydacyjną** wyciągów metanolowych otrzymanych metodą 24-godzinnej maceracji plech *H. physodes* lub *P. sulcata*. Wykazano, że zdolność wyciągów do redukcji Fe<sup>3+</sup> do Fe<sup>2+</sup> była 3,8 razy wyższa dla *H. physodes* podobnie jak wyższa była zdolność zmiatania rodnika DPPH<sup>•</sup> (IC<sub>50</sub> = 79,7 µg/ml - *H. physodes* i 493,6 µg/ml - *P. sulcata*). Surowcem o wyższej zawartości polifenoli okazał się porost *H. physodes* [Stojanović i wsp. 2010].

Aktywność antyoksydacyjna wyciągu metanolowego z *H. physodes* oraz *P. sulcata* (24-godzinna maceracja surowca w temperaturze pokojowej), została również określona w innych badaniach. Stężenie, przy którym wyciągi zmiatały 50% rodnika DPPH<sup>•</sup> wynosiło: 45,57 i 584,22 µg/ml, odpowiednio dla wyciągów z obu surowców. Po raz kolejny potwierdzono w ten sposób niezwykle wysoki potencjał antyoksydacyjny *H. physodes*. Ponadto wyciąg z *H. physodes* w porównaniu z *P. sulcata* cechowała wyższa zawartość polifenoli (141,59 i 88,25 mg kwasu galusowego (GA)/g wyciągu), lecz niższa flawonoidów (20,14 i 44,43 mg rutyny (Ru)/g wyciągu) [Mitrović i wsp. 2011].

*P. sulcata*, badana razem z dwoma innymi gatunkami *Parmelia* sp., wykazywała silniejszą aktywność przeciwdrobnoustrojową od równocześnie testowanych innych gatunków. Wyciągi acetonowe, otrzymane metodą ekstrakcji w aparacie Soxhleta, działały na wszystkie testowane bakterie i grzyby (Gram-dodatnie: *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*; Gram-ujemne: *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*; grzyby: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinerea*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor mucedo*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium purpurescens*, *Penicillium verrucosum*, *Trichoderma harsianum*). Zakres stężeń, w którym wyciągi wykazywały działanie wobec wymienionych bakterii wahał się pomiędzy MIC 0,78 - 6,25 mg/ml i 0,78 - 12,5 mg/ml dla grzybów (0,78 dla *K. pneumoniae*, *B. mycoides* i *C. albicans*) [Kosanić i wsp. 2012].

Wyciągi acetonowe, metanolowe i wodne z *H. physodes* i *P. sulcata* otrzymane metodą ekstrakcji w aparacie Soxhleta, w stężeniu 1 mg/ml, badano pod kątem właściwości antyoksydacyjnych. W celu określenia działania przeciwutleniającego

zastosowano metodę z użyciem wolnego rodnika DPPH<sup>•</sup>. Badano również zdolność zmiatania rodnika ponadtlennego i siłę redukującą metodą z heksacyjanożelazian(III)-em potasu. Dla wyciągów określono również zawartość całkowitą polifenoli i flawonoidów, wyrażoną odpowiednio jako równoważnik pirokatecholu i rutyny. Badane wyciągi posiadały zróżnicowaną aktywność antyoksydacyjną (*H. physodes* > *P. sulcata*). W przypadku *H. physodes* najsilniej działał zawsze wyciąg metanolowy, a najslabiej wodny, który charakteryzował się równocześnie najniższą zawartością związków o charakterze polifenoli. W przypadku *P. sulcata* najsilniejsze działanie antyoksydacyjne posiadały wyciągi acetonowe, a najmniej aktywne były wyciągi wodne. Próby acetonowe zawierały także najwyższą ilość związków polifenolowych, która była porównywalna z równoważnym wyciągiem z *H. physodes*. Rezultaty wskazują, że *H. physodes* posiadała większą niż *P. sulcata* zdolność zmiatania wolnego rodnika DPPH<sup>•</sup> (*H. physodes*: 60,18% - aceton, 73,18% - metanol i 30,98% - woda), która była porównywalna z wzorcami (86,58% – witamina C, 79,78% – BHA, 63,99% -  $\alpha$ -tokoferol), silniejszą zdolność redukcji jonów metali oraz porównywalną (wyciąg metanolowy i acetonowy) lub wyższą (wodny) zdolność zmiatania rodnika ponadtlennego [Kosanič i wsp. 2011].

W innym badaniu oceniono pod względem właściwości antyoksydacyjnych wyciągi acetonowe (ekstrakcja w aparacie Soxhleta) z *P. sulacata* w stężeniu 1 mg/ml. Zdolność zmiatania rodnika DPPH<sup>•</sup> była około dwa razy niższa niż zastosowanych substancji wzorcowych (BHA, witamina C,  $\alpha$ -tokoferol), siła redukująca 7-10 razy niższa od referencyjnych antyoksydantów a zdolność zmiatania anionorodnika ponadtlennego trzy razy niższa. W badaniu tym testowano równocześnie dwa inne gatunki porostów: *P. saxatilis* i *P. caperata*, które wyróżniała wyższa aktywność oraz wyższa zawartość polifenoli i flawonoidów [Kosanič i wsp. 2012].

W badaniach *in vitro* oznaczono **genotoksyczne** działanie wodnych wyciągów z *H. physodes* na komórki krwi ludzkiej. Do badań użyto próbki krwi pochodzącej od pięciu zdrowych kobiet, pomiędzy 27 a 28 rokiem życia, nie narażonych na działanie czynników genotoksycznych. W eksperymencie badano wpływ wyciągu wodnego z *H. physodes* w różnych stężeniach (0 - 2000 mg/l) na limfocyty krwi ludzkiej. Uzyskane wyniki poziomu występowania aberracji chromosomalnych i powstawania mikrojąder w badanych komórkach, nie były istotne statystycznie, co świadczyło o braku działania genotoksycznego badanej próbki [Türkez i wsp. 2012].



### 3.2.2. *Hypocenomyce scalaris* i *Cladonia uncialis*

W piśmiennictwie nie ma informacji na temat aktywności biologicznej wyciągów przygotowanych z *H. scalaris* i *C. uncialis*. Z danych literaturowych wynika jedynie, że z powierzchni *C. uncialis* rosnącego na terenie Kanady wyizolowano szczep bakteryjny, podobny, lecz nie identyczny ze *Streptomyces cyanogenus*. Szczep ten w warunkach laboratoryjnych, na odpowiedniej pożywce, wytwarzał uncialamycynę, substancję zaliczaną do antybiotyków enodinyowych, o niezwykle silnym działaniu przeciwbakteryjnym na szczepy *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia* [Nicolaou i wsp. 2008].

***CEL PRACY***

Z badaniem porostów po raz pierwszy zetknęłam się podczas realizacji pracy magisterskiej, którą wykonywałam w ramach stypendium Socrates-Erasmus (2006-2007) w Laboratoire de Pharmacognosie et Mycologie w Rennes (Francja). Podjęta wówczas tematyka zainteresowała mnie tak bardzo, że postanowiłam kontynuować badania nad porostami, skupiając się na gatunkach rosnących na terenie Polski. Obrany kierunek pracy naukowej, inny niż realizowany aktualnie w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji w Poznaniu, lecz którym w latach 70. w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji interesował się prof. Henryk Gertig, stał się podstawą mojej rozprawy doktorskiej, do której badania rozpoczęłam w październiku 2008 r.

**Celem niniejszej pracy** były badania składu chemicznego i aktywności biologicznej czterech gatunków porostów, występujących pospolicie na terenie Polski i nie objętych ochroną przyrody. Wybrane gatunki to: *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. (1896), *Parmelia sulcata* Taylor (1836), *Hypocenomyce scalaris* (Ach. ex Lilj.) M. Choisy (1951), *Cladonia uncialis* (L.) Weber ex Wigg. (1780).

**Cele szczegółowe** pracy zakładały:

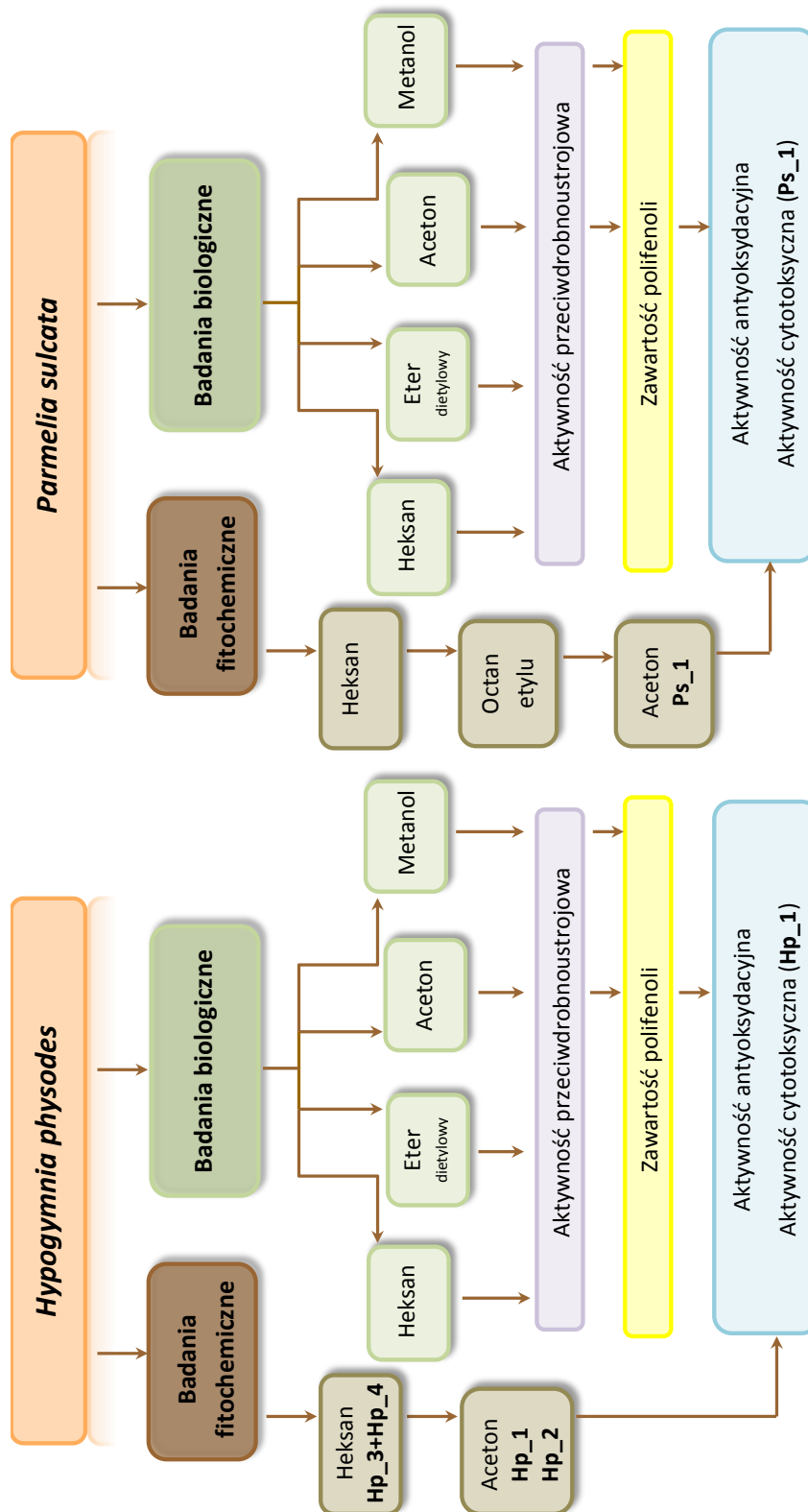
- 1) analizę jakościową wyciągów otrzymanych z badanych gatunków porostów,
- 2) analizę składu ilościowego wybranych wyciągów (oznaczenie zawartości sumy polifenoli metodą z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w wyciągach acetonowych i metanolowych; oznaczenie zawartości kwasu usninowego metodą HPLC w wyciągach z *C. uncialis*),
- 3) badania fitochemiczne, celem otrzymania występujących w wybranych gatunkach wtórnych metabolitów porostowych z grupy depsydów, depsydonów i pochodnej dibenzofuranu, w ilości umożliwiającej identyfikację związków oraz badania biologiczne,
- 4) analizę identyfikacyjną otrzymanych związków (chromatografia cienkowarstwowa, analizy spektralne: NMR, MS, UV),
- 5) badania aktywności biologicznej wybranych wyciągów i związków:
  - badania aktywności antyoksydacyjnej (metoda z zastosowaniem odczynnika DPPH i FRAP),
  - badania aktywności cytotoksycznej,
  - badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej (przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej).

# ***CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA***

## Wykaz stosowanych skrótów

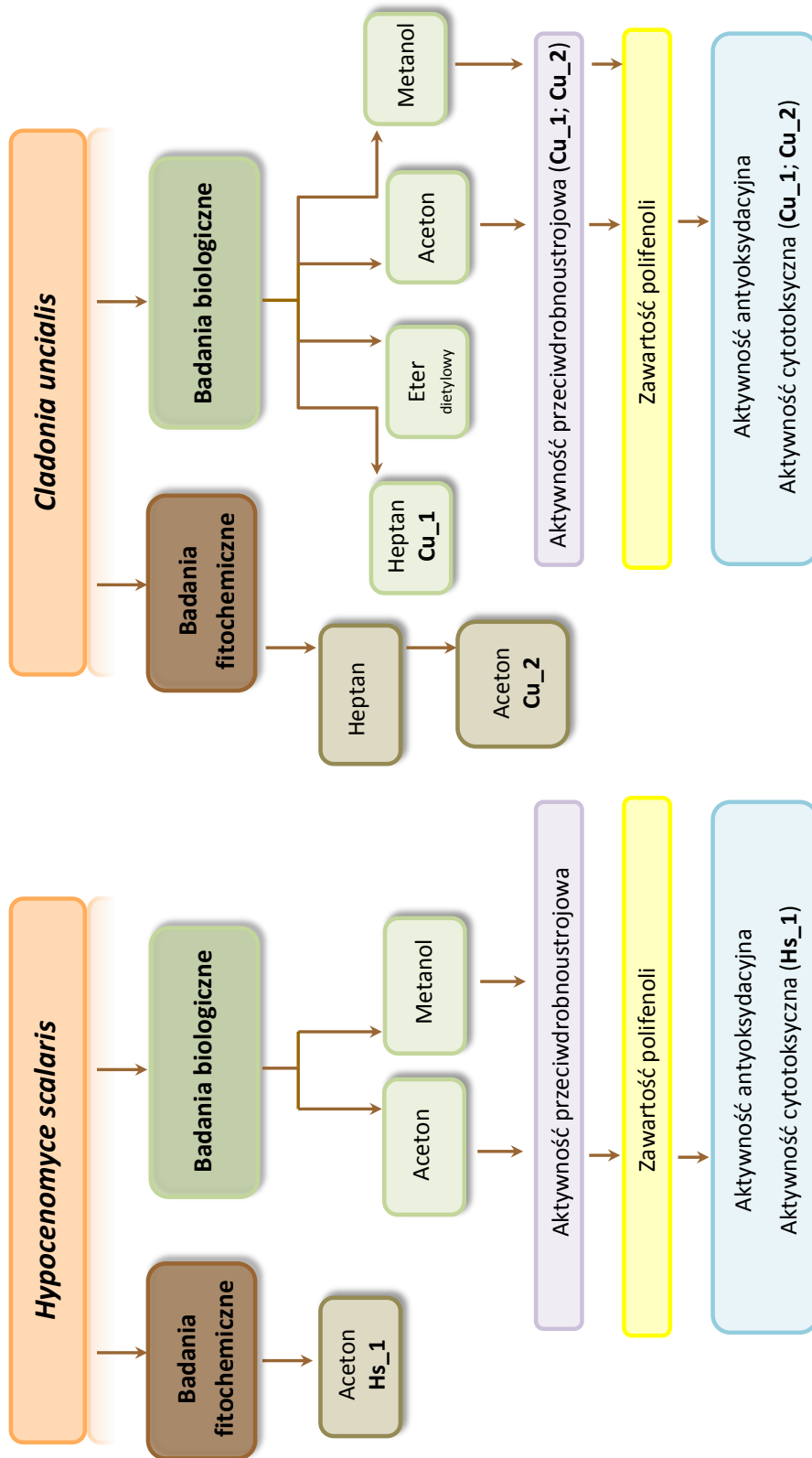
<b>A</b>	absorbancja
<b>AA</b>	aktywność antyoksydacyjna (ang. <i>antioxidant activity</i> )
<b>AC</b>	aktywność cytotoksyczna (ang. <i>cytotoxic activity</i> )
<b>ANS</b>	odczynnik wywołujący z aldehydem anyżowym
<b>atr</b>	atranoryna
<b>BHA</b>	butylohydroksyanizol (ang. <i>butylhydroxyanisole</i> )
<b>CaLu-1</b>	ludzka lina komórkowa raka płuc
<b>CC</b>	chromatografia kolumnowa (ang. <i>column chromatography</i> )
<b>chatr</b>	chloroatranoryna
<b>Cu_1</b>	kwask usninowy
<b>Cu_2</b>	kwask skwamatowy
<b>CV</b>	test CV z użyciem fioletu krystalicznego (ang. <i>crystal violet</i> )
<b>cz</b>	czysty
<b>czda</b>	czysty do analizy
<b>DMSO</b>	dimetylosulfotlenek (ang. <i>dimethyl sulfoxide</i> )
<b>DPPH</b>	test z użyciem 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyny
<b>F<sub>1</sub>-F<sub>9</sub></b>	fazy ruchome
<b>FRAP</b>	test oznaczania zdolności redukowania jonów żelaza (ang. <i>ferric ion reducing antioxidant parameter</i> )
<b>GAE</b>	równoważnik kwasu galusowego (ang. <i>gallic acid equivalent</i> )
<b>HepG2</b>	ludzka lina komórkowa raka wątroby
<b>Hp_1</b>	kwask fizodowy
<b>Hp_2</b>	kwask fizodalowy
<b>Hp_3+Hp_4</b>	mieszanina atranoryny i chloroatranoryny
<b>HPLC</b>	wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>high performance liquid chromatography</i> )
<b>Hs_1</b>	kwask lekanorowy
<b>HSQC</b>	ang. <i>heteronuclear single quantum coherence</i>
<b>J</b>	stała sprzężenia
<b>LnCaP</b>	ludzka lina komórkowa raka prostaty
<b>MCF-10A</b>	ludzka linia komórek nienowotworowych nabłonka gruczołu piersiowego

<b>MCF-7</b>	ludzka lina komórkowa raka piersi estrogenozależna
<b>MDA-MB-231</b>	ludzka lina komórkowa raka piersi estrogenoniezależna
<b>MeOH</b>	metanol
<b>MRSA</b>	gronkowiec złocisty oporny na metycylinę (ang. <i>methycyllin mesistant Staphylococcus aureus</i> )
<b>MS</b>	spektrometria mas (ang. <i>mass spectrometry</i> )
<b>MTT</b>	test MTT z użyciem bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazoliowy
<b>n.o.</b>	nie określono
<b>NMR</b>	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i> )
<b>NRU</b>	test NRU z użyciem czerwieni obojętnej (ang. <i>neutral red uptake assay</i> )
<b>ppm</b>	ang. <i>parts per million</i>
<b>Ps_1</b>	kwask salazykowy
<b>PTLC</b>	preparatywna chromatografia cienkowarstwowa (ang. <i>preparative thin layer chromatography</i> )
<b>R<sup>2</sup></b>	kwadrat współczynnika korelacji
<b>R<sub>f</sub></b>	współczynnik opóźnienia (ang. <i>retention factor, retardation factor</i> )
<b>S</b>	odchylenie standardowe
<b>S<sub>sr</sub></b>	odchylenie standardowe średniej
<b>T47D</b>	ludzka lina komórkowa raka piersi estrogenozależna
<b>TLC</b>	chromatografia cienkowarstwowa (ang. <i>thin layer chromatography</i> )
<b>UA</b>	kwask usninowy (ang. <i>usnic acid</i> )
<b>UV</b>	ultrafiolet, promieniowanie ultrafioletowe
<b>VCE</b>	równoważnik witminy C (ang. <i>vitamin C equivalent</i> )
<b>Wz</b>	współczynnik zmienności



**Rycina 11a.** Schemat wykonywanych badań wchodzących w zakres pracy doktorskiej.

Objaśnienia: związki wyizolowane z badanych porostów: **Hp\_1** kwas fyzodowy, **Hp\_2** kwas fyzodalowy, **Hp\_3+Hp\_4** mieszanina atranoryny i chloroatranoryny; **Ps\_1** kwas salazynowy.



**Rycina 11b.** Schemat wykonywanych badań wchodzących w zakres pracy doktorskiej.

Objaśnienia: związki wyizolowane z badanych porostów: **Hs<sub>1</sub>** kwas lekanorowy, **Cu<sub>1</sub>** kwas (-)-usninowy, **Cu<sub>2</sub>** kwas skwamatowy.



## 4. Materiały i metody

### 4.1. Materiały

#### 4.1.1. Badania fitochemiczne

##### Odczynniki

- aceton czda; POCH, Gliwice, Polska
- aldehyd anyżowy; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
- chloroform czda; POCH, Gliwice, Polska
- dichlorometan czda; POCH, Gliwice, Polska
- eter dietylowy czda; POCH, Gliwice, Polska
- heksan frakcja z nafty cz; POCH, Gliwice, Polska
- n-heptan czda; POCH, Gliwice, Polska
- kwas octowy lodowaty czda.; POCH, Gliwice, Polska
- kwas mrówkowy 99%; POCH, Gliwice, Polska
- kwas siarkowy stężony; POCH, Gliwice, Polska
- metanol czda; POCH, Gliwice, Polska
- octan etylu czda; POCH, Gliwice, Polska
- odczynnik Folin-Ciocalteu; MERCK, Darmstadt, Germany
- toluen czda; POCH, Gliwice, Polska
- węglan sodu; POCH, Gliwice, Polska

##### Substancje wzorcowe

- atranoryna; ChromaDex, Irvine, California, United States
- kwas galusowy; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
- kwas (+)-usninowy; kolekcja Katedry i Zakładu Farmakognozji UMP

##### Sprzęt

- płytki aluminiowe pokryte żelem krzemionkowym ze wskaźnikiem fluorescencji (TLC 60 F<sub>254</sub>); Merck, Darmstadt, Germany
- płytki szklane pokryte żelem krzemionkowym ze wskaźnikiem fluorescencji (PLC 60 F<sub>254</sub>, 2 mm); Merck, Darmstadt, Germany
- płytki szklane pokryte żelem krzemionkowym bez znacznika fluorescencji (PCTLC 60, 0,25 mm); MERCK, Darmstadt, Germany
- żel krzemionkowy do chromatografii kolumnowej (15-40 μm, 60 Å); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
- łaźnia ultradźwiękowa Elmasonic S 180H; Elma, Germany

- waga analityczna LE225D-OCE; Sartorius
- wyparka próżniowa Rotavapor R – 210; Buchi, Switzerland
- wytrząsarka laboratory shaker type 358S; Elpan, Polska

#### 4.1.2. Badania aktywności antyoksydacyjnej

##### Odczynniki

- BHA (butylohydroksyanizol); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
- chlorek żelaza (III) uwodniony ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
- DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyna); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
- DMSO (dimetylosulfotlenek) czda; POCH, Gliwice, Polska
- kwas solny (odważka analityczna); POCH, Gliwice, Polska
- kwas cytrynowy; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
- kwas askorbinowy; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
- TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridylo)-1,3,5-triazyna); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA

##### Sprzęt

- spektrofotometr UV/VIS, Lambda 35; Elmer – Perkin, Massachusetts 02451, USA
- waga analityczna LE225D-OCE; Sartorius

##### Oprogramowanie

- MS Excel 2007, One Microsoft Road, Redmond, WA, USA
- WinLab 2.80, Perkin Elmer, Massachusetts 02451, USA

#### 4.1.3. Badania aktywności cytotoksycznej

##### Odczynniki

- antybiotyki (1% mieszanka streptomycyna z penicyliną; Gibco Invitrogen, Grand Island, NY
- błękit trypanu (ang. *trypan blue*); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
- CV (fiolet krystaliczny, ang. *crystal violet*); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
- DMEM (ang. *dulbecco's modified eagle's medium*); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
- DMSO (dimetylosulfotlenek; ang. *dimethyl sulfoxide*), wolny od endotoksyn; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA

- EGF (czynnik wzrostu naskórkowy; ang. *epidermal growth factor*); Sigma-Aldrich,
- FBS (10%), (płodowa surowica bydlęca; ang. *fetal bovine serum*); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
- HS (surowica końska ang. *horse serum*); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
- hydrokortyzon; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
- insulina; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
- L-glutamina; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
- MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazoliowy); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
- NR (czerwień obojętna, ang. *neutral red*); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
- PBS (sól fizjologiczna buforowana fosforanami; ang. *phosphate buffered saline*); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
- RPMI 1640 z glutaminą, bez czerwieni fenolowej Cambrex, Rockland, ME USA
- SDS (siarczan dodecyłu); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
- trypsyna/EDTA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA

#### Linie komórkowe

- trzy ludzkie linie komórkowe raka piersi: MCF-7, MDA-MB-231, T47D
- ludzka linia komórek nienowotworowych nabłonka gruczołu piersiowego: MCF-10A
- ludzka linia komórkowa raka prostaty: LnCaP
- ludzka linia komórkowa raka płuc: CaLu-1
- ludzka linia komórkowa raka wątroby: HepG2

#### Sprzęt

- płytki do hodowli komórkowych 96-dołkowe; Corning Inc., USA
- butelki hodowlane o powierzchni 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>; Corning Inc., USA
- pipety Pasteura; Medlab, Polska
- pipety jednorazowe; Falcon<sup>®</sup> BD Biosciences Franklin Lakes, USA
- probówki typu Eppendorf; Medlab, Polska
- komora laminarna Bio-Ban 48; Dow Chem. Comp., Włochy
- czytnik płytek Elx-800; BioTek, USA
- mikroskop świetlny TS 100, KAMERA Digital Sight Camera System; Nikon, Japonia
- inkubator 490-ICE; LabLine Instruments Inc., USA

- wytrząsarka płytek DTS-4; Sky Line, Łotwa

#### Oprogramowanie

- GraphPad Prism - program do opracowania danych, sporządzenia wykresów; GraphPad Prism Software; San Diego California USA
- KC Junior v 1.4.1.8 - program sterujący czytnikiem BioTek Elx-800; BioTek Instruments, Inc. Highland Park, P.O. Box 998 Winooski, Vermont USA

#### **4.2. Surowiec do badań**

Surowiec do badań stanowiły cztery różne gatunki porostów: *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata*, *Hypocenomyce scalaris*, *Cladonia uncialis*.

#### **Do badań fitochemicznych** porosty zostały zebrane z:

- *H. physodes* (*Parmeliaceae*) - korowina sosny, obrzeża Puszczy Noteckiej; woj. wielkopolskie, X 2008 r.
- *P. sulcata* (*Parmeliaceae*) - korowina jesionu, droga dojazdowa z Międzygórzem Kotlina Kłodzka, woj. dolnośląskie, V 2009 r.
- *H. scalaris* (*Lecideaceae*) - korowina sosny, obrzeża Puszczy Noteckiej; woj. wielkopolskie, X 2008 r.
- *C. uncialis* (*Cladoniaceae*) - gleba, leśnictwo Lubnia, woj. pomorskie, X 2009 r. (próbka a) i IV 2010 r. (próbka b)

#### **Do oznaczeń ilościowych i aktywności biologicznej** porosty zostały zebrane z:

- *H. physodes* (*Parmeliaceae*) - korowina sosny, Dominikowo, woj. zachodniopomorskie, VIII 2010 r.
- *P. sulcata* (*Parmeliaceae*) - korowina jesionu, Podlesice, woj. śląskie, VIII 2009 r.
- *H. scalaris* (*Lecideaceae*) - korowina sosny, leśnictwo Wytomyśl, woj. wielkopolskie, XI 2011 r.
- *C. uncialis* (*Cladoniaceae*) - gleba, leśnictwo Wytomyśl, woj. wielkopolskie, VIII 2009 r. (badania mikrobiologiczne i zawartości kwasu (-)-usninowego metodą HPLC) oraz leśnictwo Lubnia, woj. pomorskie, V 2011 r. (badania aktywności antyoksydacyjnej, cytotoksyczności, oznaczenie zawartości polifenoli i kwasu (-)-usninowego HPLC)

### 4.3. Metody

#### 4.3.1. Ekstrakcja

##### 4.3.1.1. Przygotowanie wyciągów do badań fitochemicznych

###### **Przygotowanie wyciągów z plechy *H. physodes***

Wysuszony (temperatura pokojowa), oczyszczony i pocięty surowiec ekstrahowano wyczerpująco (kontrola TLC) w temperaturze pokojowej, przez wytrząsanie w wytrząsarce heksanem i kolejno acetonem. Wyciągi sączono przez sącdek z bibuły filtracyjnej, a następnie zagęszczono do suchej pozostałości pod zmniejszonym ciśnieniem (tabela 1). Do izolacji związków posłużyły oba otrzymane wyciągi.

###### **Przygotowanie wyciągów z plechy *P. sulcata***

Wysuszony (temperatura pokojowa) surowiec oczyszczono, pocięto na drobne kawałki i ekstrahowano wyczerpująco (kontrola TLC) w łaźni ultradźwiękowej, kolejno: heksanem, octanem etylu, acetonem. Otrzymane wyciągi łączono odpowiednio, sączono przez sącdek z bibuły filtracyjnej i zagęszczono do suchej pozostałości pod zmniejszonym ciśnieniem (tabela 1). Do izolacji związków posłużył wyciąg acetonowy.

###### **Przygotowanie wyciągu z plechy *H. scalaris***

Suchy, oczyszczony z kory i materii organicznej surowiec zalano acetonem. Następnie plechę ekstrahowano wyczerpująco w łaźni ultradźwiękowej, każdorazowo zalewając surowiec świeżą porcją acetonu (kontrola TLC). Połączone wyciągi sączono przez sącdek z bibuły filtracyjnej, a następnie łączono i zagęszczono do suchej pozostałości pod zmniejszonym ciśnieniem (tabela 1).

###### **Przygotowanie wyciągów z plechy *C. uncialis***

###### Ekstrakcja w aparacie Soxhleta (próbka b)

Wysuszony, oczyszczony z gleby i organicznych zanieczyszczeń, rozkruszony w moździerzu surowiec (próbka b) wsypano do wykonanej z bibuły gilzy, którą umieszczono w aparacie Soxhleta. Tak przygotowaną plechę poddawano kolejno ekstrakcji rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności, kolejno heptanem, acetonem. Przed pierwszą ekstrakcją plechę zalewano danym rozpuszczalnikiem i pozostawiano

na noc. Następnie surowiec ekstrahowano kilka godzin w temperaturze wrzenia ekstrahenta i, jeśli była taka konieczność, następnymi porcjami świeżego rozpuszczalnika. Surowiec został wyekstrahowany wyczerpująco danym odczynnikiem, co kontrolowano wykonując chromatografię cienkowarstwową (TLC). Przed zalaniem plechy rozpuszczalnikiem o większej polarności, suszono ją. Otrzymane wyciągi łączono odpowiednio i zagęszczano do suchej pozostałości (tabela 1). Do izolacji związków posłużyły oba wyciągi heptanowy i acetonowy.

### Ekstrakcja ultradźwiękami

Wysuszony, oczyszczony z gleby i organicznych zanieczyszczeń, rozkruszony w moździerz surowiec (próbka a), wsypano do kolby stożkowej ze szlifem i poddano ekstrakcji kolejno heptanem i acetonem. Pierwszą ekstrakcją danym rozpuszczalnikiem poprzedziła całonocna maceracja surowca. Następnie surowiec ekstrahowano stosując kilkakrotnie świeże partie ekstrahentem z użyciem łaźni ultradźwiękowej. Przed zalaniem plechy rozpuszczalnikiem o większej polarności, suszono ją. Stopień wyczerpania surowca po danej ekstrakcji badano wykonując chromatografię cienkowarstwową (TLC). Otrzymane wyciągi łączono odpowiednio i zagęszczano do suchej pozostałości (tabela 1). Do izolacji związków posłużyły oba wyciągi heptanowy i acetonowy.

**Tabela 1.** Przygotowywanie wyciągów do badań fitochemicznych<sup>1</sup>

Gatunek porostu	<i>H. physodes</i>	<i>P. sulcata</i>	<i>H. scalaris</i>	<i>C. uncialis</i> (b)	<i>C. uncialis</i> (a)
Masa surowca [g]	12,30	5,75	1,23	77,15	32,55
Rozpuszczalnik	heksan aceton	heksan octan etylu aceton	aceton	heptan aceton	heptan aceton
Objętość rozpuszczalnika [ml]	5 x 200 3 x 160	3 x 80 6 x 60 8 x 50	6 x 20	1 x 300 1 x 300	5 x 150 6 x 150
Warunki ekstrakcji	wytrząsanie temp. pokojowa	ultradźwięki 35°C	ultradźwięki 40°C	Soxhlet temp. wrzenia rozpuszczalnika	ultradźwięki 35°C
Czas ekstrakcji	8 x 1 godzina	16 x 20 minut	6 x 20 minut	2 x 3,5 godziny	11 x 20 minut
Zagęszczanie	pod zmniejszonym ciśnieniem, 35-40°C				

a) ekstrakcja w ultradźwiękach; b) ekstrakcja w aparacie Soxhleta

<sup>1</sup> Masy uzyskanych wyciągów i wydajność ekstrakcji przedstawiono w rozdziale 5.1., tabela 13

#### 4.3.1.2. Przygotowanie wyciągów do badań aktywności biologicznej

##### Przygotowanie wyciągów z plech *H. physodes*

Wysuszony surowiec oczyszczono z korowiny i materii organicznej, pocięto na drobne kawałki. Przygotowane do ekstrakcji próbki surowca zalano rozpuszczalnikami o różnej polarności (heksan, eter dietylowy, aceton, metanol). Proces ekstrakcji przeprowadzono z zastosowaniem ultradźwięków i dla każdej próbki powtórzono 4-krotnie, zalewając surowiec świeżymi porcjami rozpuszczalnika. Otrzymane wyciągi przesączono przez sącdek z bibuły filtracyjnej, a następnie łączono odpowiednio i zagęszczano do suchej pozostałości (tabela 2).

##### Przygotowanie wyciągów z plech *P. sulcata*

Wysuszoną, oczyszczoną z korowiny i materii organicznej plechę, pocięto na drobne kawałki. Przygotowane do ekstrakcji próbki surowca zalano rozpuszczalnikami o różnej polarności (heksan, eter dietylowy, aceton, metanol). Proces ekstrakcji przeprowadzono z zastosowaniem ultradźwięków i dla każdej próbki powtórzono 4-krotnie, zalewając surowiec świeżymi porcjami rozpuszczalnika. Otrzymane wyciągi przesączano przez sącdek z bibuły filtracyjnej, a następnie łączono odpowiednio i zagęszczano do suchej pozostałości (tabela 2).

##### Przygotowanie wyciągów z plech *H. scalaris*

Wysuszony surowiec oczyszczono z korowiny i materii organicznej. Przygotowane do ekstrakcji próbki surowca zalano rozpuszczalnikami o różnej polarności (aceton, metanol). Proces ekstrakcji przeprowadzono z zastosowaniem ultradźwięków i dla każdej próbki powtórzono 4-krotnie, zalewając surowiec świeżymi porcjami rozpuszczalnika. Otrzymane wyciągi przesączono przez sącdek z bibuły filtracyjnej, a następnie łączono odpowiednio i zagęszczano do suchej pozostałości (tabela 2).

##### Przygotowanie wyciągów z plech *C. uncialis*

Wysuszony, oczyszczony z ziemi i materii organicznej surowiec rozdrobniono w móżdżerku. Próbki surowca zalano rozpuszczalnikami o różnej polarności (heptan, eter dietylowy, aceton, metanol). Proces ekstrakcji przeprowadzono z zastosowaniem ultradźwięków i powtórzono dla każdej próbki 4-krotnie, zalewając surowiec świeżymi

porcjami rozpuszczalnika. Otrzymane wyciągi przesączono przez sącdek z bibuły filtracyjnej, a następnie łączono odpowiednio i zagęszczano do suchej pozostałości (tabela 2).

**Tabela 2.** Przygotowywanie wyciągów do badań biologicznych <sup>2</sup>

Gatunek porostu	<i>H. physodes</i>	<i>P. sulcata</i>	<i>H. scalaris</i>	<i>C. uncialis</i>
Masa surowca [g]	14,00	7,01		9,81*
	2,44	6,00	1,16	9,47*
	4,01	4,20	1,03	4,88*
	4,02	4,12		4,99*
				15,00**
				10,01**
Rozpuszczalnik	heksan eter dietylowy aceton metanol	heksan eter dietylowy aceton metanol	aceton metanol	heptan* eter dietylowy* aceton* metanol* aceton** metanol**
Objętość rozpuszczalnika [ml]	4 x 100			
Warunki ekstrakcji	ultradźwięki; 30 – 35 °C 4 x 30 minut;			
Zagęszczanie wyciągu	pod zmniejszonym ciśnieniem, 34-36 °C (za wyjątkiem wyciągów eteru dietylowego – bez próżni)			

\*surowiec do badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej – zebrany w 2009 r.; \*\*surowiec do badań aktywności antyoksydacyjnej i cytotoksycznej – zebrany w 2011 r (rozdział 4.2.).

### 4.3.2. Analiza jakościowa

#### 4.3.2.1. Chromatografia analityczna cienkowarstwowa (TLC)

Chromatografię cienkowarstwową stosowano w celu jakościowej kontroli otrzymanych wyciągów, frakcji uzyskanych w wyniku rozdziału na kolumnie chromatograficznej oraz wstępnej identyfikacji wyizolowanych związków.

#### Faza stacjonarna

- płytki aluminiowe pokryte żelom krzemionkowym ze wskaźnikiem fluorescencji (60 F<sub>254</sub> MERCK)

#### Faza ruchoma

- F<sub>1</sub>: heksan-octan etylu (75:25) (standard solvent E) [Elix i Crook 1992]
- F<sub>2</sub>: toluen-octan etylu-kwas octowy lodowaty (60:30:5)
- F<sub>3</sub>: toluen-octan etylu-kwas mrówkowy 99 % (139:83:8) (standard solvent G)

<sup>2</sup> Masy uzyskanych wyciągów i wydajność ekstrakcji przedstawiono w rozdziale 5.1., tabela 14



- F<sub>4</sub>: toluen-kwas octowy lodowaty (170:30) (standard solvent C) [Mietsch i wsp. 1994]

#### Substancje wzorcowe

- atranoryna
- kwas usninowy

#### Odczynnik wywołujący

- odczynnik anyżowy (ANS): do 0,5 ml aldehydu anyżowego dodano 10 ml lodowatego kwasu octowego i 85 ml metanolu oraz 5 ml stężonego kwasu siarkowego (*ex tempore*)

Chromatogramy rozwijano w temperaturze pokojowej w jednym kierunku, a po wysuszeniu oglądano w świetle lampy UV  $\lambda = 254 \text{ nm}$  i  $\lambda = 365 \text{ nm}$ . Po spryskaniu płytek odczynnikiem wywołującym ogrzewano je kilka minut w temperaturze około 120°C do momentu pojawienia się na płytce barwnych plam, które obserwowano w świetle dziennym.

### **4.3.3. Izolacja związków**

Otrzymane wyciągi do badań fitochemicznych poddano analizie TLC i na podstawie uzyskanych rezultatów wstępnie oceniono wyciągi pod względem różnorodności i ilości zawartych w ekstraktach metabolitów wtórnych. Pomogło to w wyborze ekstraktów do badań i wskazało kierunek prowadzenia prac fitochemicznych, w przebiegu których wykorzystano różną metodykę.

#### **4.3.3.1. Chromatografia preparatywna cienkwarstwowa (PTLC)**

Chromatografię preparatywną cienkwarstwową wykonano dla wyciągów acetonowych z *H. physodes* i *H. scalaris*, a zastosowana technika pozwoliła na izolację związków Hp\_2 (kwas fizodalowy) i Hs\_1 (kwas lekanorowy).

#### Faza stacjonarna

- płytki szklane pokryte żelem krzemionkowym bez znacznika fluorescencji (PCTLC); (izolacja Hp\_2)
- płytki szklane pokryte żelem krzemionkowym ze wskaźnikiem fluorescencji (PLC 60 F<sub>254</sub>, 2 mm); (izolacja Hs\_1)

#### Faza ruchoma

- F<sub>2</sub>: toluen:octan etylu:kwas octowy lodowaty (60:30:5); (izolacja Hp\_2)
- F<sub>5</sub>: eter dietylowy:kwas octowy lodowaty (100:1); (izolacja Hs\_1)

#### 4.3.3.2. Chromatografia kolumnowa preparatywna (CC)

Chromatografię na kolumnie przeprowadzono dla wyciągu acetonowego z *H. physodes*, a zastosowana metoda pozwoliła na izolację związku Hp\_1 (kwas fizodowy).

##### Faza stacjonarna

- żel krzemionkowy do chromatografii kolumnowej

##### Faza ruchoma

- F<sub>6</sub>: heksan:octan etylu (75:25)
- F<sub>7</sub>: toluen:heksan (75:35)
- F<sub>8</sub>: toluen:octan etylu (90:30)
- F<sub>9</sub>: toluen:octan etylu (75:30)

#### 4.3.3.3. Krystalizacja

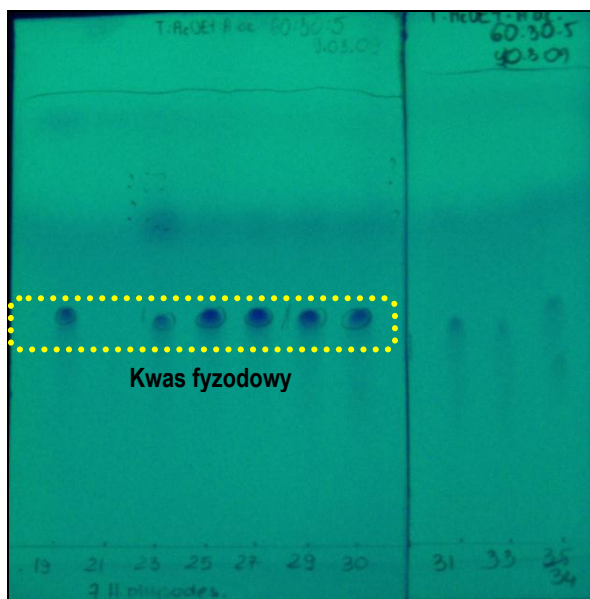
Metodą krystalizacji otrzymano atranorynę i chloroatranorynę z *H. physodes*, kwas lekanorowy z *H. scalaris*, kwas salazynowy z *P. sulcata* i kwas usninowy oraz skwamatowy z *C. uncialis*.

#### 4.3.3.4. Izolacja związków z *Hypogymnia physodes*

##### **Izolacja związku Hp\_1 (kwas fizodowy)**

Wyciąg acetonowy z *H. physodes* poddano chromatografii kolumnowej (CC; rozdział 4.3.3.2.). Prace prowadzono w kolumnie szklanej o długości 50 cm i średnicy 2,5 cm, wypełnionej żelem krzemionkowym. W celu wypełnienia kolumny fazą stacjonarną przygotowano zawiesinę podłoża i układu F<sub>6</sub> (rozdział 4.3.3.2.). Sporządzony wcześniej wyciąg acetonowy (350 mg) rozpuszczono w jak najmniejszej ilości rozpuszczalnika i naniesiono na żel krzemionkowy (około 500 mg). Tak przygotowaną próbkę nakładano delikatnie na szczyt kolumny. Kolumnę rozwijano fazami o wzrastającej polarności F<sub>6</sub>-F<sub>9</sub> (tabela 3). Jakościową kontrolę składu zebranych z kolumny roztworów przeprowadzono wykonując analizę TLC stosując fazy ruchome F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> (rozdział 4.3.2.1.) i w zależności od rezultatów łączono poszczególne frakcje.

W wyniku chromatografii kolumnowej otrzymano 105 eluatów, które następnie odpowiednio połączono. Kontrola TLC wykazała we frakcjach 24-29 obecność jednej plamy o  $R_f = 0,50$ , co sugerowało obecność w nich jednego związku (rycina 12, tabela 3). Pozostałe frakcje były kilkuskładnikowe i zawierały przypuszczalnie (analiza TLC) mieszaninę atranoryny i chloroatranoryny (1-12) oraz pochodne kwasu fizodowego (31-105), których nie udało się rozdzielić.



**Rycina 12.** Chromatogram frakcji zawierających związek Hp\_1 (kwas fizodowy) zebranych w procesie izolacji z kolumny chromatograficznej.

Układ rozwijający: F<sub>2</sub> toluen-octan etylu-kwas octowy lodowaty (60:30:5); płytki: żel krzemionkowy 254 nm.

**Tabela 3.** Otrzymywanie metodą chromatografii kolumnowej związku Hp\_1 (kwas fizodowy)

Układ rozwijający	Otrzymane frakcje	TLC	Łączenie frakcji	Współczynnik R <sub>f</sub>
<b>F<sub>6</sub>: heksan:octan etylu (75:25)</b> (500 ml)	1-17		1-12	
<b>F<sub>7</sub>: toluen: heksan (75:35)</b> (100 ml)	18-22	F <sub>1</sub> (1-12)	13-18	<b>0,57 i 0,40</b>
<b>F<sub>8</sub>: toluen: octan etylu (90:30)</b> (1000 ml)	23-90	F <sub>2</sub> (13-105)	19-23	
<b>F<sub>9</sub>: toluen: octan etylu (75:30)</b> (260 ml)	91-105		<b>24-30</b>	<b>0,50</b>
			31-65	
			66-105	<b>0,52 i 0,45</b>

Układ rozwijający: F<sub>1</sub> heksan-octan etylu (75:25); F<sub>2</sub> toluen-octan etylu-kwas octowy (60:30:5); płytki: żel krzemionkowy 254 nm.

### Izolacja związku Hp\_2 (kwas fizodalowy)

Acetonowy wyciąg z *H. physodes* poddano także chromatografii preparatywnej na płytkach żelowych (PTLC). Odważony dokładnie (około 5 mg) ekstrakt rozpuszczano w acetonie (około 3 ml) i nakładano pasmami na płytki do chromatografii preparatywnej (pokryte żelem krzemionkowym bez znacznika fluorescencji) wielkości 5 cm x 10 cm (5 mg na 5-6 płytek). Przygotowane w ten sposób płytki rozwijano w układzie F<sub>2</sub> (tabela 4). Chromatogramy, po rozwinięciu suszono w ciemnym miejscu przez okres kilkunastu godzin, a następnie oglądano w świetle lampy UV  $\lambda = 365$  nm. Z płytek zdrapywano szerokie pasma związku o ciemnofioletowej fluorescencji ( $R_f < 0,40 < 0,45$ ). Zebrany żel z zaadsorbowanym na nim związkiem wymywano

w temperaturze pokojowej octanem etylu przez wytrząsanie (trzykrotnie) na wytrząsarce, a następnie w łaźni ultradźwiękowej (sześciokrotnie). Uzyskane roztwory sączono pod zmniejszonym ciśnieniem przez sączone ze szkła spiekanego i zagęszczono. Kontrola TLC wykazała, że uzyskane eluaty zawierają jeden związek. Warunki izolacji przedstawiono w tabeli 4.

**Tabela 4.** Otrzymywanie metodą PTLC związku Hp\_2 (kwas fizyodalowy)

Gatunek porostu (wyciąg)	<i>H. physodes</i> (wyciąg acetonowy)	
Masa naniesionego wyciągu	26,5 mg	
Faza ruchoma	toluen-octan etylu-kwas octowy lodowaty (F <sub>2</sub> :60:30:5)	
Warunki wymywania z podłoża	wytrząsanie → ultradźwięki 35°C temp. pokojowa	
Czas wymywania	3 x 1h	6 x 20 minut
Rozpuszczalnik	octan etylu	
Objętość rozpuszczalnika	3 x 25 ml	6 x 25 ml
Zagęszczanie wyciągu	pod zmniejszonym ciśnieniem temp. 35-40°C	

#### Otrzymanie związków Hp\_3 i Hp\_4 (atranoryna i chloroatranoryna)

Uzyskane w wyniku kilkukrotnej ekstrakcji heksanem wyciągi z *H. physodes* łączono i zagęszczano pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze około 31°C. Zagęszczony prawie do suchej pozostałości ekstrakt przemywano kilkukrotnie świeżymi porcjami heksanu, w celu odmycia zanieczyszczeń. Pozostałe w kolbie drobne kryształki o barwie kremowobiałej, pozostawiono do wyschnięcia.

#### 4.3.3.5. Izolacja związków z *Parmelia sulcata*

##### Izolacja związku Ps\_1 (kwas salazynowy)

Zagęszczony do suchej pozostałości wyciąg acetonowy, przemyto mieszaniną dichlorometan:chloroform:aceton (2:2:1). W tym celu do kolby z zagęszczonym wyciągiem wiano przygotowaną wcześniej mieszaninę rozpuszczalników i mieszano energicznie przez około 30 minut w temperaturze 39°C (łaźnia wodna). Nadsącz oddzielono, a białawą pozostałość zostawiono do odparowania rozpuszczalnika. Następnie do małej kolby stożkowej odważano niewielkie porcje uzyskanej substancji i rozpuszczano w mieszaninie acetonu i wody (8:2). Otrzymany roztwór zostawiono

z dala od światła w temperaturze pokojowej i nieszczelnie przykryto. Po czasie 24-48 h na spodzie kolbki pojawiły się drobne, białe kryształki, które oddzielono zbierając fazę płynną pipetą Pasteur'a, a następnie przemyto metanolem i wysuszono. Warunki prowadzonej izolacji przedstawiono w tabeli 5.

**Tabela 5.** Otrzymywanie metodą krystalizacji związku Ps\_1 (kwas salazynowy)

Gatunek porostu	Typ wyciągu	Rozpuszczalnik	Masa wyciągu do krystalizacji [mg]	Objętość rozpuszczalnika [ml]
<i>P. sulcata</i>	acetonowy (oczyszczony)	aceton:woda (8:2)	16	10
			14,5	5
			30	20
Suma			60,5	35

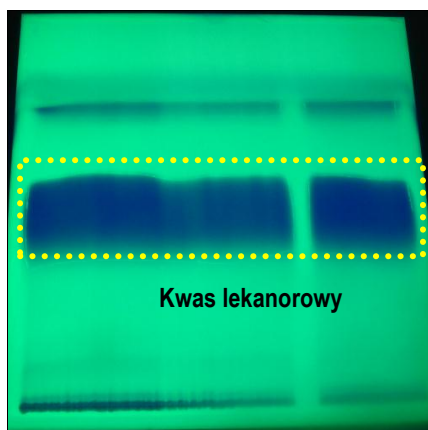
#### 4.3.3.6. Izolacja związków z *Hypocenomyce scalaris*

##### Izolacja związku Hs\_1 (kwas lekanorowy)

Otrzymany z *H. scalaris* wyciąg acetonowy (rozdział 4.3.1.1.) odmyto eterem, uzyskując nadsącz oraz nierozpuszczalny w eterze dietylowym osad. Nadsącz oddzielono, zagęszczono do suchej pozostałości i wykorzystano w metodzie krystalizacji. Nierozpuszczony osad posłużył do prac izolacyjnych z wykorzystaniem PTLC.

##### Metoda preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PTLC)

Na zaimpregnowane parami fazy ruchomej F<sub>5</sub> (tabela 6) płytki o wymiarach 20 x 20 cm pokrytych żelem krzemionkowym, ze wskaźnikiem fluorescencji, nanoszono pasmami rozpuszczony w acetonie (11-14 mg/płytkę) odpowiednio przygotowany wyciąg acetonowy z *H. scalaris* (rozdział 4.3.3.6.). Płytki rozwijano w układzie F<sub>5</sub> (tabela 6). Chromatogramy suszono w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej przez czas 48-72 godziny, a następnie oglądano w świetle lampy UV  $\lambda = 254$  nm. Zaznaczono szerokie pasma związku wygaszającego fluorescencję ( $R_f = 0,57$ ), zeskrobano żel krzemionkowy, przeniesiono do kolby stożkowej i zalano acetonem. Zebrane podłoże wytrząsano na wytrząsarce w temperaturze pokojowej, a następnie sączono przez sączek ze szkła spiekanego pod zmniejszonym ciśnieniem. Warunki prowadzonej izolacji przedstawiono w tabeli 6, a uzyskany chromatogram na rycinie 13.



**Rycina 13.** Chromatogram do izolacji metodą PTLC związku Hs\_1 (kwas lekanorowy). Układ rozwijający: F<sub>5</sub> eter dietylowy-kwas octowy lodowaty (100:1); płytki żel krzemionkowy 254 nm

**Tabela 6.** Otrzymywanie metodą PTLC związku Hs\_1 (kwas lekanorowy)

Gatunek porostu (wyciąg)	<i>H. scalaris</i> (wyciąg acetonowy)
Masa naniesionego wyciągu	71,2 mg
Faza ruchoma	eter dietylowy-kwas octowy lodowaty (F <sub>5</sub> :100:1)
Warunki wmywania z podłoża	wytrząsanie temperatura pokojowa
Czas wmywania	1h
Rozpuszczalnik	aceton
Objętość rozpuszczalnika	25 ml
Zagęszczanie	pod zmniejszonym ciśnieniem temperatura 35-40°C

### Metoda krystalizacji

Odważone do małej kolby stożkowej próbki odpowiednio przygotowanego wyciągu acetonowego (rozdział 4.3.3.6.), rozpuszczono w mieszaninie acetonu i wody (8:2). Otrzymany roztwór umieszczono z dala od światła w temperaturze pokojowej i nieszczelnie przykryto. Po czasie 24-48 h na spodzie kolbki pojawiły się drobne, białe kryształki, które oddzielono zbierając nadsącz pipetą Pasteur'a. Otrzymane kryształki przemyto i wysuszono. Warunki prowadzonej izolacji przedstawiono w tabeli 7.

**Tabela 7.** Otrzymywanie metodą krystalizacji związku Hs\_1 (kwas lekanorowy)

Gatunek porostu	Typ wyciągu	Rozpuszczalnik	Masa wyciągu [mg]	Objętość rozpuszczalnika [ml]
<i>H. scalaris</i>	acetonowy	aceton:woda (8:2)	10	5
			31	20
Suma			41	25

#### 4.3.3.7. Izolacja związków z *Cladonia uncialis*

##### Izolacja kwasu usninowego

Kwas usninowy otrzymano z wyciągów heptanowych przygotowanych z *C. uncialis* dwiema metodami (tabela 1). Każdy z otrzymanych wyciągów zagęszczono w kolbie do suchej pozostałości a następnie odmyto kilkoma, małymi (10-20 ml) porcjami heptanu. Uzyskany w ten sposób nadsącz oddzielono od właściwego wyciągu pipetą Pasteur'a. Pozostałe w kolbie wyciągi rozpuszczono w mieszaninie heptanu i dichlorometanu (1:2), a następnie przeniesiono do krystalizatora. Kwas usninowy krystalizował, w miarę odparowywania rozpuszczalnika, w postaci drobnych, seledynowożółtych igielek.

##### Izolacja kwasu skwamatowego

Kwas skwamatowy pozyskano z obu wyciągów acetonowych otrzymanych z plech *C. uncialis*, które wcześniej poddano ekstrakcji heptanem (tabela 1, rozdział 4.3.1.1.). Zagęszczony do sucha wyciąg przemyto kilkoma małymi (10-20 ml) porcjami dichlorometanu (odmycie pozostałości kwasu usninowego). Następnie wyciąg odmyto niewielkimi ilościami octanu etylu i acetonu, które oddzielono używając pipety Pasteur'a. Osad zalano niewielką porcją octanu etylu i umieszczono w łaźni ultradźwiękowej w temperaturze 30-35°C. Uzyskaną w ten sposób zawiesinę związku (osad nie rozpuścił się) przeniesiono pipetą do probówek. Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano białą, jednorodną substancję w postaci bezpostaciowego proszku.

#### 4.3.4. Identyfikacja związków

W celu identyfikacji wyizolowanych związków, wykorzystano metody chromatograficzne (TLC) (rozdział 4.3.2.1.), a także techniki analizy instrumentalnej: spektroskopię UV, spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR oraz spektrometrię mas (MS).

##### 4.3.4.1. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

Analizy NMR wykonano w Laboratorium NMR Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Widma 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR) i 2D (HSQC) NMR zostały wykonane na aparacie Bruker AVANCE 400 MHz przy częstotliwości 400

MHz dla  $^1\text{H}$ , HSQC i 100 MHz dla  $^{13}\text{C}$  NMR. Widma rejestrowano po rozpuszczeniu substancji w odpowiednim rozpuszczalniku deuterowanym (chloroform- $d$ , aceton- $d_6$ , DMSO- $d_6$  wobec TMS). Do badań używano po około 5 mg substancji.

#### 4.3.4.2. Spektroskopia w nadfiolecie (UV)

Analizę w nadfiolecie wykonano w spektrofotometrze UV/VIS Perkin Elmer Lambda 35, przy użyciu programu komputerowego UV WinLab 2.80. Pomiar prowadzono w 0,5 cm kuwetach kwarcowych. Widma związków wykreślono, po rozpuszczeniu próbek w metanolu lub chloroformie, otrzymując stężenie  $2,5 \times 10^{-5}$  mol/l.

#### 4.3.4.3. Spektrometria mas (MS)

Analizy masowe przeprowadzono w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN<sup>3</sup> lub w Środowiskowym Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu<sup>4</sup>. Widma masowe zarejestrowano stosując technikę ESI na spektrometrze Burker micrOTOF-q (PAN) a także Waters/Micromass (Manchester, UK) typ ZQ (UAM).

#### 4.3.4.4. Pomiar skręcalności optycznej

Pomiar skręcalności optycznej przeprowadzono w Zakładzie Stereochemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu. Pomiar przy długości fali  $\lambda = 589$  nm wykonano w polarymetrze firmy Perkin-Elmer, natomiast widma dichroizmu kołowego wykonano w acetonitrylu za pomocą dichrografu J-810 Jasco<sup>5</sup>.

#### 4.3.5. Analiza ilościowa

##### 4.3.5.1. Oznaczanie zawartości sumy polifenoli z odczynnikiem Folin-Ciocalteu

Całkowitą zawartość sumy polifenoli oznaczono metodą kolorymetryczną z użyciem odczynnika Folin-Ciocalteu. W wyniku zmieszania składników odczynnika Folin-Ciocalteu powstaje najprawdopodobniej heteropolifosfowolframian molibdenu. Odczynnik w wyniku reakcji ze związkami o strukturze fenoli, która zachodzi tylko

<sup>3</sup> Analizy metodą spektrometrii masowej (MS) wykonał dr Łukasz Marczak.

<sup>4</sup> Analizy metodą spektrometrii masowej (MS) wykonał dr Tomasz Kozik.

<sup>5</sup> Analizę skręcalności optycznej wykonał dr hab. K. Kacprzak.



w środowisku alkalicznym (pH 10) ulega redukcji, co prowadzi do powstania niebiesko zabarwionego związku ( $\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40}$ )<sup>4-</sup> [Cybul i Nowak 2008]. Powstający w reakcji barwny roztwór wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali około  $\lambda = 760$  nm. Intensywność mierzonej absorpcji jest proporcjonalna do stężenia polifenoli w badanej próbce. W pracy zastosowano modyfikację metody opisaną przez Dóka i Bicanic [Dóka i Bicanic 2002].

### Odczynniki

- DMSO
- kwas galusowy
- odczynnik Folin-Ciocalteu
- woda destylowana
- 20% roztwór węgla sodu ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (w/v)

### Przygotowanie roztworu wzorcowego kwasu galusowego

Odważono 10 mg wzorcowego kwasu galusowego do kolby miarowej o pojemności 10 ml, rozpuszczono w niewielkiej objętości DMSO i uzupełniono DMSO do współmierności, uzyskując roztwór o stężeniu 1 mg/ml. Do 7 kolbek miarowych o pojemności 5 ml dodano odpowiednio 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 ml roztworu podstawowego kwasu galusowego i uzupełniono do współmierności, co pozwoliło otrzymać roztwór kwasu galusowego w stężeniach 0,2-0,8 mg/ml.

### Przygotowanie roztworów badanych wyciągów

Do oceny zawartości sumy polifenoli wybrano wyciągi acetonowe i metanolowe, przeznaczone do badań aktywności biologicznej. Stężenia wyciągów do badań ustalono doświadczalnie, w taki sposób by wartość mierzonej absorpcji zawierała się w pomiędzy 0,3 – 0,8. Badane, suche wyciągi odważono i rozpuszczano w DMSO, otrzymując pożądane stężenia (tabela 8).

**Tabela 8.** Stężenia wyciągów i kwasu galusowego przygotowane do oznaczenia zawartości sumy polifenoli metodą z odczynnikiem Folin-Ciocalteu

Wzorzec/wyciąg	Stężenie do badań [mg/ml]						
	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8
<b>kwas galusowy</b>	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8
	Stężenie do badań wyciągu acetonowego [mg/ml]			Stężenie do badań wyciągu metanolowy [mg/ml]			
<i>H. physodes</i>	2,0			3,0			
<i>P. sulcata</i>	5,0			10,0			
<i>H. scalaris</i>	1,0			2,0			
<i>C. uncialis</i>	10,0			15,0			

### Przebieg oznaczenia

Do kolbek miarowych o pojemności 10 ml owiniętych folią aluminiową, przeniesiono 4 ml wody destylowanej oraz 0,1 ml roztworu badanego wyciągu lub wzorcowego kwasu o odpowiednim stężeniu. Do każdej kolbki dodawano następnie po 0,5 ml odczynnika Folin-Ciocalteu, a po 1 minucie 2,0 ml 20% węglańu sodu i uzupełniono wodą destylowaną do objętości 10 ml. Jednocześnie przygotowano próbę ślepą, zastępując roztwór badany wodą (7,4 ml wody destylowanej + 0,1 ml DMSO + 0,5 ml odczynnika Folin-Ciocalteu + 2,0 ml węglańu sodu). Po upływie 30 minut od dodania węglańu sodu (inkubacja w temp. pokojowej), mierzono absorbancję poszczególnych prób przy długości fali  $\lambda = 760$  nm. Pomiaru dokonywano w jednorazowych kuwetach plastikowych. Obliczenia zawartości sumy polifenoli wykonano na podstawie krzywej kalibracyjnej sporządzonej dla kwasu galusowego. Ilość wyników dla każdego ze stężeń kwasu galusowego krzywej wzorcowej  $n = 6$ , dla badanych próbek wyciągów  $n = 12$ .

#### 4.3.5.2. Oznaczenie zawartości kwasu (-)-usninowego w wyciągach z *C. uncialis* metodą HPLC

Oznaczenie zawartości kwasu (-)-usninowego wykonano w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie<sup>6</sup>. Analizę przeprowadzono z zastosowaniem chromatografu cieczowego Dione, z detektorem PDA 1000 UV-VIS, pompą P 680, termometrem TCC 100, autosamplerem Asi 100 oraz przy użyciu programu sterującego CHROMELEON<sup>®</sup> 6.60.

<sup>6</sup> Badanie przeprowadziła dr n. farm. Agnieszka Galanty

**Warunki prowadzonej analizy [Manojlović i wsp. 2010, zmodyfikowane]**

- temperatura kolumny: 25°C
- objętość nastrzyku: 20µl
- detekcja UV  $\lambda = 250$  nm
- faza stacjonarna:
  - kolumna Hypersil Gold C-18 (5µm, 250 x 4,6 mm: Thermo EC)
  - prekolumna Hypersil Gold C-18 (5µm, 10 x 4 mm: Thermo EC)
- faza ruchoma:
  - A woda z 1% roztworem 0,1N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (v/v),
  - B metanol
  - A:B 15:85
- prędkość przepływu: 1 ml/min
- czas analizy: 15 min
- wzorzec: kwas (-)-usninowy

**Przygotowanie roztworów wzorcowego kwasu (-)-usninowego**

Odważono dokładnie, około 5 mg wzorcowego kwasu (-)-usninowego i rozpuszczono odpowiednio w 5 ml chloroformu czystości HPLC (stężenie 1mg/ml). Następnie sporządzono szereg rozcieńczeń z roztworu wyjściowego, uzyskując stężenia: 0,5; 0,25; 0,125 i 0,0625 mg/ml. Pobrano strzykawką 1 ml otrzymanych roztworów i przesączono przez sączi membranowe Titan 2 HPLC filter – Nylon Membrane o średnicy porów 0,45 µm, bezpośrednio do wialsów. Uzyskane próbki analizowano w warunkach opisanych powyżej. Każda próbka analizowana była trzykrotnie (n = 3).

**Przygotowanie roztworów badanych wyciągów**

Odważono dokładnie, po około 5 mg wyciągów z *C. uncialis* przeznaczonych do badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej (wyciąg heptanowy, eteru dietylowego, acetonowy, metanolowy) oraz właściwości antyoksydacyjnych i cytotoksycznych (wyciąg acetonowy) (tabela 2, rozdział 4.3.1.2.) i rozpuszczano w 5 ml chloroformu czystości HPLC (stężenie 1 mg/ml). Pobrano strzykawką 1 ml otrzymanych roztworów i przesączono przez sączi membranowe Titan 2 HPLC filter – Nylon Membrane o średnicy porów 0,45 µm, bezpośrednio do wialsów. Uzyskane próbki analizowano w warunkach opisanych powyżej. Każda próbka analizowana była trzykrotnie (n = 3).

### 4.3.6. Badania aktywności biologicznej

#### 4.3.6.1. Badania aktywności antyoksydacyjnej

##### 4.3.6.1.1. Przygotowanie roztworów związków i wyciągów do badań aktywności antyoksydacyjnej

Suche wyciągi acetonowe (tabela 2, rozdział 4.3.1.2.) z badanych porostów dokładnie odważono i rozpuszczono w DMSO, otrzymując stężenie wyjściowe, które następnie posłużyło do sporządzenia kolejnych rozcieńczeń. Stężenia do badań różniły się w zależności od typu testu oraz analizowanego związku lub wyciągu (metoda z wolnym rodnikiem DPPH<sup>•</sup>, tabela 9; metoda z odczynnikiem FRAP, tabela 10).

**Tabela 9.** Stężenia wyciągów i substancji wzorcowych przygotowane do badań aktywności antyoksydacyjnej metodą z odczynnikiem DPPH

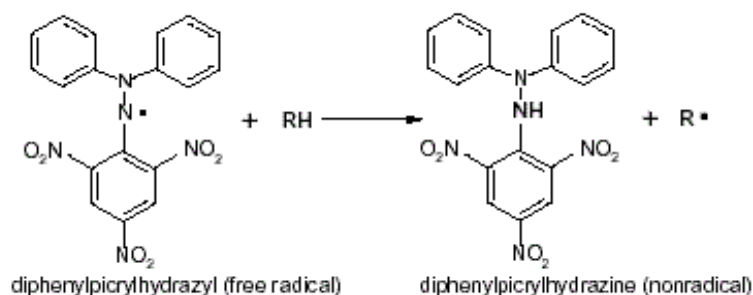
Stężenie do badań [mg/ml]											
Wzorce	BHA	0,75	0,375	0,1875	0,0937	0,06	0,03	-	-	-	-
	Witamina C	0,23	0,16	0,132	0,099	0,066	0,033	-	-	-	-
Wyciągi acetonowe	<i>H. physodes</i>	6,0	3,0	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,0937			-
	<i>P. sulcata</i>	48,0	24,0	12,0	6,0	3,0	1,5	0,75	0,375	0,187	0,094
	<i>H. scalaris</i>	12,0	6,0	3,0	1,5	0,75	0,375	0,1875	-	-	-
	<i>C. uncialis</i>	12,0	6,0	3,0	1,5	0,75	0,375	0,1875	-	-	-

**Tabela 10.** Stężenie wyciągów i witaminy C do badań aktywności antyoksydacyjnej metodą z odczynnikiem FRAP

Stężenie do badań [mg/ml]						
Wzorzec	Witamina C	0,75	0,625	0,5	0,25	0,125
	<i>H. physodes</i>	5,0	2,5	1,25	0,625	0,3125
Wyciągi acetonowe	<i>P. sulcata</i>	5,0	-	-	-	-
	<i>H. scalaris</i>	5,0	-	-	-	-
	<i>C. uncialis</i>	5,0	-	-	-	-

#### 4.3.6.1.2. Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej za pomocą analizy z rodnikiem DPPH<sup>•</sup>

Zastosowana metoda opiera się na ocenie zmiany zabarwienia alkoholowego roztworu rodnika DPPH<sup>•</sup> z purpurowego ( $\lambda = 520$  nm) na jasnożółty. Rodnik DPPH<sup>•</sup> wychwytuje elektrony od substancji przeciwutleniającej, co powoduje rejestrowaną spektrofotometrycznie zmianę barwy [Molyneux 2003]. Wykonywane w niniejszej pracy oznaczenie zostało przeprowadzone metodą opisaną przez Annegowda i wsp. [Annegowda i wsp. 2010].



**Rycina 14.** Przebieg reakcji DPPH z substancją o charakterze antyoksydanta (RH).

#### Odczynniki

- 0,1 mM roztwór rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyny w metanolu

#### Przygotowanie roztworu rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyny (DPPH<sup>•</sup>)

Roztwór DPPH<sup>•</sup> ( $M = 394,32$ ) przygotowano w stężeniu 0,1 mM. Do kolbki miarowej o pojemności 100 ml owiniętej w folię aluminiową, odważono 3,94 mg rodnika DPPH<sup>•</sup> i uzupełniono metanolem do współmierności. Roztwór rodnika DPPH<sup>•</sup> przygotowano w dzień prowadzenia analizy, na 1-2 godzin przed wykonaniem oznaczenia. Roztwór przygotowanego w ten sposób odczynnika wykazywał  $A_{maks}$  przy  $\lambda = 517$  nm.

#### Przebieg oznaczenia

Do 2,9 ml metanolowego roztworu rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylowego (DPPH<sup>•</sup>) dodawano 0,1 ml roztworu wyciągu lub analizowanych wzorców o odpowiednim stężeniu, rozpuszczonych w DMSO (tabela 9). Próby do badań przygotowywano w zamkniętych korkiem fiolkach owiniętych folią aluminiową.

Pomiar absorbancji wykonywano przy długości fali  $\lambda = 517$  nm, w jednorazowych (jednocentymetrowych) kuwetach plastikowych po 30 minutach inkubacji ( $A_{30}$ ) (temperatura pokojowa), wobec próby odniesienia (2,9 ml metanolu i 0,1 ml DMSO). Absorbancję próby kontrolnej (2,9 ml roztworu DPPH<sup>•</sup> i 0,1 ml DMSO) mierzono na początku i na końcu analizy. Średnie arytmetyczne absorbancji dla DPPH<sup>•</sup> stanowiły wartość  $A_{DPPH}$ .

Zdolność redukowania rodnika DPPH<sup>•</sup> (aktywność antyoksydacyjna, AA%) przez badane wyciągi oraz substancje wzorcowe obliczano wg wzoru:

$$AA\% = [(A_{DPPH} - A_{30})/A_{DPPH}] \times 100$$

gdzie:  $A_{30}$  – absorbancja badanej próbki,  $A_{DPPH}$  – absorbancja próby kontrolnej

Dla otrzymanych wyników została wyznaczona wartość  $IC_{50}$ . Wartość tę obliczono z równania opisującego wykres zależności stopnia zmiatania rodnika DPPH<sup>•</sup> (%) od stężenia wyciągu/wzorca w badanej próbce. Otrzymane wyniki zostały też wyrażone jako równoważnik witaminy C.

#### 4.3.6.1.3. Oznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej w oparciu o redukcję jonów żelaza (III) (FRAP)

Metoda oznaczenia zdolności redukowania jonów żelaza (ang. *ferric ion reducing antioxidant parameter* – FRAP) umożliwia określenie właściwości redukowania jonów żelaza przez badaną substancję, co jest miarą jego zdolności antyoksydacyjnych. W niskim pH (zapewnienie rozpuszczalności soli  $Fe^{+3}$ ), jony żelaza w kompleksie z TPTZ (2,4,6-tris(2-pirydylo)-1,3,5-triazyna) ( $Fe^{+3}$ -TPTZ) pod wpływem substancji o właściwościach utleniających ulegają redukcji do  $Fe^{+2}$ . Reakcja ta przebiega z równoczesnym wytworzeniem niebieskiego zabarwienia, którego zmianę bada się mierząc absorbancję roztworu przy długości fali  $\lambda = 593$  nm. Reakcja może być używana do badania substancji, które nie wykazują absorpcji w tym samym paśmie analitycznym [Cybul i Nowak 2008]. W pracy zastosowano modyfikację metody opisanej przez Arnous i wsp. [Arnous i wsp. 2002].

#### Odczynniki

- 1mM roztwór 2,4,6-tripirydylo-S-triazyny w 0,05 M HCl (TPTZ 2,4,6-tripirydylo-S-triazyny)\*

- 3mM roztwór  $\text{FeCl}_3$  w 5mM kwasie cytrynowym ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )\*\*
- odczynnik FRAP (mieszanina TPTZ i  $\text{FeCl}_3$ )\*\*\*
- 0,05 M HCl z odważki analitycznej kwas solny (POCH)

\*Przygotowanie 1mM roztworu 2,4,6-tripirydylo-S-triazyny (TPTZ) w 0,05 M HCl

Roztwór TPTZ ( $M = 312,33$ ) przygotowano w stężeniu 1 mM. Do kolbki miarowej owiniętej w folię aluminiową, o pojemności 100 ml, odważono 31,24 mg TPTZ i uzupełniono 0,05 M HCl do współmierności.

\*\*Przygotowanie 3 mM roztworu  $\text{FeCl}_3$  w 5mM kwasie cytrynowym

Roztwór  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $M = 270,30$ ) przygotowano w stężeniu 3 mM. Do kolbki miarowej owiniętej w folię aluminiową, o pojemności 25 ml, odważono 20,3 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  i uzupełniono 5 mM HCl do współmierności. Roztwór  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  przygotowano w dzień przeprowadzenia analizy na 1-2 godzin przed wykonaniem oznaczenia.

\*\*\*Przygotowanie mieszaniny TPTZ i  $\text{FeCl}_3$  (FRAP)

Odczynnik FRAP otrzymano przez zmieszanie 0,9 ml TPTZ i 0,05 ml  $\text{FeCl}_3$  (na próbę). Roztwór następnie ogrzano w łaźni wodnej do temperatury  $37^\circ\text{C}$  i wykorzystywano do badań.

**Przebieg oznaczenia**

Do 0,04 ml acetonu dodawano 0,01 ml odpowiedniego stężenia wyciągu lub analizowanego wzorca (witamina C) (tabela 10). Następnie w 30-sekundowych odstępach czasu do badanych prób dodawano po 0,95 ml mieszaniny TPTZ z  $\text{FeCl}_3$  i inkubowano 30 min w temp.  $37^\circ\text{C}$  (łaźnia wodna). Pomiar absorbancji wykonywano przy długości fali  $\lambda = 620$  nm wobec próby odniesienia (0,95 ml mieszaniny TPTZ i  $\text{FeCl}_3$  oraz 0,1 ml DMSO). Próby do badań przygotowano w probówkach Eppendorfa owiniętych folią aluminiową a pomiaru dokonywano w jednorazowych, jednocentymetrowych kuwetach plastikowych. Potencjał antyoksydacyjny przeliczono na aktywność witaminy C, na podstawie sporządzonej krzywej kalibracyjnej (równoważnik witaminy C). Ilość wyników do obliczanej średniej z każdej badanej próbki wynosiła  $n = 12$ .

#### 4.3.6.2. Badania aktywności cytotoksycznej

Oznaczenie aktywności cytotoksycznej wykonano w Katedrze i Zakładzie Toksykologii UM w Poznaniu<sup>7</sup>. Badanie przeprowadzono stosując różne typy testów kolorymetrycznych (MTT, CV, NRU). Stopień zmiany zabarwienia określano mierząc absorbancję barwnych roztworów przy odpowiedniej długości fali wobec próby odniesienia.

##### 4.3.6.2.1. Hodowla komórek

###### Podłoża wzrostowe

###### LnCaP, CaLu-1, HepG2, MDA-MB-231, T47D, MCF7

- DMEM lub RPMI (T47D)
- 2,5 mM L-glutamina
- 10% FBS
- 1% penicylina/streptomycyna

###### MCF-10A

- DMEM
- 10% FBS
- 5% surowica końska
- 0,02% roztwór EGF o stężeniu 100ug/ml
- 0,05% roztwór hydrokortyzonu o stężeniu 1mg/ml
- 0,1% roztwór insuliny o stężeniu 10mg/ml
- 1% penicylina/streptomycyna

Komórki (rozdział 4.1. str. 88) hodowano w butelkach, które umieszczano w inkubatorze 490-ICE, w temperaturze 37°C, 100% wilgotności i 5% CO<sub>2</sub>. W zależności od rodzaju hodowanych komórek stosowano odpowiednie dla nich podłoża wzrostowe. Po uzyskaniu odpowiedniej liczby komórek, aby odkleić komórki od podłoża poddawano je procesowi trypsynizacji. W tym celu, po usunięciu pożywki, komórki przemywano dwukrotnie PBS (buforem fosforanowym) i dodawano 10% mieszaninę trypsyny z EDTA, a następnie inkubowano kilka minut w inkubatorze w opisanych

---

<sup>7</sup> Analizy wykonywałam we współpracy z panem dr hab. Markiem Muriasem.



wyżej warunkach. Działanie trypsyny hamowano przez dodanie FBS/medium. Komórki, po zmieszaniu równych ilości błękitu trypanu i zawiesiny komórek, zliczano przy pomocy mikroskopu świetlnego i komory Bürkera. Uzyskany wynik umożliwił przygotowanie zawiesiny komórek o odpowiednim stężeniu. Komórki wysiewano na płytki 96-cio dołkowe w ilości 20000 komórek/dołek. Przygotowane w ten sposób płytki umieszczano w inkubatorze na czas około 24h.

#### 4.3.6.2.2. Przygotowanie roztworów związków i wyciągów do badań aktywności cytotoksycznej

Związki i suche wyciągi acetonowe rozpuszczono w DMSO, otrzymując stężenie 1000 razy wyższe od najwyższego z badanych (dla związków i wyciągów było to odpowiednio: 100 mM (lub 25 mM dla atranoryny i kwasu (+)-usninowego w skринingu) i 100 mg/ml. W przypadku, gdy badany związek lub wyciąg został wyselekcjonowany do dalszych badań, stężenie to było wyjściowe do przygotowania serii stężeń od 1,5625 do 100  $\mu$ M bądź 1,5625 do 100  $\mu$ g/ml, odpowiednio dla związków lub wyciągów. Wyciągi i związki oraz linie komórkowe do badań aktywności cytotoksycznej zamieszczono w tabeli 11.

**Tabela 11.** Wyciągi, związki oraz linie komórkowe do badań aktywności cytotoksycznej

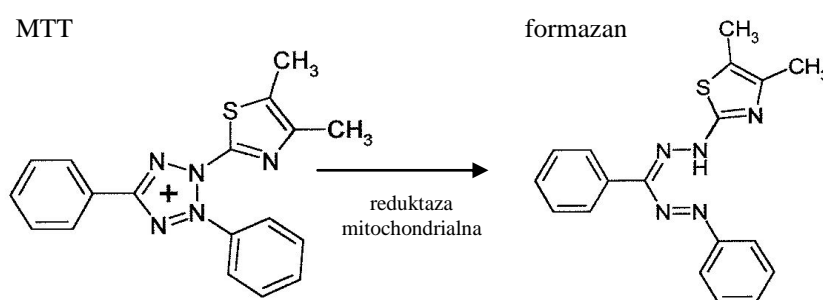
	Substancje badane	Linia komórkowa
Wyciąg acetonowy	<i>H. physodes</i>	LnCaP, CaLu-1, HepG2, MDA-MB-231, T47D, MCF7
	<i>P. sulcata</i>	LnCaP, CaLu-1, HepG2, MDA-MB-231
	<i>H. scalaris</i>	LnCaP, CaLu-1, HepG2, MDA-MB-231
	<i>C. uncialis</i>	LnCaP, CaLu-1, HepG2, MDA-MB-231
Związek	atranoryna <sup>8</sup>	LnCaP, CaLu-1, HepG2, MDA-MB-231
	kwas lekanorowy	LnCaP, CaLu-1, HepG2, MDA-MB-231
	kwas skwamatowy	LnCaP, CaLu-1, HepG2, MDA-MB-231
	kwas fyzodowy	LnCaP, CaLu-1, HepG2, MDA-MB-231, T47D, MCF7, MCF-10A
	kwas salazynowy	LnCaP, CaLu-1, HepG2, MDA-MB-231
	kwas (+)-usninowy <sup>9</sup>	LnCaP, CaLu-1, HepG2, MDA-MB-231, T47D, MCF7, MCF-10A
	kwas (-)-usninowy	LnCaP, CaLu-1, HepG2, MDA-MB-231, T47D, MCF7, MCF-10A

<sup>8</sup> związek handlowy

<sup>9</sup> związek pochodzący z kolekcji Katedry i Zakładu Farmakognozji

#### 4.3.6.2.3. Ocena cytotoksyczności badanych związków za pomocą testu MTT

Test MTT pozwala oszacować stopień cytotoksyczności badanej substancji na podstawie pomiaru zdolności oksydoredukcyjnej żywych komórek. Metoda wykorzystuje fakt, że znajdująca się w żywych komórkach dehydrogenaza mitochondrialna redukuje pomarańczową sól tetrazolową (MTT) do fioletowego formazanu. Enzymy z grupy dehydrogenaz zdolne są do przeprowadzenia reakcji, której skutkiem jest otwarcie pierścienia tetrazolowego. Oznaczenie aktywności cytotoksycznej opiera się na założeniu, że tylko żywe komórki redukują MTT do formazanu.



Rycina 15. Przebieg reakcji redukcji MTT do formazanu.

#### Odczynniki

- MTT (5mg/ml w PBS)
- SDS (10% roztwór SDS w 0,01 M HCl)

#### Przebieg oznaczenia

Po 24-godzinnej inkubacji płytki z wysianymi na nią wcześniej komórkami (20000 komórek/dolek), ściągnięto medium i dodawano przygotowane roztwory związków w odpowiednich stężeniach. Po kolejnej, trwającej 72 godziny inkubacji ściągnięto medium z rozpuszczonymi w nim substancjami i dodawano mieszaninę medium i roztworu MTT (150:20  $\mu$ l). Równocześnie sporządzono próbę ślepa, wpuszczając do studzienek bez komórek mieszaninę medium i MTT. Tak przygotowane płytki inkubowano cztery godziny, a następnie wirowano i ściągano mieszaninę medium i MTT. Dalej, do każdej studzienki dodano 150  $\mu$ l SDS i celem rozpuszczenia powstałych fioletowych kryształków formazonu wytrząsano na wytrząsarce (3 min, 650 RPM). Pomiar absorbancji przeprowadzono za pomocą czytnika płytek (Elx-800 BioTek, USA), przy długości fali  $\lambda = 570$  nm połączonym z komputerem

z oprogramowaniem pozwalającym na automatyczne transferowanie danych. Ilość wyników otrzymanych dla każdej badanej próbki wynosiła  $n = 6$  [Berridge i wsp. 2005].

#### **4.3.6.2.4. Ocena cytotoksyczności badanych związków za pomocą testu z fioletem krystalicznym**

Dodany do badanych komórek roztwór fioletem krystalicznego jest gromadzony w jądrze komórkowym. Barwnik, po rozpuszczeniu, wskazuje na ilość jądrowego DNA, czyli koreluje z liczbą żywych komórek. Absorbancję barwnych roztworów mierzy się przy długości fali  $\lambda = 540$  nm.

#### **Odczynniki**

- fiolet krystaliczny (0,1% roztwór w 10% etanolu)
- PBS<sup>++</sup>
- 50% lodowaty kwas octowy

#### **Przygotowanie roztworu PBS<sup>++</sup>**

Do 1000 ml PBS dodano 1 ml roztworu jonów  $Mg^{2+}$  (46,8 mg/l) i 1 ml roztworu jonów  $Ca^{2+}$  (99,6 mg/l).

#### **Przebieg oznaczenia**

Po 24-godzinnej inkubacji płytki z wysianymi na nią wcześniej komórkami (20000 komórek/dołek), ściągnięto medium z każdej studzienki a następnie przepłukano 2 razy 100  $\mu$ l roztworu PBS\* z dodatkiem  $Mg^{2+}$  i jonów  $Ca^{2+}$ . Do studzienek dodano 50  $\mu$ l/dołek roztworu fioletem krystalicznego (0,1% roztwór w 10% etanolu). Równocześnie przygotowano próbę ślepą wpuszczając do studzienek bez komórek roztwór fioletem krystalicznego. Płytki inkubowano 10 minut w pokojowej temperaturze, następnie ściągnięto roztwór fioletem i po raz kolejny przepłukano 2 razy dołki 100  $\mu$ l roztworem PBS. Dalej do każdej studzienki dodano 100  $\mu$ l 50% lodowatego kwasu octowego i inkubowano płytki 10 minut na wytrząsarce 650 RPM. Pomiar absorbancji przeprowadzono za pomocą czytnika płytek, przy długości fali  $\lambda = 540$  nm, połączonego z komputerem i oprogramowaniem pozwalającym na automatyczne transferowanie danych. Ilość wyników dla każdej badanej próbki wynosiła  $n = 6$  [Chiba i wsp. 1998 z modyfikacjami].

#### 4.3.6.2.5. Ocena cytotoksyczności badanych związków za pomocą testu z czerwienią obojętną

Metoda pomiaru cytotoksyczności z zastosowaniem czerwieni obojętnej (NR) wykorzystuje zdolność gromadzenia się odczynnika w lizosomach żywych komórek. W przypadku gdy komórki są uszkodzone lub martwe nie są do tego zdolne. Test ten ocenia integralność błon komórkowych.

#### Odczynniki

- czerwień obojętna (NR) roztwór wyjściowy: 10 mg NR/0,1 ml DMSO (stężenie badane w medium 100 µg/ml = 10 mg/100 ml)
- PBS
- mieszanina: etanol/kwas octowy (50%/1%; 1:1)

#### Przebieg oznaczenia

Po 24-godzinnej inkubacji płytki z wysianymi na nią wcześniej komórkami (20000 komórek/dolek), ściągnięto medium z każdej studzienki a następnie dodano po 150 µl przygotowanego wcześniej medium z czerwienią obojętną (NR). Płytki inkubowano 2 h w inkubatorze. Po tym czasie ściągnięto roztwór NR i przepłukano dołki 2 razy 100 µl roztworu PBS. Następnie do każdej studzienki dodano po 100 µl roztworu etanol/kwas octowy (50%/1%) i wytrząsano delikatnie przez 10 minut na wytrząsarce, stosując niską wartość RPM. Pomiar absorbancji przeprowadzono za pomocą czytnika płytek, przy długości fali  $\lambda = 540$  nm [Fotakis i Timbrell 2006]. Ilość wyników dla każdej badanej próbki wynosiła  $n = 6$ .

#### 4.3.7. Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej

Oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej wykonano w Zakładzie Farmakologii i Biologii Doświadczalnej Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu<sup>10</sup>. Badanie zostało przeprowadzono za pomocą metody seryjnych rozcieńczeń, a parametrem świadczącym o sile działania przeciwdrobnoustrojowego była wartość MIC (ang. *Minimal Inhibitory Concentration*) – minimalne stężenie badanych substancji powodujące zahamowanie wzrostu drobnoustrojów.

<sup>10</sup> Badania przeprowadzili: prof. dr hab. Bogdan Kędzia i mgr Elżbieta Holderna-Kędzia.

#### 4.3.7.1. Drobnoustroje do badań

Badanie wykonano na wzorcowych, wrażliwych na antybiotyki szczepach z kolekcji mikrobiologicznych: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P (Gram-dodatnie), *Escherichia coli* PZH 26B6 (Gram – ujemne), *Candida albicans* PCM 1409 PZH (grzyby drożdżoidalne) oraz na izolowanych z ran szczepach klinicznych *Staphylococcus aureus* (MRSA) pozyskanych od pacjentów Wielospecjalistycznego Szpitala Miejskiego im. J. Strusia w Poznaniu: 1) *S. aureus* MRSA (rana oparzeniowa), 2) *S. aureus* MRSA (rana oparzeniowa), 3) *S. aureus* MRSA (rana pourazowa), 4) *S. aureus* MRSA (rana wewnątrzustrojowa), 5) *S. aureus* MRSA (rana pourazowa), 6) *S. aureus* MRSA (rana odleżynowa), 7) *S. aureus* MRSA (rana oparzeniowa), 8) *S. aureus* MRSA (rana oparzeniowa), 9) *S. aureus* MRSA (wydzielina z drzewa oskrzelowego), 10) *S. aureus* MRSA (wydzielina z drzewa oskrzelowego).

#### 4.3.7.2. Przygotowanie wyciągów do badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej

Suche wyciągi i badane związki (tabela 12) rozpuszczono w DMSO, otrzymując stężenie 10 mg/ml. Uzyskany roztwór stanowił stężenie wyjściowe do serii rozcieńczeń (0,001 – 1,0 mg/ml) przygotowanej przez dodanie płynnego podłoża Antibiotic Broth (Merck).

**Tabela 12.** Wyciągi, związki, substancje wzorcowe i rodzaje drobnoustrojów do badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej

Substancje badane		Badany szczep drobnoustrojów
Wyciągi	<i>H. physodes</i>	heksan, eter dietylowy, aceton, metanol <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Candida albicans</i>
	<i>P. sulcata</i>	heksan, eter dietylowy, aceton, metanol <i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>H. scalaris</i>	aceton, metanol <i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>C. uncialis</i>	heptan, eter dietylowy, aceton, metanol <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Candida albicans</i> MR <i>Staphylococcus aureus</i>
Związki	kwaskwammatowy	- <i>Staphylococcus aureus</i>
	kwask(-)-usninowy	- <i>Staphylococcus aureus</i>
Wzorce	amfoterycyna B	- <i>Candida albicans</i>
	chloramfenikol	- <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> MR <i>Staphylococcus aureus</i>

ang. MR- *Methicillin Resistant*

#### **4.3.7.3. Oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej metodą seryjnych rozcieńczeń**

##### **Przebieg oznaczenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej**

Do objętości 1ml sporządzonych uprzednio rozcieńczeń wyciągów badanych dodawano po 0,1 ml 18-godzinnych hodowli szczepów drobnoustrojów, zawierających  $10^5$  komórek/ml. Próbki inkubowano 18 godzin w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ , po tym czasie określono wartość MIC badanych substancji, czyli najmniejsze ich stężenie hamujące rozwój drobnoustrojów.

#### **4.4. Analiza statystyczna**

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono z wykorzystaniem programu GraphPad v.5.0 oraz Microsoft Excel 2007. Prezentowane wyniki doświadczeń stanowią średnią ( $\pm S$ ) z uzyskanych wyników przeprowadzonych pomiarów ( $n = 6$  lub  $n = 12$ ). Dla poszczególnych parametrów obliczono podstawowe parametry statystyczne (odchylenie standardowe, odchylenie standardowe średniej, współczynnik zmienności, przedział ufności). Parametry krzywych kalibracyjnych obliczono metodą najmniejszych kwadratów. Dla każdej z wyznaczonych krzywych określono liniowość, wyznaczając współczynnik  $R^2$ . W szacowaniu statystycznym za poziom istotności przyjęto  $p < 0,05$ .

## 5. Wyniki

### 5.1. Ekstrakcja

Wyciągi do badań z czterech analizowanych gatunków porostów otrzymano w wyniku ekstrakcji prowadzonych różnymi metodami, w różnych warunkach i za pomocą różnych rozpuszczalników o niejednorodnej polarności. Sposoby otrzymywania ekstraktów do badań fitochemicznych przedstawiono w rozdziale 4.3.1.1. (tabela 1), natomiast wyciągów do badań biologicznych w rozdziale 4.3.1.2. (tabela 2). Masę i rodzaj uzyskanych ekstraktów, a także wydajność przeprowadzonych procesów przedstawiono w tabelach poniżej (tabela 13 i 14).

**Tabela 13.** Masa uzyskanych wyciągów do badań fitochemicznych i wydajność procesu ekstrakcji

Gatunek porostu	Warunki ekstrakcji	Masa surowca [g]	Typ wyciągu	Masa wyciągów [mg]	Wydajność procesu ekstrakcji [%]	Całkowita masa wyciągów [g]	Całkowita wydajność ekstrakcji [%]
<i>H. physodes</i>	wytrząsanie temp. pokojowej	12,30	heksan aceton	34,7 798,0	0,28 6,49	<b>0,833</b>	<b>6,77</b>
<i>P. sulcata</i>	ultradźwięki	5,75	heksan octan etylu aceton	15,0 88,0 268,0	0,26 1,53 4,66	<b>0,371</b>	<b>6,45</b>
<i>H. scalaris</i>	ultradźwięki	1,23	aceton	232,0	18,86	<b>0,232</b>	<b>18,86</b>
<i>C. uncialis</i>	Soxhlet	77,15	heptan aceton	880,0 541,0	1,14 0,70	<b>1,42</b>	<b>2,38</b>
	ultradźwięki	32,55	heptan aceton	280,0 271,5	0,86 0,83	<b>0,55</b>	<b>1,68</b>

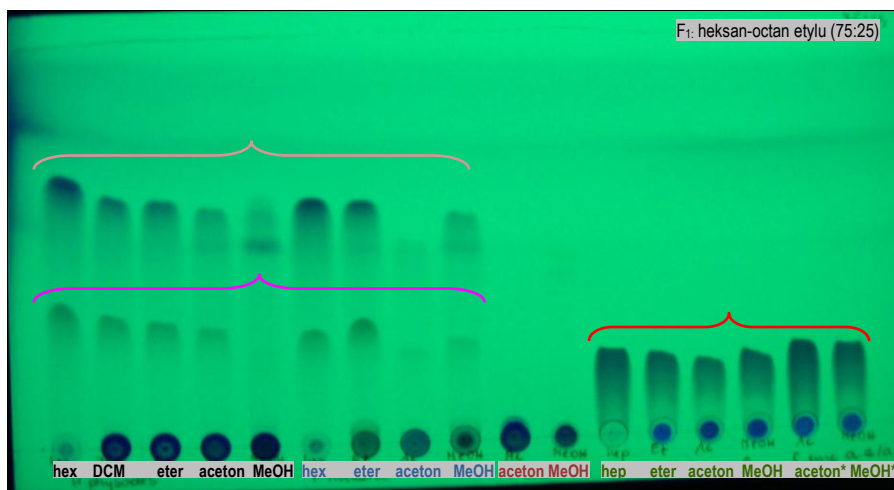
**Tabela 14.** Masa uzyskanych wyciągów do badań aktywności biologicznej i wydajność procesu ekstrakcji

Gatunek porostu	Warunki ekstrakcji	Masa surowca [g]	Typ wyciągu	Masa wyciągu [mg]	Wydajność ekstrakcji [%]
<i>H. physodes</i>	ultradźwięki; 30/35°C; 30 min.	14,00	heksan <sup>A</sup>	55,60	<b>0,40</b>
		2,44	eter dietylowy <sup>A</sup>	179,10	<b>7,34</b>
		4,01	aceton <sup>A,B,C</sup>	439,20	<b>10,95</b>
		4,02	metanol <sup>A,B</sup>	733,60	<b>18,25</b>
<i>P. sulcata</i>		7,01	heksan <sup>A</sup>	50,10	<b>0,71</b>
		6,00	eter dietylowy <sup>A</sup>	80,00	<b>1,33</b>
		4,20	aceton <sup>A,B,C</sup>	291,90	<b>6,95</b>
		4,12	metanol <sup>A,B</sup>	616,30	<b>14,96</b>
<i>H. scalaris</i>		1,16	aceton <sup>A,B,C</sup>	136,00	<b>11,72</b>
		1,03	metanol <sup>A,B</sup>	295,00	<b>28,64</b>
<i>C. uncialis</i>		9,81	heptan <sup>A,B</sup>	67,40	<b>0,69</b>
		9,47	eter dietylowy <sup>A,B</sup>	76,10	<b>0,72</b>
	4,88	aceton <sup>A,B</sup>	69,80	<b>1,43</b>	
	4,99	metanol <sup>A,B</sup>	270,60	<b>5,42</b>	
	15,00	aceton <sup>B,C</sup>	218,5	<b>1,46</b>	
10,01	metanol <sup>B</sup>	589,6	<b>5,89</b>		

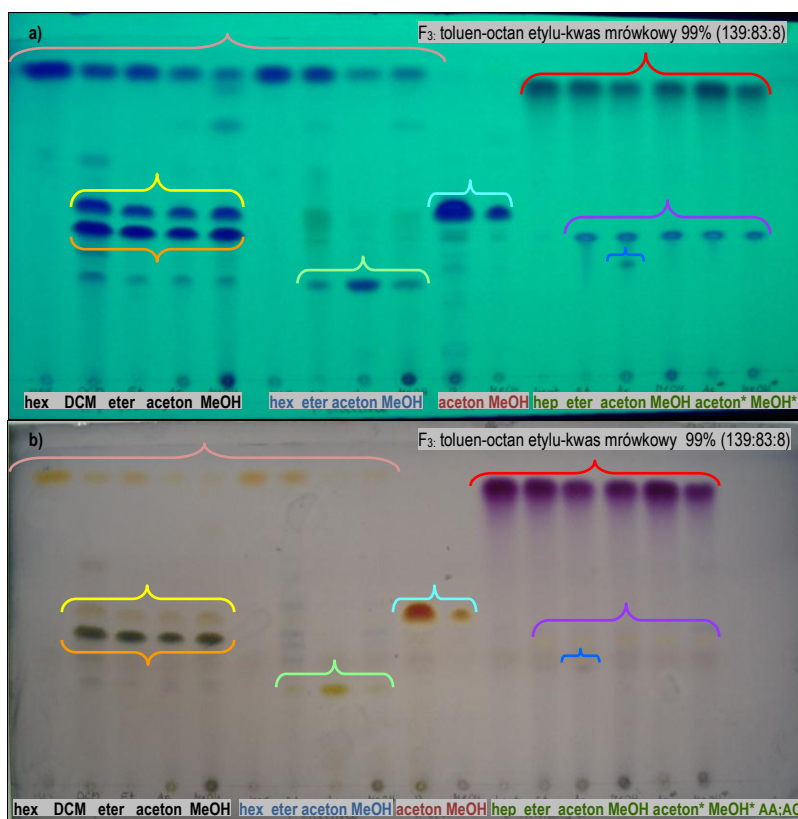
Typ badań: <sup>A</sup>aktywność przeciwdrobnoustrojowa; <sup>B</sup>badania ilościowe (Folin-Ciocalteu lub HPLC), <sup>C</sup>aktywność antyoksydacyjna i cytotoksyczna.

## 5.2. Analiza jakościowa otrzymanych wyciągów

W celu jakościowej oceny składu wyciągów otrzymanych do badań fitochemicznych i aktywności biologicznej prowadzono analizy TLC. Wyniki chromatografii cienkowarstwowej wyciągów do badań biologicznych prezentują ryciny zamieszczone poniżej (ryciny 16-19).

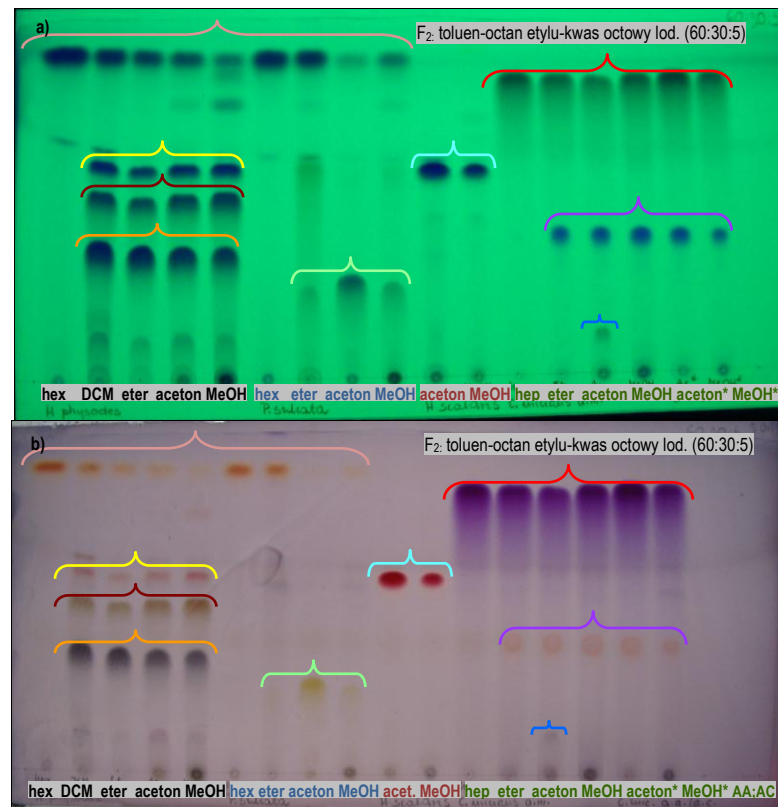


**Rycina 16.** Chromatogram (TLC; faza F<sub>1</sub>) wyciągów z: *H. physodes*, *P. sulcata*, *H. scalaris*, *C. uncialis*, otrzymanych do badań biologicznych w świetle UV<sub>254</sub>;  
Objaśnienia: ■ atranoryna, ■ chloroatranoryna, ■ kwas usninowy.



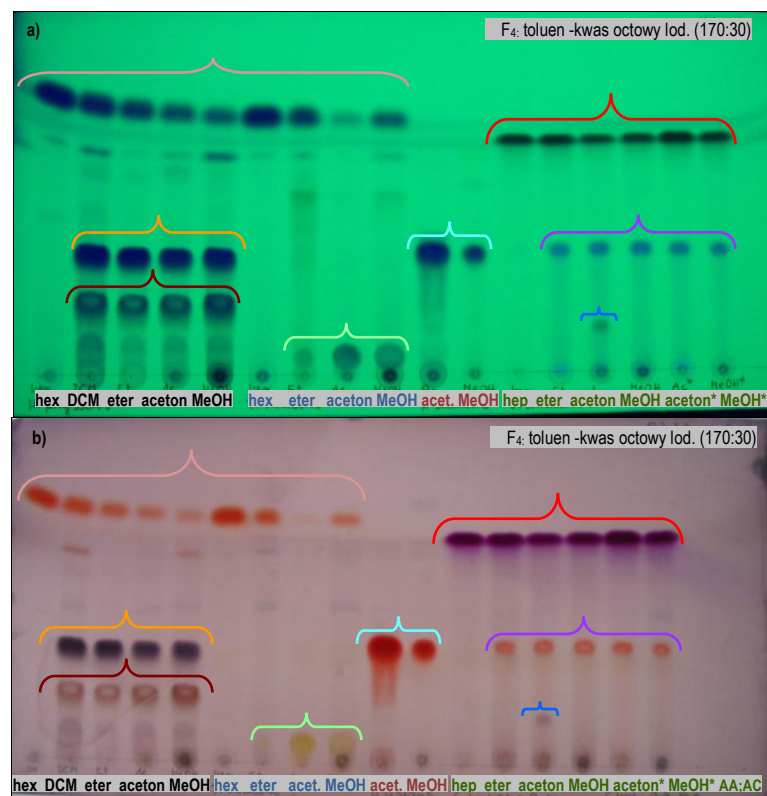
**Rycina 17.** Chromatogram (TLC; faza F<sub>3</sub>) wyciągów z: *H. physodes*, *P. sulcata*, *H. scalaris*, *C. uncialis*, otrzymanych do badań biologicznych w świetle: a) UV<sub>254</sub>, b) dziennym, po wywołaniu ANS.  
Objaśnienia: ■ atranoryna i chloroatranoryna, ■ kwas fizodowy ■ kwas fizodalowy i poch. k. fizodowego, ■ kwas salazynowy, ■ kwas lekanorowy, ■ kwas usninowy, ■ kwas skwamatowy, ■ kwas tamnolowy (?).





**Rycina 18.** Chromatogram (TLC; faza F<sub>2</sub>) wyciągów z: *H. physodes*, *P. sulcata*, *H. scalaris*, *C. uncialis*, otrzymanych do badań biologicznych w świetle: a) UV<sub>254</sub>, b) dziennym, po wywołaniu ANS.

Objaśnienia: ■ atranoryna i chloroatranoryna, ■ kwas fyzodowy, ■ kwas fyzodalowy ■ poch. k. fyzodowego ■ kwas salazynowy, ■ kwas lekanorowy, ■ kwas usninowy, ■ kwas skwamatowy, ■ kwas tamnolowy (?).



**Rycina 19.** Chromatogram (TLC; faza F<sub>4</sub>) wyciągów z: *H. physodes*, *P. sulcata*, *H. scalaris*, *C. uncialis*, otrzymanych do badań biologicznych w świetle: a) UV<sub>254</sub>, b) dziennym, po wywołaniu ANS.

Objaśnienia: ■ atranoryna i chloroatranoryna, ■ poch. k. fyzodowego, ■ kwas fyzodalowy i fyzodowy, ■ kwas salazynowy, ■ kwas lekanorowy, ■ kwas usninowy, ■ kwas skwamatowy, ■ kwas tamnolowy (?).

### 5.3. Izolacja związków

#### 5.3.1. Badania *Hypogymnia physodes*

Z wyciągu **heksanowego**, metodą krystalizacji otrzymano mieszaninę dwóch związków: atranoryny i chloroatranoryny – chlorowej pochodnej atranoryny.

Wyniki badań fitochemicznych nad wyciągiem **acetonowym** z *H. physodes* doprowadziły do uzyskania dwóch związków o strukturze depsydonów, charakteryzujących się zbliżonymi wartościami  $R_f$ . Uzyskane wyniki izolacji zaprezentowano poniżej.

##### 5.3.1.1. Izolacja związku Hp\_1 (kwas fizodowy)

Zastosowana metoda izolacji pozwoliła otrzymać 15 mg związku Hp\_1, przypuszczalnie **kwasy fizodowy**, który wykrystalizował z połączonych eluatów (24-30) z kolumny chromatograficznej, w postaci białych igiełek. Jednorodność otrzymanego związku potwierdzono badaniami TLC, natomiast tożsamość ustalono metodami spektroskopowymi (UV, MS, NMR) (rozdział 5.4.1.) Wyniki izolacji kwasu fizodowego przedstawiono w tabeli 15. Uzyskany związek przebadano też pod kątem aktywności cytotoksycznej (rozdział 5.8.).

**Tabela 15.** Masa wyizolowanego związku Hp\_1 (kwas fizodowy) i wartość współczynnika  $R_f$

Masa wyciągu [mg]	Wyizolowany kwas fizodowy [mg]	Wydajność [%]	Wartość współczynnika $R_f$ (kwas fizodowy)			
			F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>
350,0	15,0	4,3	-	0,54	0,53	0,29

##### 5.3.1.2. Izolacja związku Hp\_2 (kwas fizodalowy)

W wyniku preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej otrzymano jako bezpostaciowy proszek związek Hp\_2, przypuszczalnie **kwasy fizodalowy**. W wyniku prac otrzymano 6 mg związku, którego jednorodność potwierdzono badaniami TLC, natomiast tożsamość badaniami spektroskopowymi (NMR, UV) (rozdział 5.4.2.) a także analizą z użyciem spektrometrii mas (MS). Wyniki izolacji zawarto w tabeli 16.

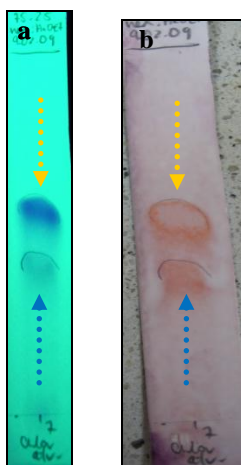
**Tabela 16.** Masa wyizolowanego związku Hp\_2 (kwas fizodalowy) i wartość współczynnika  $R_f$

Masa wyciągu [mg]	Wyizolowany kwas fizodalowy [mg]	Wydajność [%]	Wartość współczynnika $R_f$ (kwas fizodalowy)			
			F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>
26,5	6,0	22,6	-	0,33	0,47	0,30

### 5.3.1.3. Otrzymanie mieszaniny związków Hp\_3 i Hp\_4 (atranoryna i chloroatranoryna)

Analiza TLC wykazała, że po oczyszczeniu wyciąg heksanowy z *H. physodes* był mieszaniną dwóch związków (rycina 20, tabela 17). W wyniku prac uzyskano 35 mg drobnych, kremowozółtych kryształków mieszaniny związków Hp\_3 i Hp\_4, przypuszczalnie **atranoryny i chloroatranoryny**. W celu potwierdzenia tożsamości składumieszaniny wykonano badania identyfikacyjne (NMR, MS) (rozdział 5.4.3.).

**Tabela 17.** Masa otrzymanej mieszaniny Hp\_3+Hp\_4 (atranoryna i chloroatranoryna) i wartość współczynnika  $R_f$



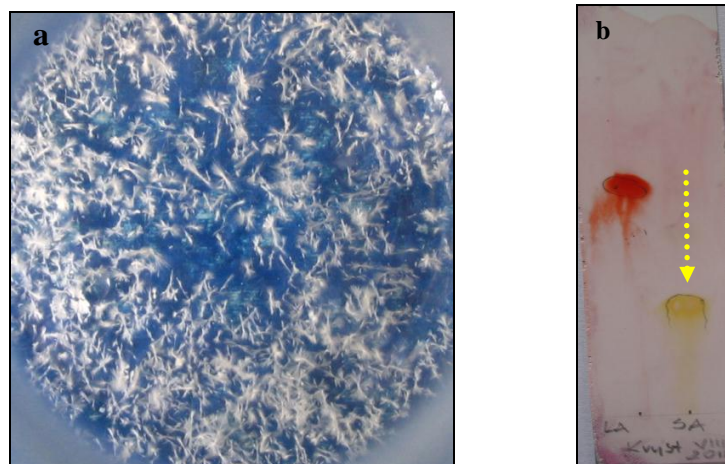
Wyizolowana atranoryna i chloroatranoryna [mg]	Wartość współczynnika $R_f$ (atranoryna i chloroatranoryna)			
	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>
35,0	0,57	0,89	0,88	0,71
	0,40			

**Rycina 20.** Chromatogramy (TLC) mieszaniny atranoryny i chloroatranoryny w świetle: a) UV<sub>254</sub>, b) dziennym, po wywołaniu ANS; Układ rozwijający: F<sub>1</sub>: heksan-octan etylu 75:25; Odczynnik wywołujący: ANS; Od dołu: chloroatranoryna i atranoryna.

## 5.3.2. Badania *Parmelia sulcata*

### 5.3.2.1. Izolacja związku Ps\_1 (kwas salazynowy)

W wyniku rekrytalizacji oczyszczonego wyciągu acetonowego z *P. sulcata* otrzymano związek Ps\_1 w postaci białych, drobnych kryształków o gwieździstym kształcie (rycina 21). W ten sposób uzyskano 25,6 mg przypuszczalnie **kwasu salazynowego**, którego jednorodność potwierdzono badaniami TLC, a następnie przeznaczono do badań identyfikacyjnych (NMR, MS, UV) (rozdział 5.4.4.). Wyniki izolacji kwasu salazynowego przedstawiono w tabeli 18. Związek przeznaczono do badań aktywności cytotoksycznej (rozdział 5.8.).



**Rycina 21.** Kwas salazynowy: a) kryształy; b) chromatogram (TLC) po wywołaniu ANS (VIS). Układ rozwijający: F<sub>2</sub>: toluen-octan etylu-kwas octowy lodowaty (60:30:5); Odczynnik wywołujący: ANS; Od lewej: kwas lekanorowy i kwas salazynowy.

**Tabela 18.** Masa wyizolowanego związku Ps\_1 (kwas salazynowy) i wartość współczynnika R<sub>f</sub>

Próba	Masa wyciągu [mg]	Wyizolowany kwas salazynowy [mg]	Wydajność [%]	Wartość współczynnika R <sub>f</sub> (kwas salazynowy)			
				F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>
1	16	7,0	43,75	-	0,24	0,29	0,04
2	14,5	6,8	46,90				
3	30	11,8	39,33				
<b>Suma</b>	<b>60,5</b>	<b>25,6</b>	<b>42,31</b>				


### 5.3.3. Badania *Hypocenomyce scalaris*

#### 5.3.3.1. Izolacja związku Hs\_1 metodą PTLC (kwas lekanorowy)

W celu izolacji związku Hs\_1 (kwas lekanorowy) z acetonowego wyciągu z *H. scalaris*, wykonano preparatywną chromatografię cienkowarstwową. W jej wyniku uzyskano 13,3 mg bezpostaciowego, białego związku, przypuszczalnie **kwasy lekanorowego**. Tożsamość otrzymanej substancji potwierdzono badaniami TLC, metodami spektroskopowymi (NMR, MS, UV) (rozdział 5.4.5.). Wyniki izolacji przedstawiono w tabeli 19 i na rycinie 22. Związek przeznaczono do badań aktywności cytotoksycznej (rozdział 5.8.).

**Tabela 19.** Masa wyizolowanego związku Hs\_1 (kwas lekanorowy) metodą PTLC i wartość współczynnika  $R_f$ 

Próba	Masa naniesionego wyciągu [mg]	Wyizolowany kwas lekanorowy [mg]	Wydajność [%]	Wartość współczynnika $R_f$ (kwas lekanorowy)			
				F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>
1	8,3	4,6	25,84	-	0,49	0,59	0,24
2	9,5						
3	12,4	3,2	25,81				
4	16	1,4	8,75				
5	14	2,1	15,00				
6	11	2,0	18,18				
<b>Suma</b>	<b>71,2</b>	<b>13,3</b>	<b>18,68</b>				


**Rycina 22.** Chromatogram (TLC) kwasu lekanorowego widziany w świetle dziennym

Układ rozwijający: F<sub>2</sub> toluen-octan etylu-kwas octowy lodowaty (60:30:5); Odczynnik wywołujący: ANS; Od lewej: kwas lekanorowy.

### 5.3.3.2. Izolacja związku Hs\_1 metodą krystalizacji (kwas lekanorowy)

Z wyciągu acetonowegoz *H. scalaris*, w wyniku krystalizacji w postaci białego osadu posiadającego formę cienkich długich igiełek, otrzymano związek Hs\_1. Metodą tą wyizolowano 18,9 mg **kwasy lekanorowego**. Jednorodność otrzymanej substancji potwierdzono badaniami TLC, natomiast tożsamość metodami spektroskopowymi (UV, MS, NMR) (rozdział 5.4.5.). Wyniki izolacji kwasu lekanorowego przedstawiono w tabeli 20. Związek przeznaczono do badań aktywności cytotoksycznej (rozdział 5.8.).

**Tabela 20.** Masa wyizolowanego związku Hs\_1 (kwas lekanorowy) metodą krystalizacji i wartość współczynnika  $R_f$ 

Próba	Masa wyciągu [mg]	Wyizolowany kwas lekanorowy [mg]	Wydajność [%]	Wartość współczynnika $R_f$ (kwas lekanorowy)			
				F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>
1	10	2,9	29,00	-	0,49	0,59	0,24
2	31	16	51,61				
<b>Suma</b>	<b>41</b>	<b>18,9</b>	<b>46,10</b>				

### 5.3.4. Badania *Cladonia uncialis*

#### 5.3.4.1. Izolacja związku Cu\_1 (kwas usninowy)

Związek Cu\_1, uzyskany w ilości 284,9 mg z heptanowych wyciągów z *C. uncialis* (próbka a i b; tabela 21), miał postać drobnych, seledynowożółtych igiełek. Wyniki analizy jakościowej przeprowadzonej z użyciem chromatografii cienkowarstwowej (TLC) wskazywały, że otrzymany związek to **kwas usninowy**.

Strukturę ustalono za pomocą metod NMR, MS i UV (rozdział 5.4.6.). Wykonano także analizy skręcalności optycznej związku uzyskanego z próbki „a” i „b”, które wykazały, że kwas usninowy z próbki „b” jest mieszaniną racemiczną, natomiast z próbki „a” to kwas (-)-usninowy (tabela 48, rozdział 5.4.6.). Wyniki izolacji kwasu usninowego przedstawiono w tabeli 21. Kwas (-)-usninowy przeznaczono do analizy aktywności cytotoksycznej i przeciwdrobnoustrojowej (rozdziały 5.8. i 5.9.).

#### 5.3.4.2. Izolacja związku Cu\_2 (kwas skwamatowy)

Związek Cu\_2, otrzymany w ilości 207,5 mg z acetonowych wyciągów z *C. uncialis* był bezpostaciowym, białym proszkiem, przypuszczalnie **kwasem skwamatowym**. Jednorodność otrzymanego związku potwierdzono analizą chromatograficzną TLC. Strukturę ustalono za pomocą metod NMR, MS i UV (rozdział 5.4.7.). Wyniki izolacji kwasu skwamatowego przedstawiono w tabeli 21. Związek przeznaczono do badań aktywności cytotoksycznej i przeciwdrobnoustrojowej (rozdziały 5.8. i 5.9.).

**Tabela 21.** Masa wyizolowanego związku Cu\_1 (kwas usninowy) i Cu\_2 (kwas skwamatowy) metodą krystalizacji i wartość współczynnika  $R_f$

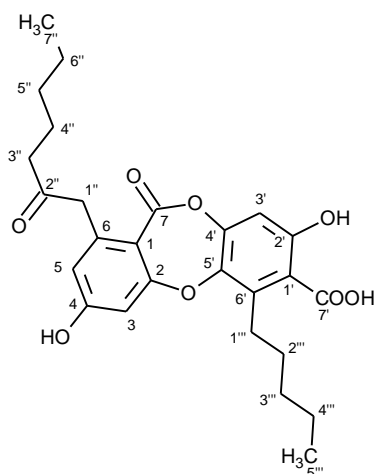
Sposób ekstrakcji	Masa wyciągu heptanowego [mg]	Masa wyciągu acetonowego [mg]	Kwas usninowy		Kwas skwamatowy		Wartość współczynnika $R_f$ kwas (-)-usninowy, kwas skwamatowy							
			Masa [mg]	Wydajność [%]	Masa [mg]	Wydajność [%]	F <sub>1</sub>		F <sub>2</sub>		F <sub>3</sub>		F <sub>4</sub>	
Soxhlet (b)	880,0	541,0	192,6	21,9	117,2	21,7	Cu_1	Cu_2	Cu_1	Cu_2	Cu_1	Cu_2	Cu_1	Cu_2
ultradźwięki (a)	280,0	271,5	92,3	33,0	90,3	33,3	0,17	-	0,78	0,38	0,84	0,38	0,58	0,23
<b>Suma</b>			<b>284,9</b>	<b>-</b>	<b>207,5</b>	<b>-</b>								

## 5.4. Identyfikacja związków

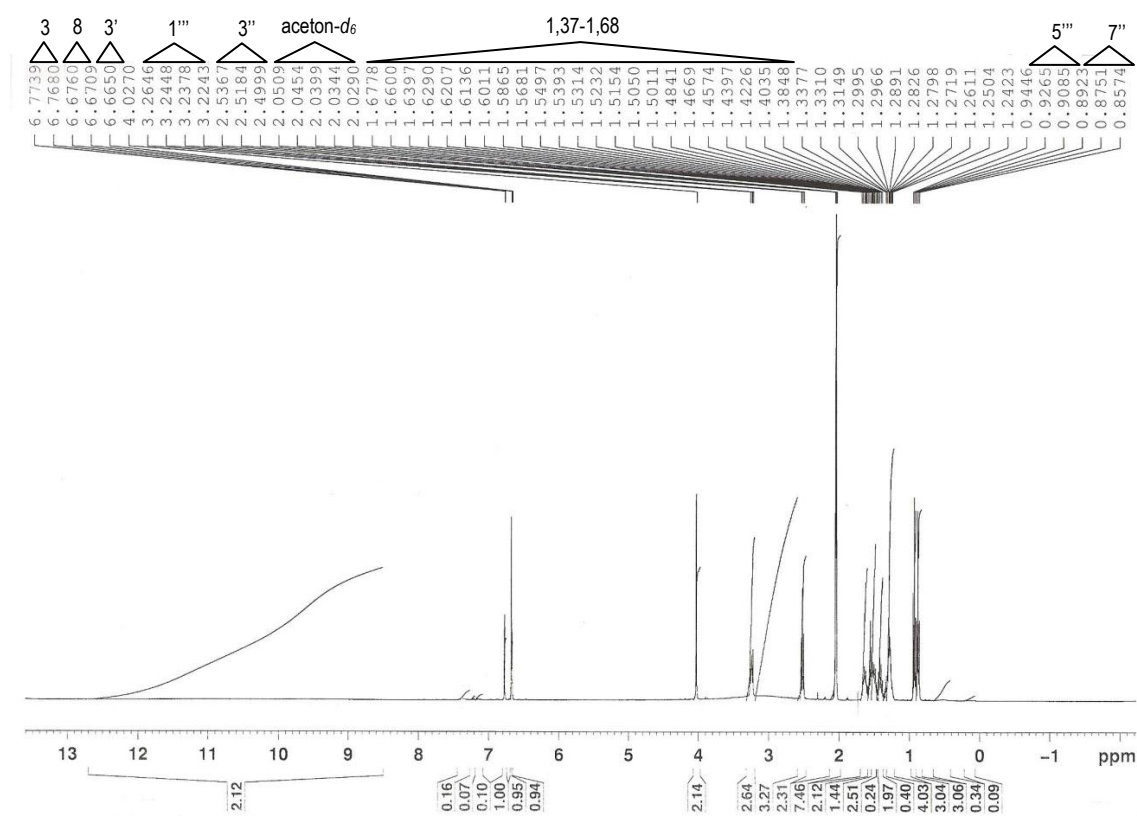
### 5.4.1. Identyfikacja związku Hp\_1 (kwas fizodowy)

#### Analiza spektralna $^1\text{H}$ NMR związku Hp\_1

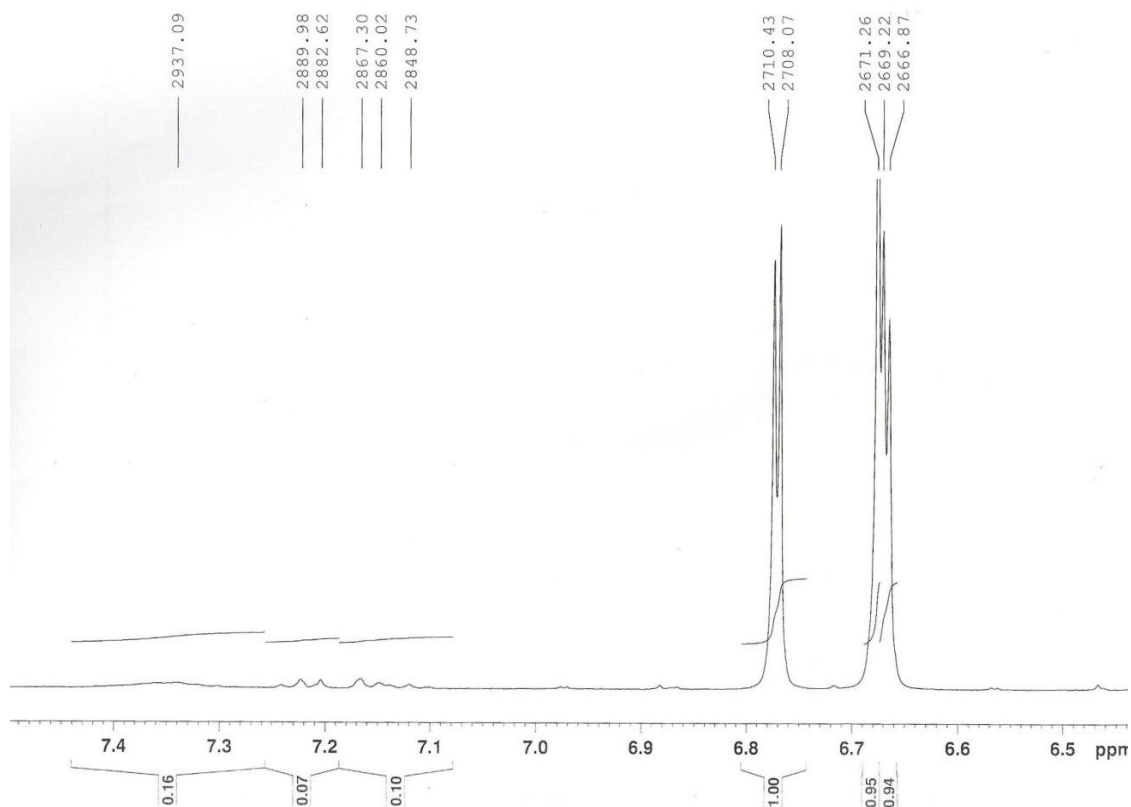
Tabela 22.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) związku Hp\_1 (kwas fizodowy); aceton- $d_6$



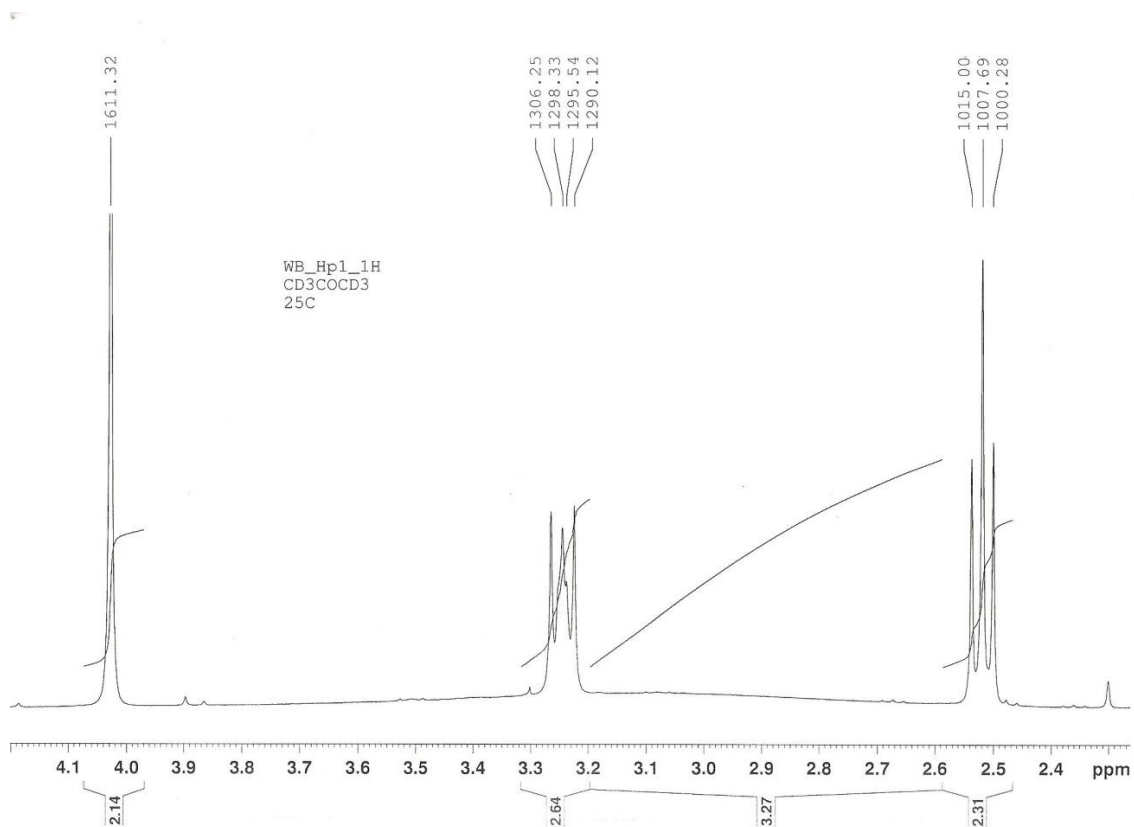
Pozycja	$\delta_{\text{H}}$ ppm	Multipletowość	J (Hz)
3	6,77	d	1H 2,36
5	6,68	d	1H 2,04
1''	4,03	s	2H
3''	2,52	t	2H 7,36
7''	0,88	t	3H 6,98
3'	6,67	s	1H
1'''	3,24	bs	2H
5'''	0,93	t	3H 7,22
-CH <sub>2</sub> -	1,37-1,68	m	12H



Rycina 23. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku Hp\_1 (kwas fizodowy) [a].

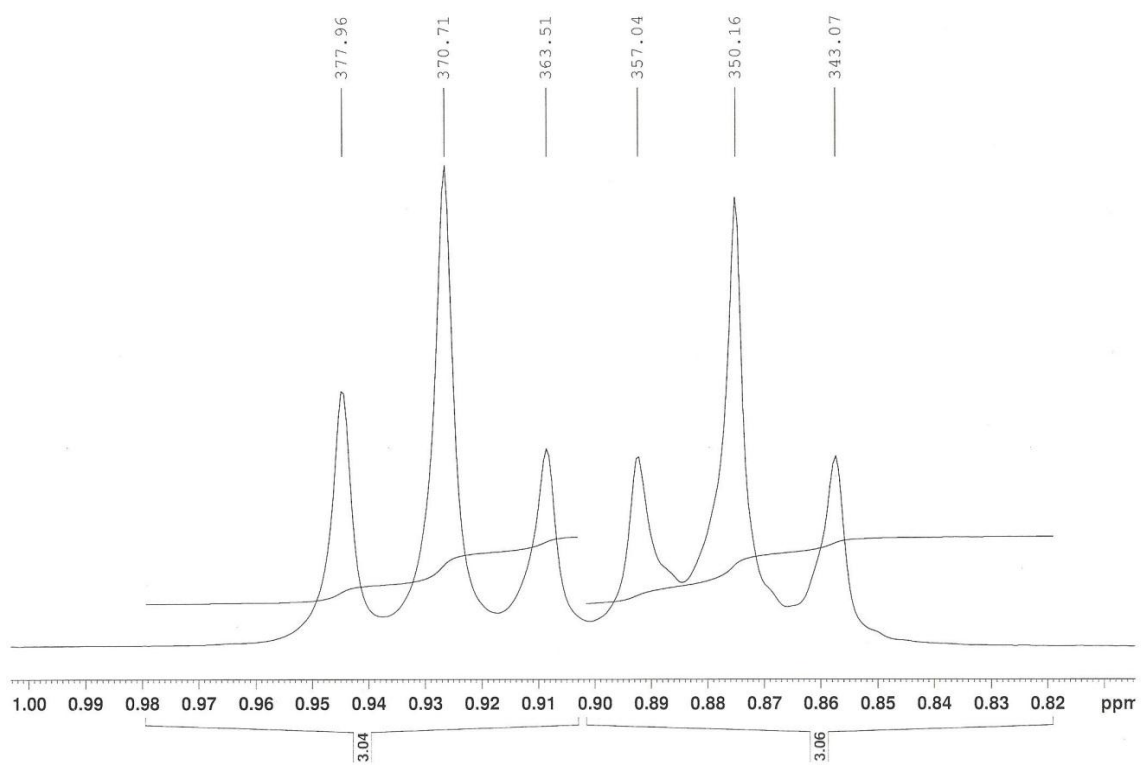


Rycina 24. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku Hp\_1 (kwas fuzodowy) [b].



Rycina 25. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku Hp\_1 (kwas fuzodowy) [c].

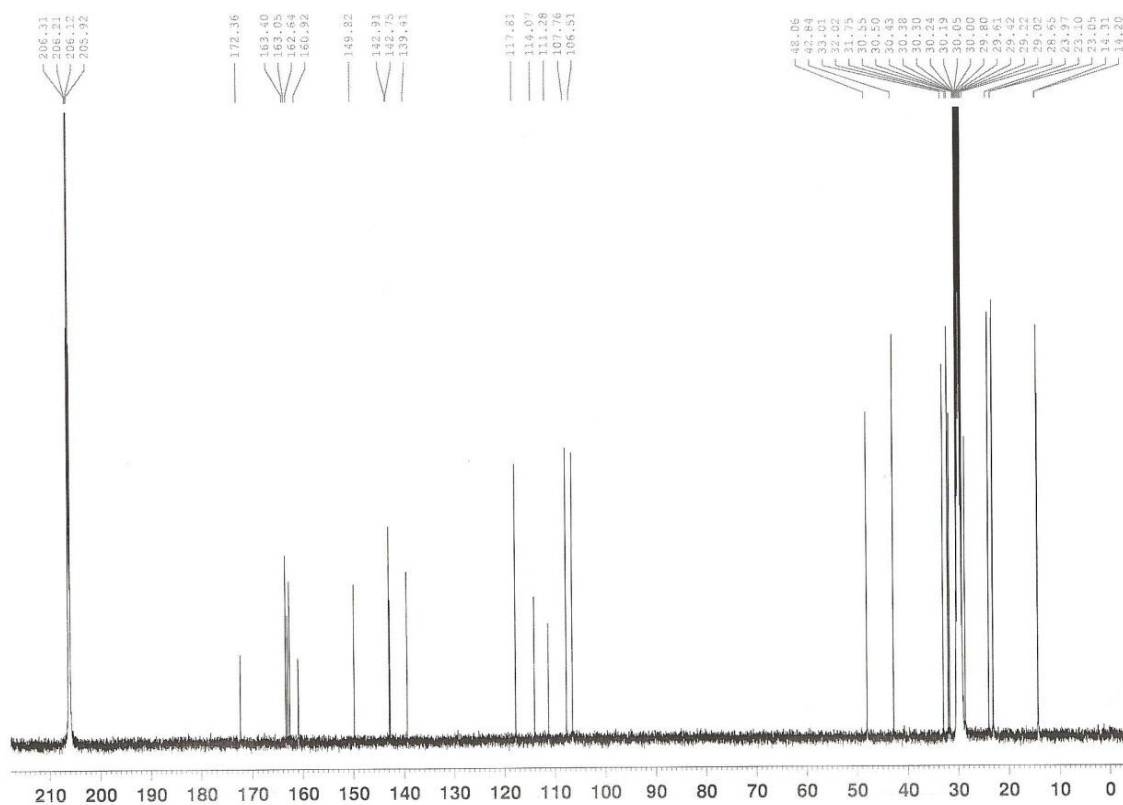
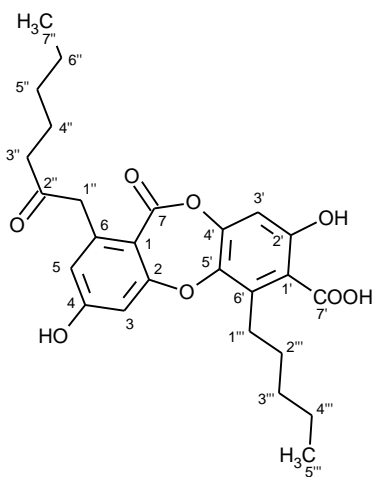


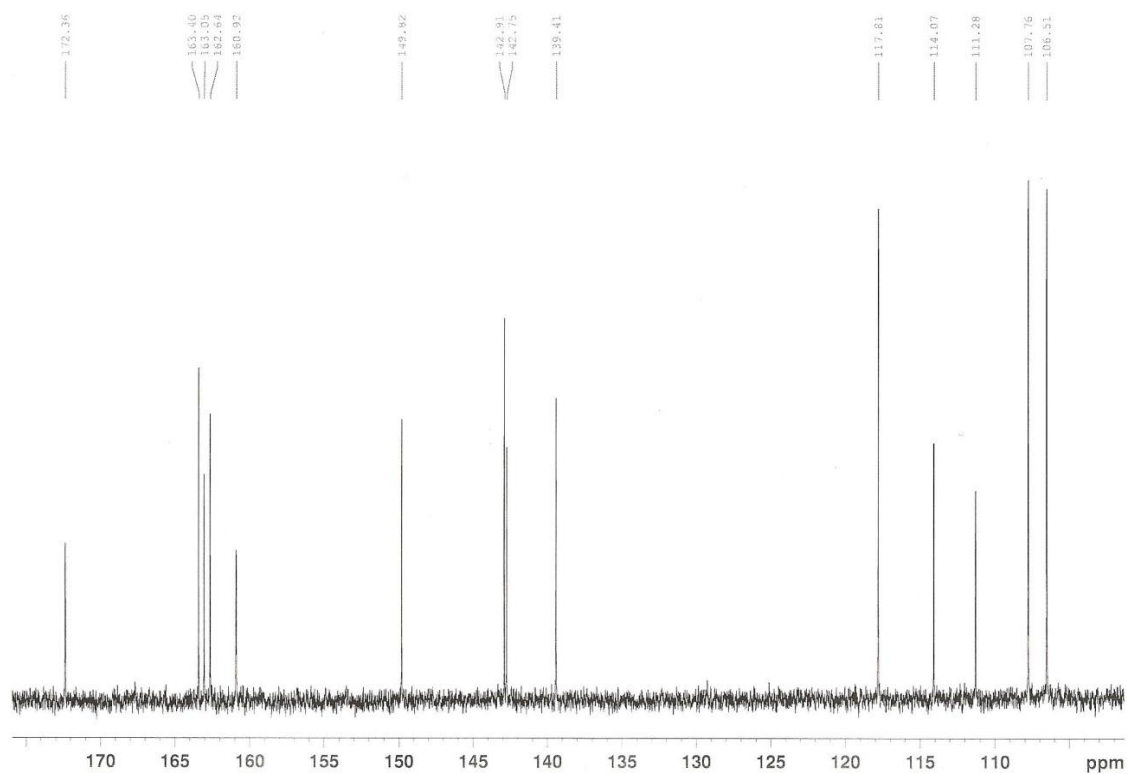


**Rycina 26.** Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku Hp\_1 (kwas fuzodowy) [d].

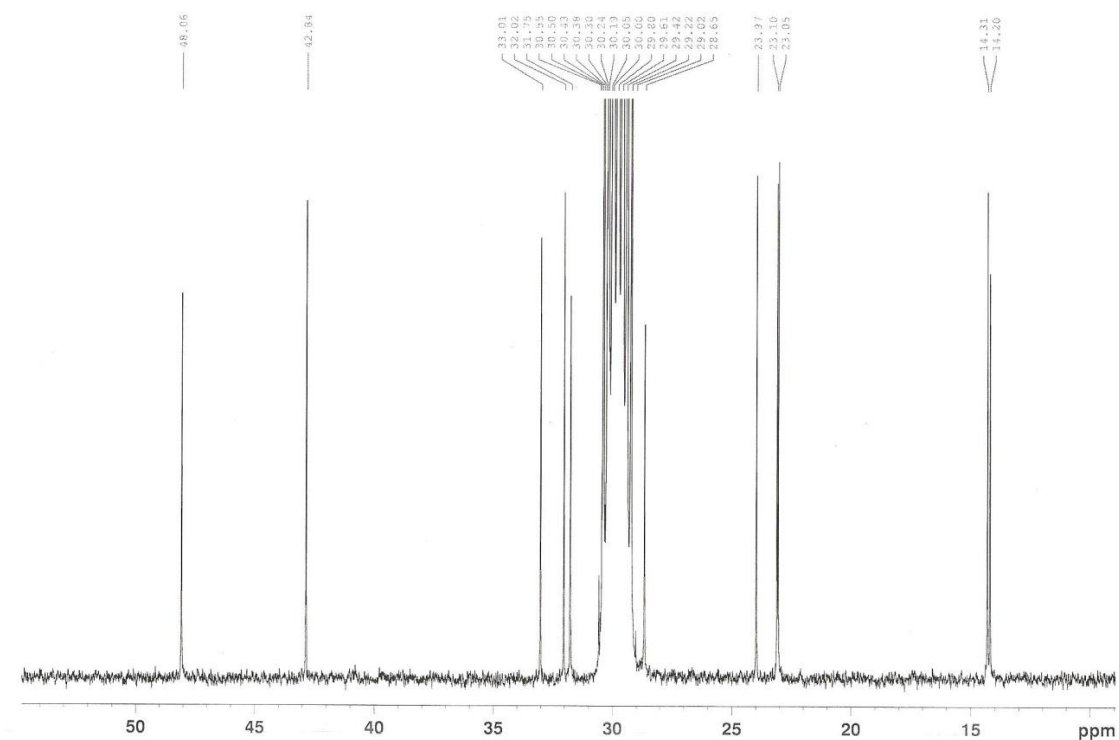
Analiza spektralna  $^{13}\text{C}$  i 2D NMR związku Hp\_1Tabela 23.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) i  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (400 MHz) związku Hp\_1 (kwas fizodowy); aceton- $d_6$ 

Pozycja	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	HSQC	Pozycja	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	HSQC
1	114,07		1'	111,28	
2	163,40		2'	160,92	
3	106,51	6,77	3'	107,76	6,67
4	162,64		4'	149,82	
5	117,81	6,68	5'	142,91	
6	139,41		6'	142,75	1,37-1,68
7	163,05		7'	172,36	1,37-1,68
1''	48,06	4,03	1'''	33,01	3,24
2''	206,21		2'''	32,02	1,37-1,68
3''	42,84	2,52	3'''	28,65	0,93
4''	23,97	1,37-1,68	4'''	23,05	
5''	31,75	1,37-1,68	5'''	14,31	
6''	23,10	1,37-1,68			
7''	14,20	0,88			

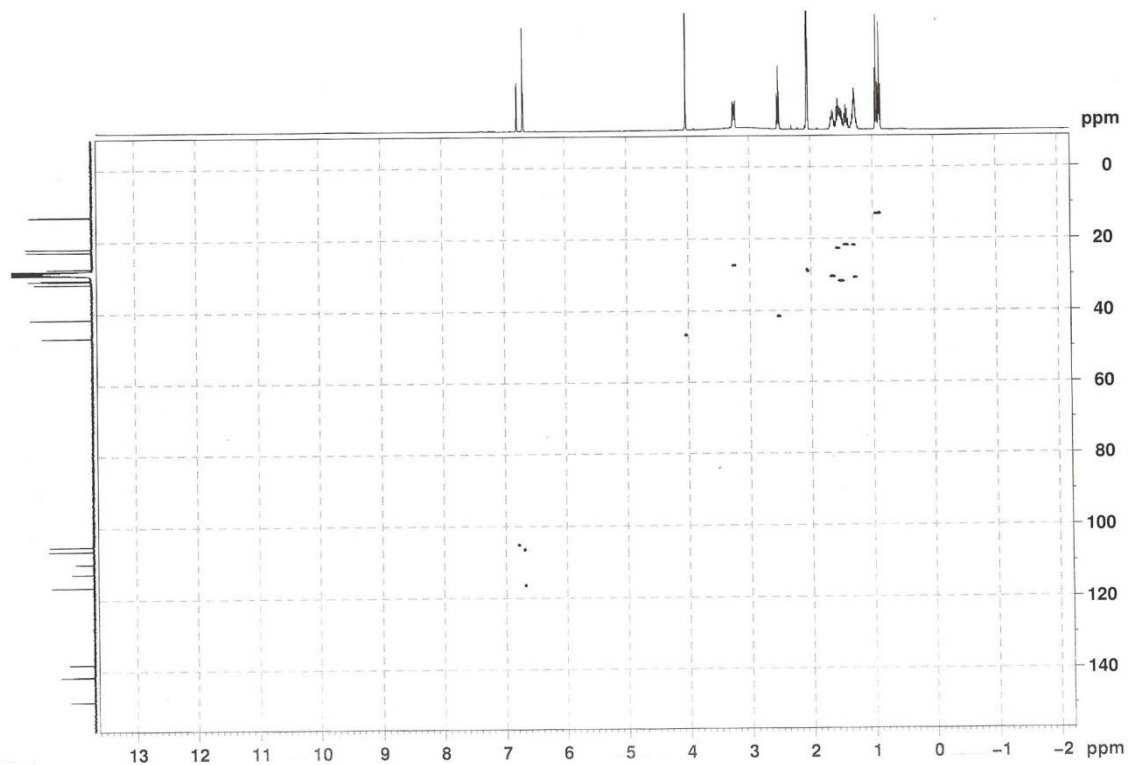
Rycina 27. Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR związku Hp\_1 (kwas fizodowy) [a].



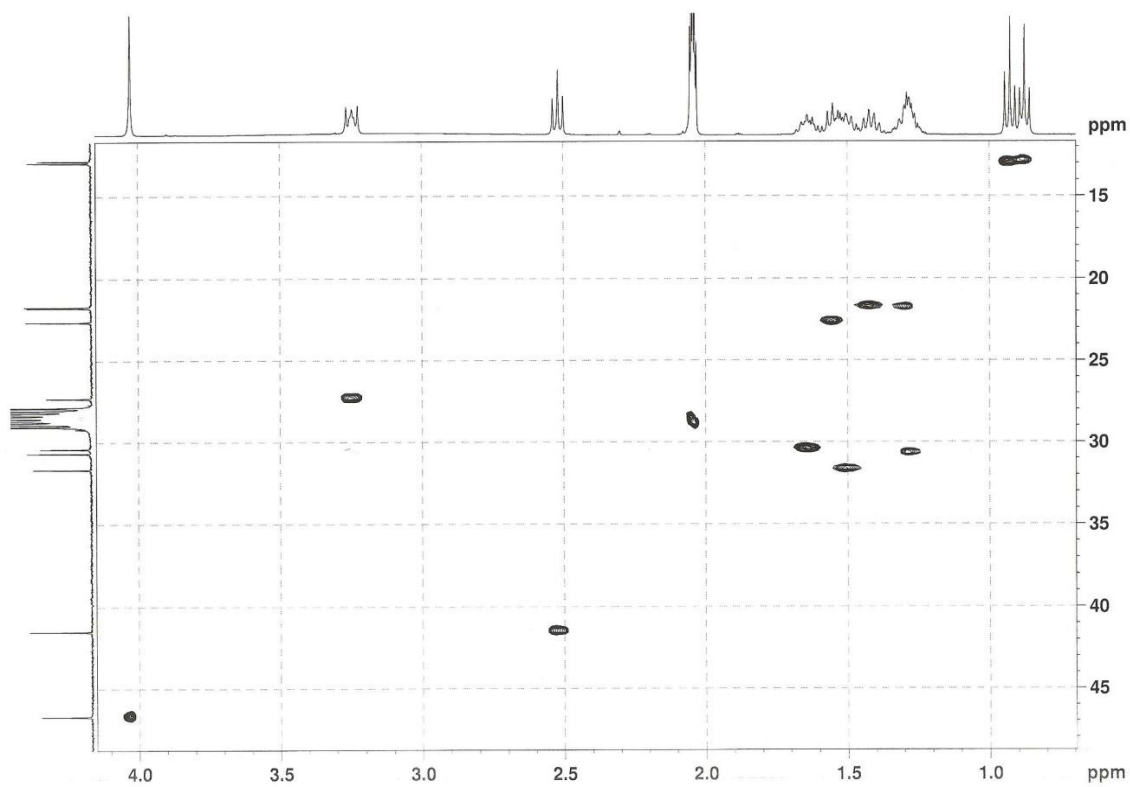
Rycina 28. Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR związku Hp\_1 (kwas fuzodowy) [b].



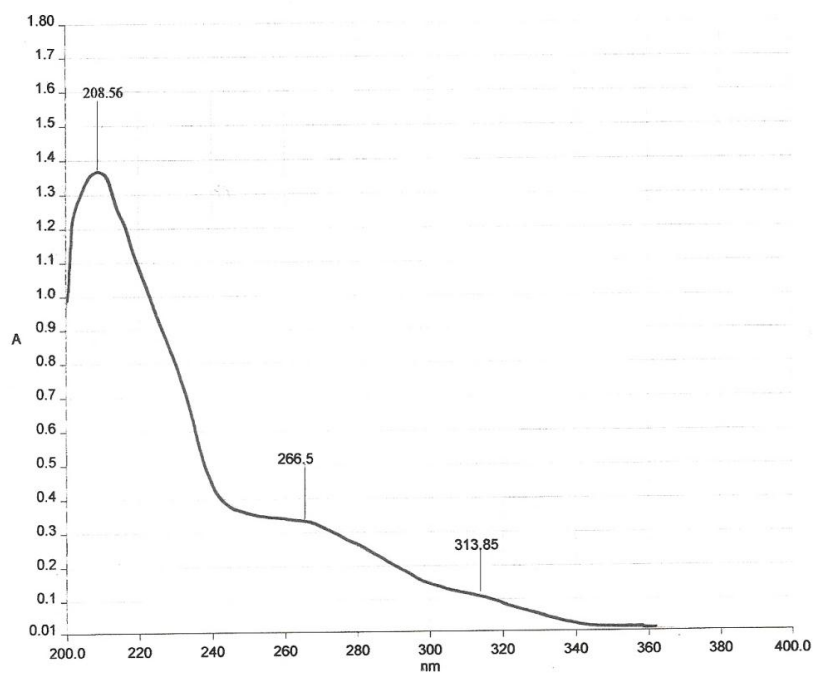
Rycina 29. Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR związku Hp\_1 (kwas fuzodowy) [c].



Rycina 30. Widmo  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC związku Hp\_1 (kwas fuzodowy) [a].

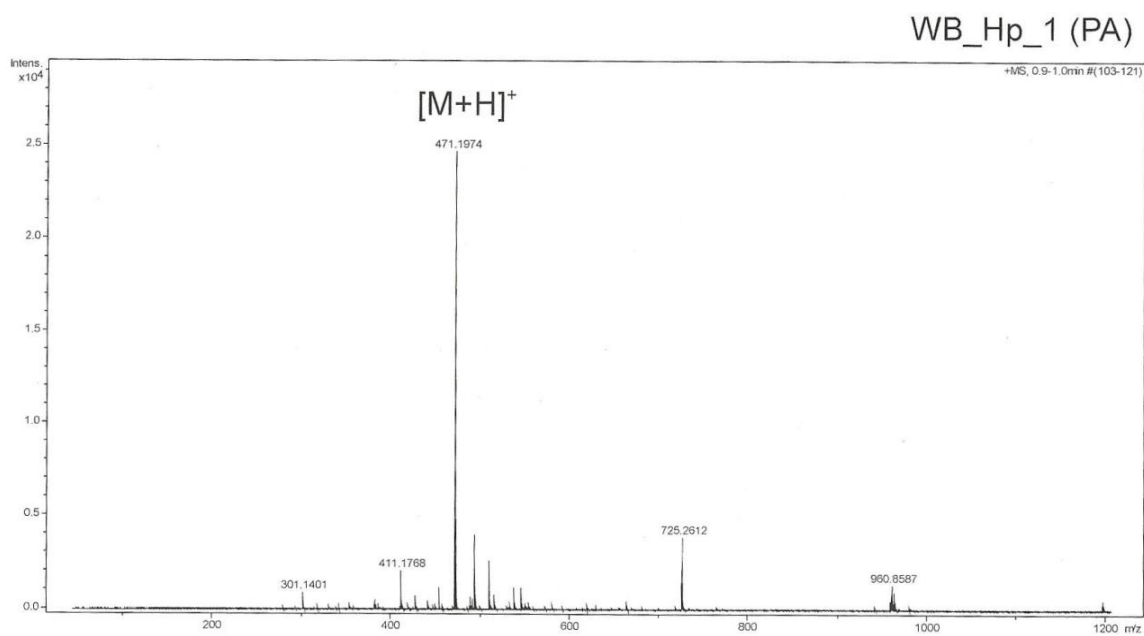


Rycina 31. Widmo  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC związku Hp\_1 (kwas fuzodowy) [b].

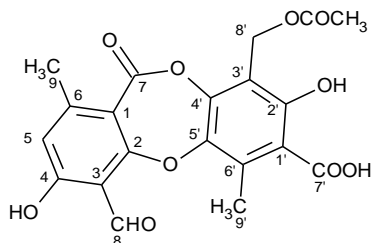
**Analiza spektralna w nadfiolecie związku Hp\_1****Rycina 32.** Widmo w nadfiolecie związku Hp\_1 (kwas fyzodowy).

**Analiza spektralna MS związku Hp\_1****Tabela 24.** ESI-MS związku Hp\_1 (kwas fizodowy)

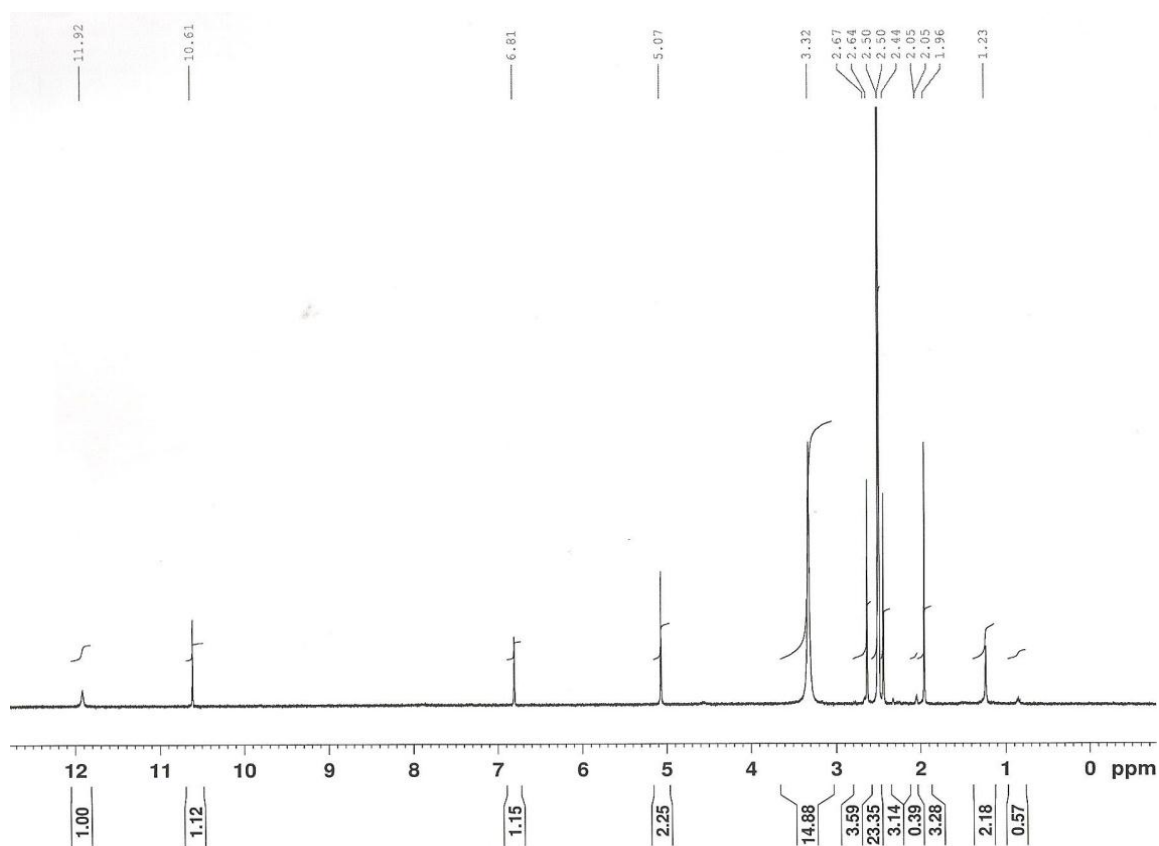
Tryb jonizacji	Fragmentacja	m/z	Wzór sumaryczny	Masa cząsteczkowa	
				wyznaczona	teoretyczna
ES+	[M+H] <sup>+</sup>	471,1974	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	470	470,51160

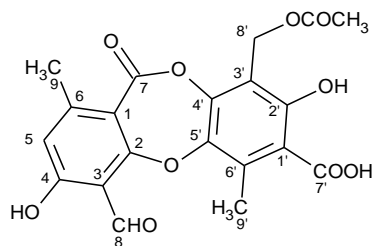
**Rycina 33.** Widmo ESI-MS związku Hp\_1 (kwas fizodowy).

## 5.4.2. Identyfikacja związku Hp\_2 (kwas fyzodalowy)

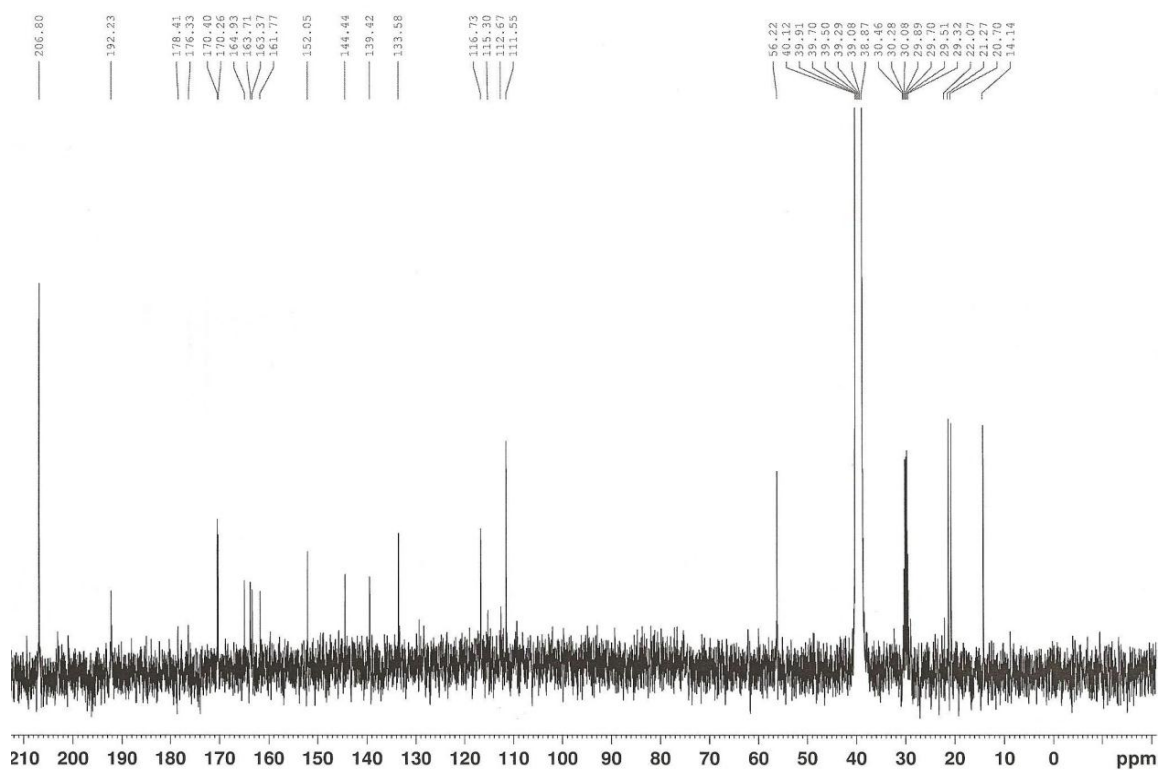
Analiza spektralna  $^1\text{H}$  NMR związku Hp\_2Tabela 25.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) związku Hp\_2 (kwas fyzodalowy);  $\text{DMSO-}d_6 + \text{aceton-}d_6$ 

Pozycja	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	Multiplietowość	
5	6,81	s	1H
9	2,44	s	3H
8'	5,07	s	2H
9'	2,64	s	3H
CHO-8	10,61	s	1H
CH <sub>3</sub> OCO-8'	1,96	s	3H

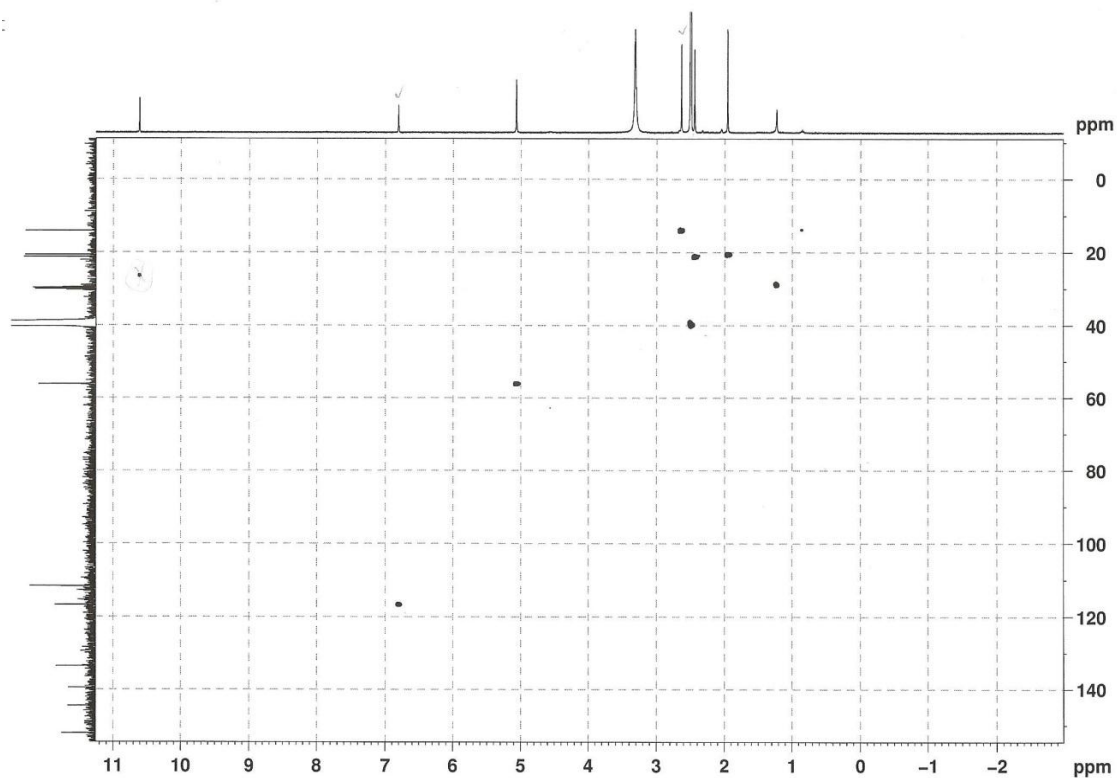
Rycina 34. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku Hp\_2 (kwas fyzodalowy).

Analiza spektralna  $^{13}\text{C}$  i 2D NMR związku Hp\_2**Tabela 26.**  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) i  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (400 MHz) związku Hp\_2 (kwas fizyodalowy); DMSO- $d_6$  + aceton- $d_6$ 

Pozycja	$\delta_{\text{C}}$ ppm	HSQC	Pozycja	$\delta_{\text{C}}$ ppm	HSQC
1	111,55		1'	115,30	
2	163,71		2'	161,77	
3	111,55		3'	112,67	
4	163,37		4'	144,44	
5	116,73	6,81	5'	139,42	
6	152,05		6'	133,58	
7	164,93		7'	170,40	
8	192,23		8'	56,22	5,07
9	21,27	2,44	9'	14,14	2,64
			CH <sub>3</sub> OCO-8'	20,70	1,96

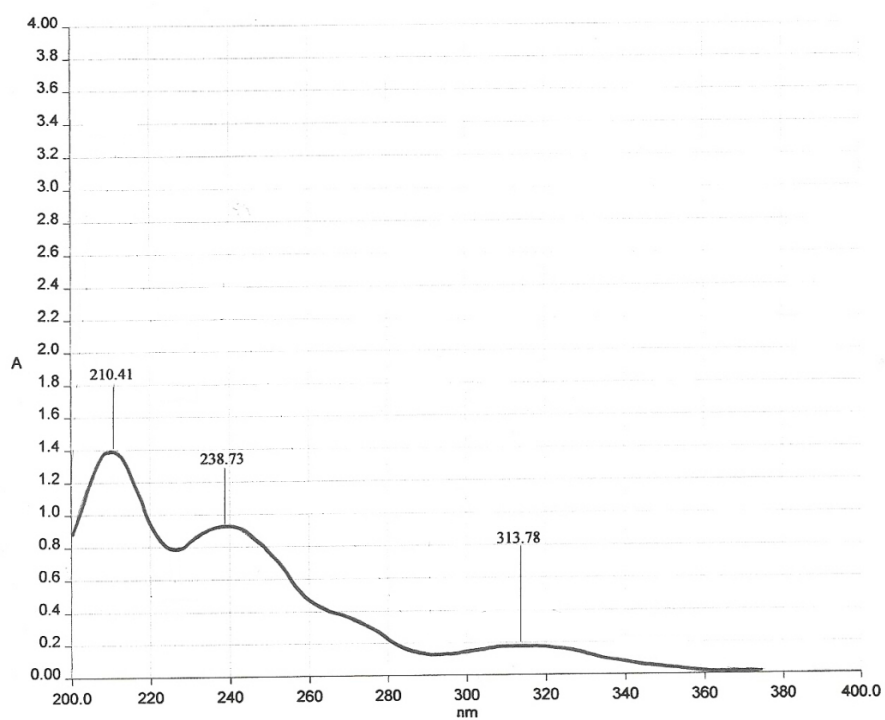
**Rycina 35.** Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR związku Hp\_2 (kwas fizyodalowy).





Rycina 36. Widmo  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC związku Hp\_2 (kwas fyzalowy).

### Analiza spektralna w nadfiolecie związku Hp\_2

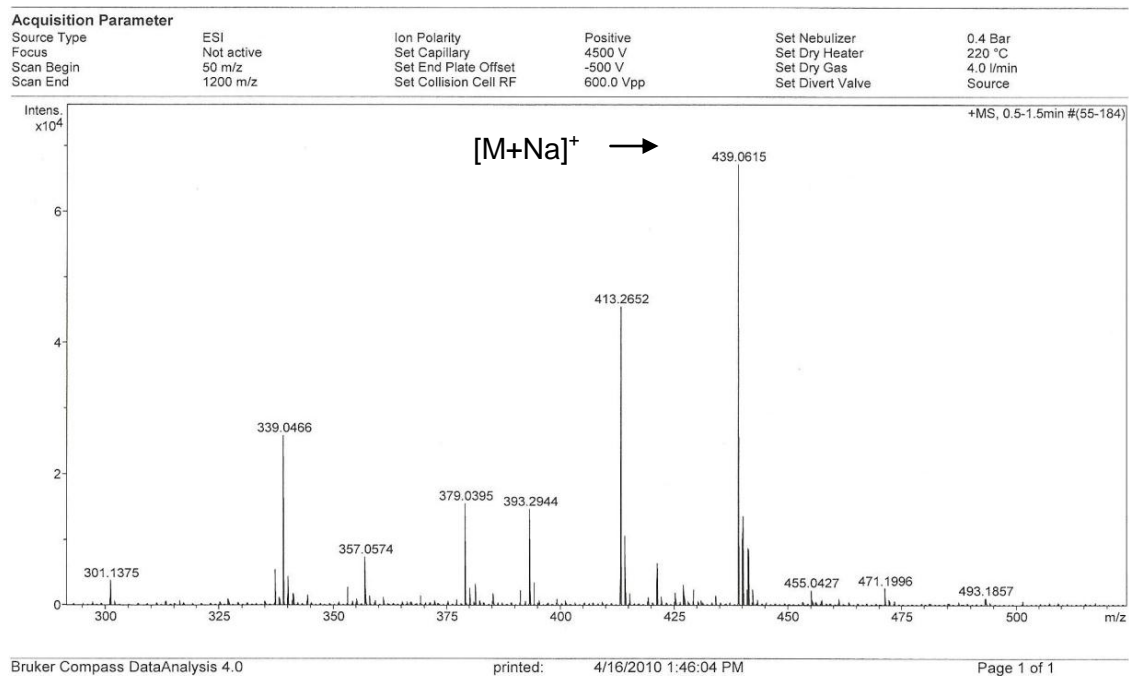


Rycina 37. Widmo w nadfiolecie związku Hp\_2 (kwas fyzalowy).

## Analiza spektralna MS związku Hp\_2

Tabela 27. ESI-MS związku Hp\_2 (kwas fizyodalowy)

Tryb jonizacji	Fragmentacja	m/z	Wzór sumaryczny	Masa cząsteczkowa	
				wyznaczona	teoretyczna
ES <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	439,0615	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	416	416,33504



Rycina 38. Widmo ESI-MS związku Hp\_2 (kwas fizyodalowy).

## 5.4.3. Identyfikacja mieszaniny Hp\_3+Hp\_4 (atranoryna i chloroatranoryna)

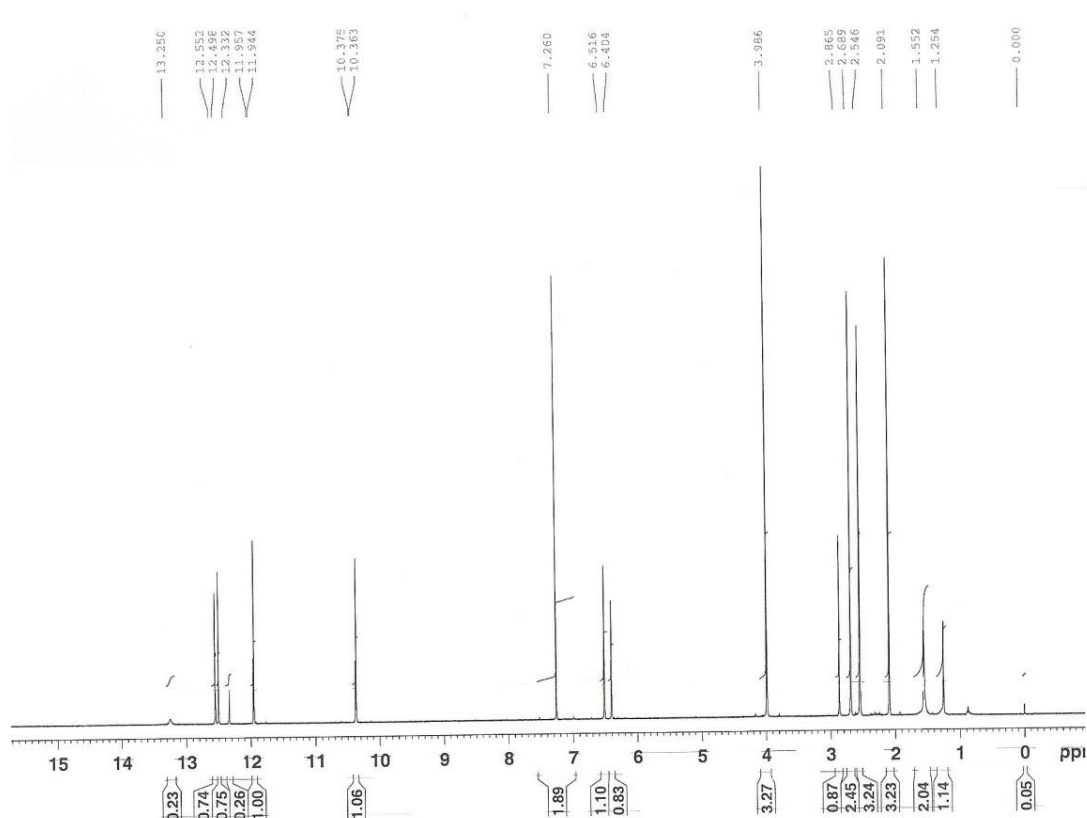
Analiza spektralna  $^1\text{H}$  NMR mieszaniny związków Hp\_3 i Hp\_4

Tabela 28.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) mieszaniny związków Hp\_3 i Hp\_4 (atranoryna i chloroatranoryna); chloroform-*d*

Związek	Pozycja	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	Multipletowość	
Hp_3 (atranoryna)	5	6,40	s	1H
	5'	6,52	s	1H
	8	10,36	s	1H
	8'	2,09	s	3H
	9	2,69	s	3H
	9'	2,69	s	3H
	OH-2'	11,94	s	1H
	OH-2	12,33	s	1H
	OH-4	12,50	s	1H
	CH <sub>3</sub> OOC-	3,99	s	3H
Hp_4 (chloroatranoryna)	5	-	-	-
	5'	6,52	s	1H
	8	10,38	s	1H
	8'	2,55	s	3H
	9	2,09	s	3H
	9'	2,87	s	3H
	OH-2'	11,96	s	1H
	OH-2	12,33	s	1H
	OH-4	12,55	s	1H
	CH <sub>3</sub> OOC-	3,99	s	3H

R = H: atranoryna

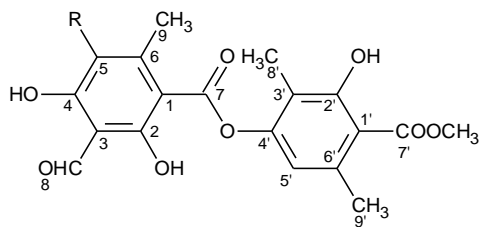
R = Cl: chloroatranoryna



Rycina 39. Widmo  $^1\text{H}$  NMR mieszaniny Hp\_3+Hp\_4 (atranoryna i chloroatranoryna).

## Analiza spektralna $^{13}\text{C}$ NMR mieszanki Hp\_3+Hp\_4

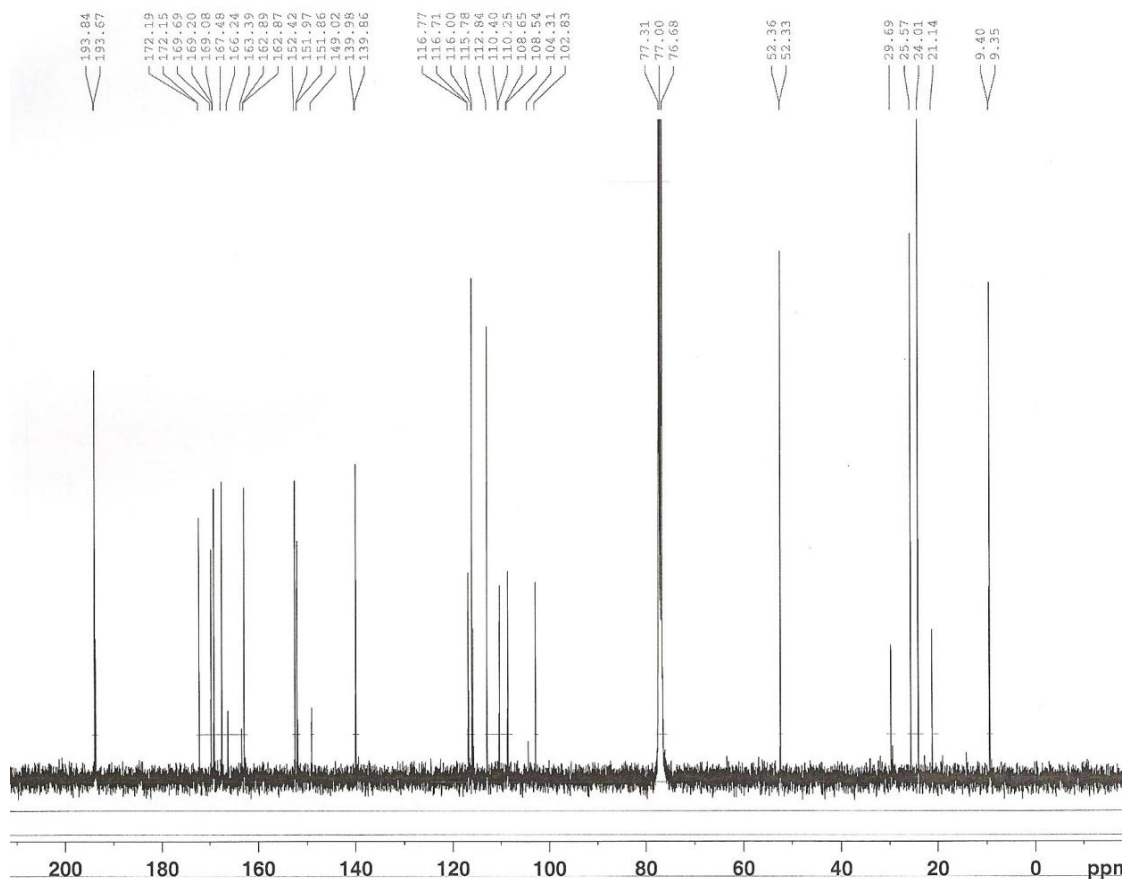
**Tabela 29.**  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) mieszanki związków Hp\_3 i Hp\_4 (atranoryna i chloroatranoryna); chlorofom-*d*



R = H: atranoryna

R = Cl: chloroatranoryna

Związek	Pozycja	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Pozycja	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
Hp_3 (atranoryna)	1	102,83	1'	110,25
	2	169,08	2'	162,87
	3	108,54	3'	116,71
	4	167,48	4'	151,97
	5	112,84	5'	116,00
	6	152,42	6'	139,86
	7	169,69	7'	172,15
	8	193,84	8'	9,35
	9	25,57	9'	24,01
				CH <sub>3</sub> OOC-
Hp_4 (chloroatranoryna)	1	104,31	1'	110,40
	2	166,24	2'	162,89
	3	108,65	3'	116,77
	4	163,39	4'	151,86
	5	115,78	5'	115,78
	6	149,02	6'	139,98
	7	169,20	7'	172,19
	8	193,67	8'	9,40
	9	21,14	9'	29,69
				CH <sub>3</sub> OOC-

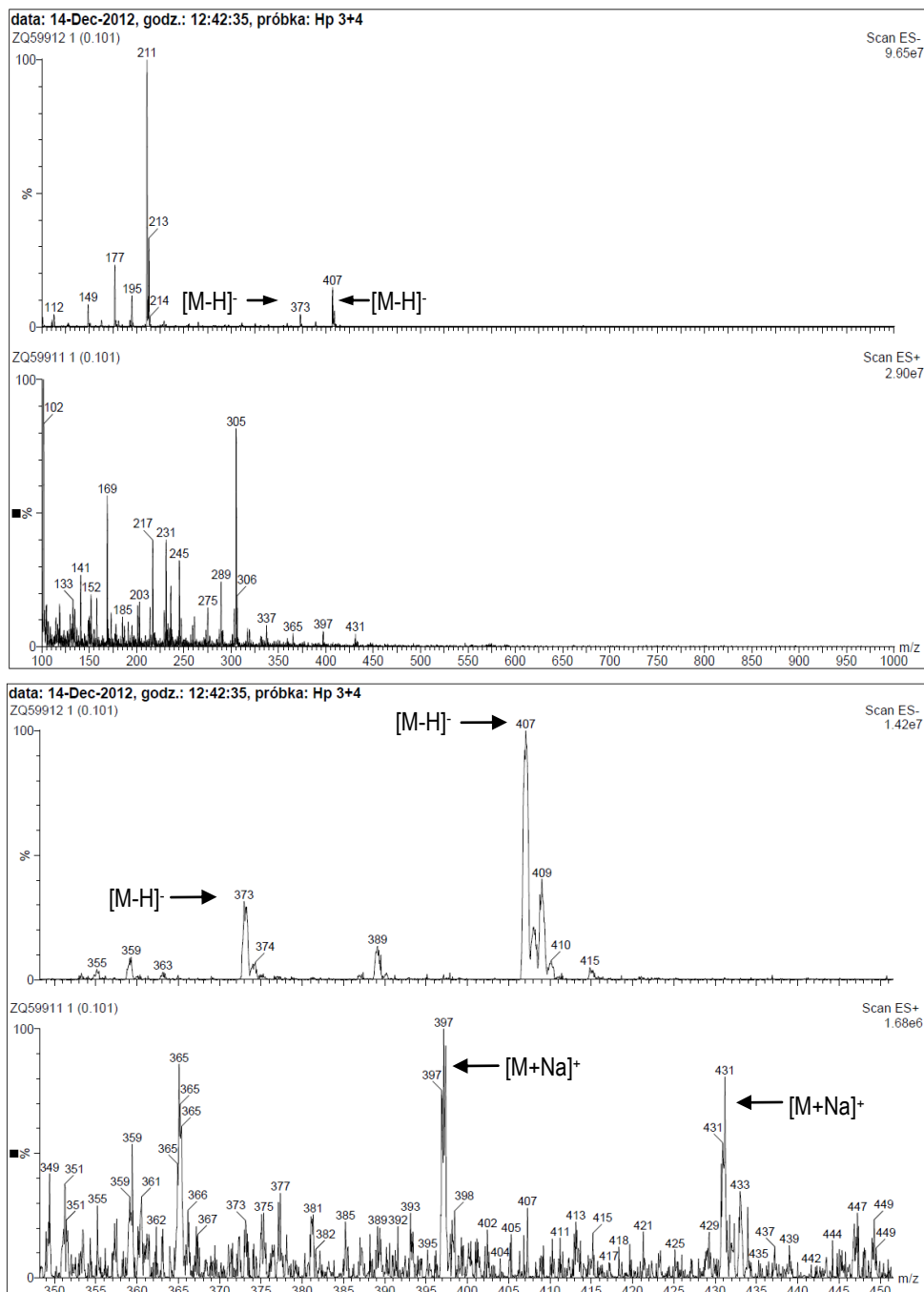


**Rycina 40.** Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR mieszanki związków Hp\_3+Hp\_4 (atranoryna i chloroatranoryna).

## Analiza spektralna MS związku Hp\_3+Hp\_4

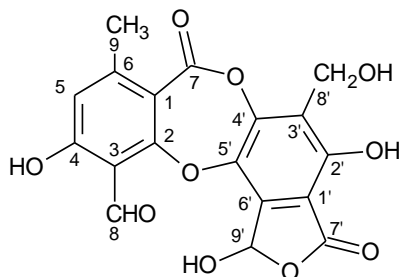
Tabela 30. ESI-MS Hp\_3+ Hp\_4 (atranoryna i chloroatranoryna)

Tryb jonizacji	Fragmentacja	m/z	Wzór sumaryczny	Masa cząsteczkowa	
				wyznaczona	teoretyczna
ES <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	407	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> ClO <sub>8</sub>	408	408,78648
ES <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	431			
ES <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	373	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	374	374,34142
ES <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	397			

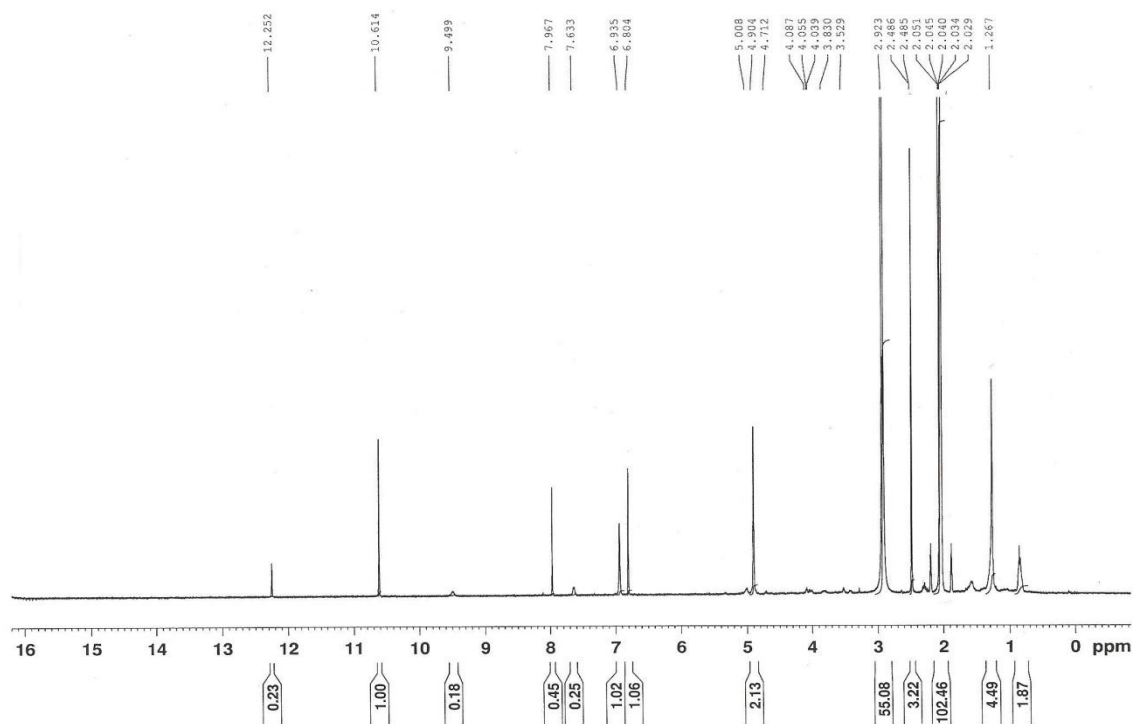


Rycina 41. Widmo ESI-MS mieszaniny związków Hp\_3+Hp\_4 (atranoryna i chloroatranoryna).

## 5.4.4. Identyfikacja związku Ps\_1 (kwas salazynowy)

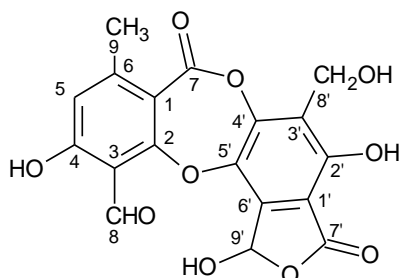
Analiza spektralna  $^1\text{H}$  NMR związku Ps\_1Tabela 31.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) związku Ps\_1 (kwas salazynowy); aceton- $d_6$ 

Pozycja	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	Multiplietowość	
OH-4	12,25	s	1H
5	6,80	s	1H
8	10,61	s	1H
9	2,49	s	3H
OH-2'	9,50	s	1H
8'	4,90	s	2H
OH-9'	7,97	s	1H
9'	6,94	s	1H

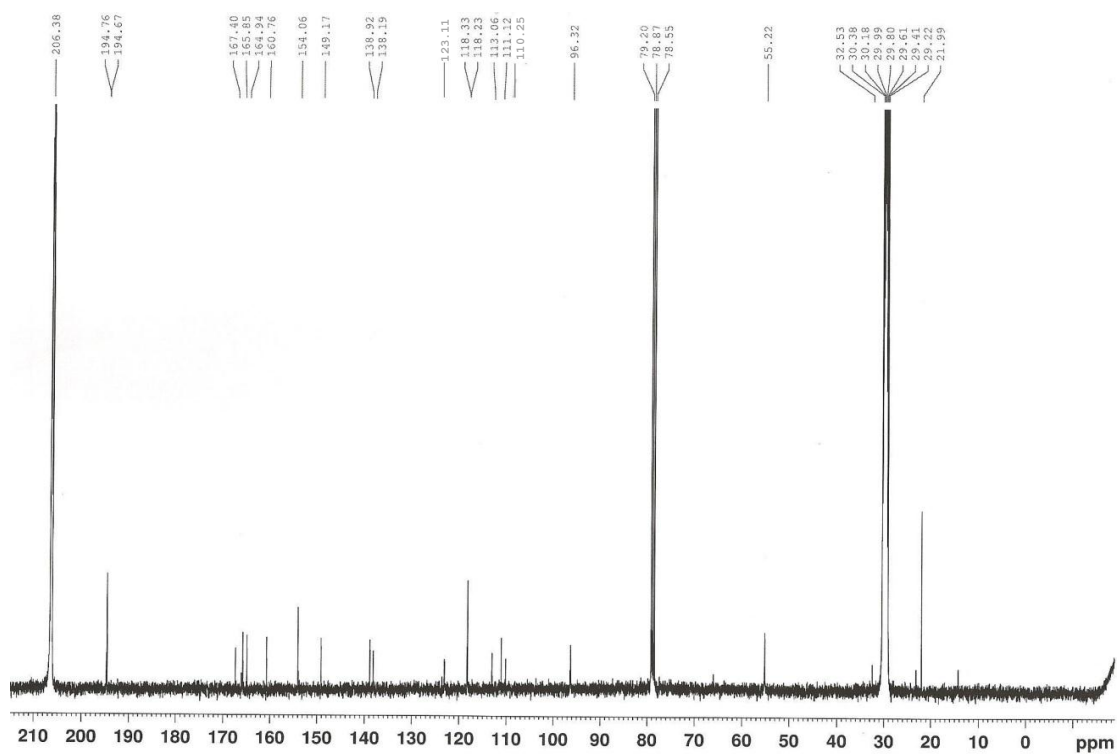
Rycina 42. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku Ps\_1 (kwas salazynowy).

## Analiza spektralna $^{13}\text{C}$ i 2D NMR związku Ps\_1

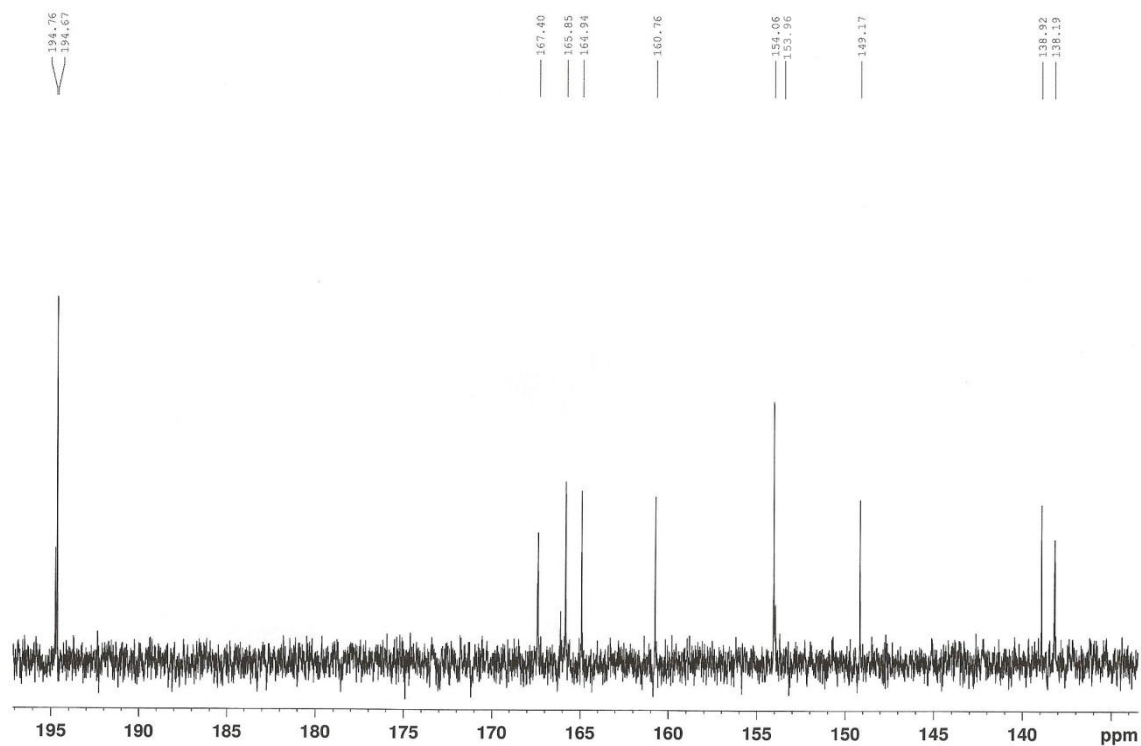
**Tabela 32.**  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) i  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (400 MHz) związku Ps\_1 (kwas salazynowy); aceton- $d_6$  + chloroform- $d$



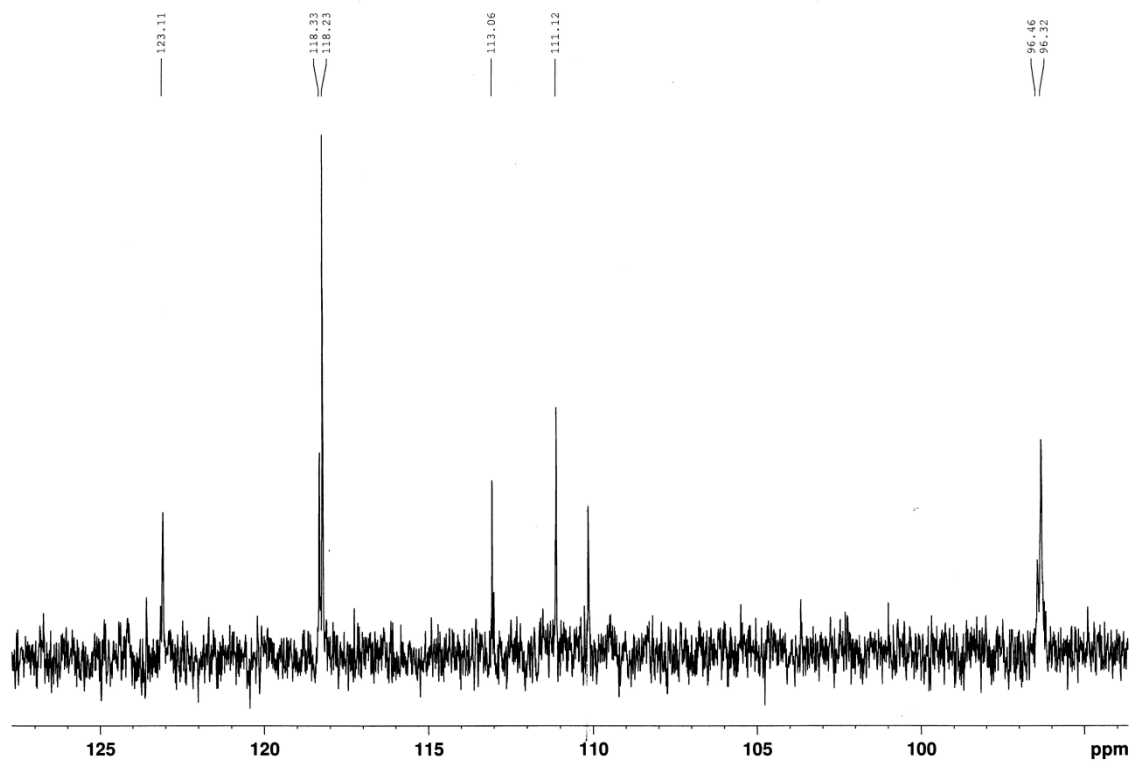
Pozycja	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	HSQC	Pozycja	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	HSQC
1	113,06		1'	110,25	
2	164,94		2'	154,06	
3	111,12		3'	123,11	
4	165,85		4'	149,17	
5	118,23	6,80	5'	138,92	
6	153,96		6'	138,19	
7	160,76		7'	167,40	
8	194,67		8'	55,22	4,90
9	21,99	2,49	9'	96,32	6,94



**Rycina 43.** Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR związku Ps\_1 (kwas salazynowy) [a].

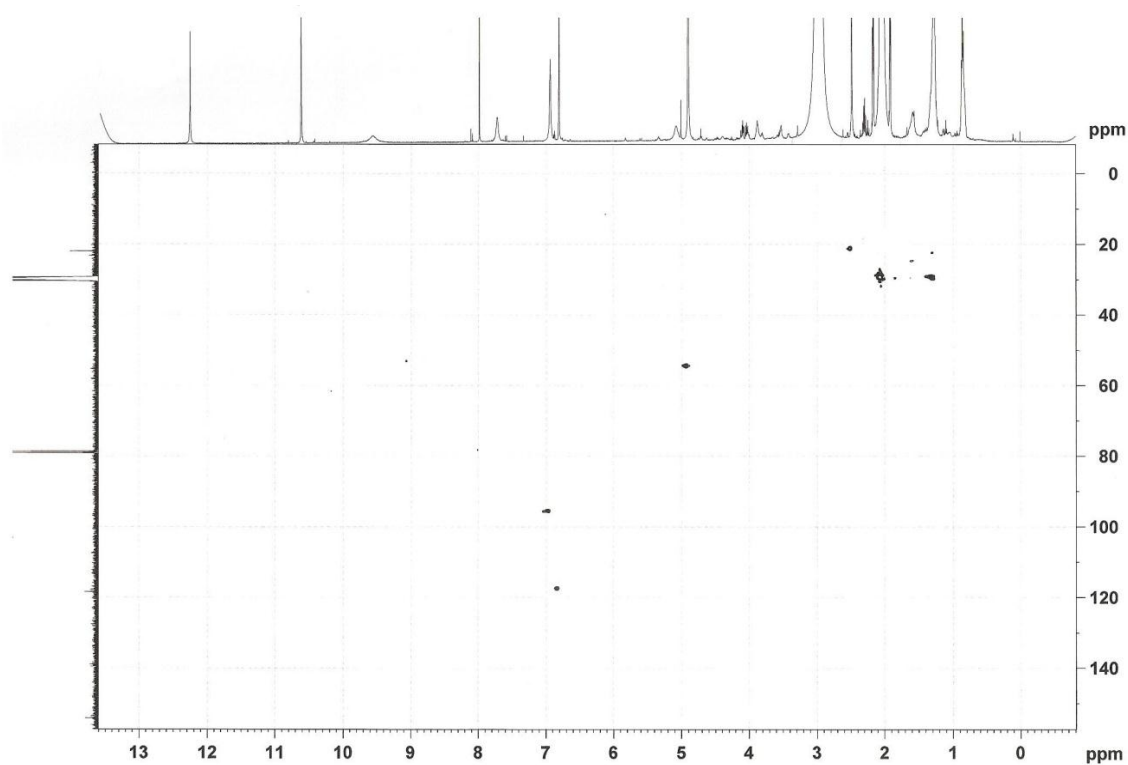


Rycina 44. Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR związku Ps\_1 (kwas salzynowy) [b].



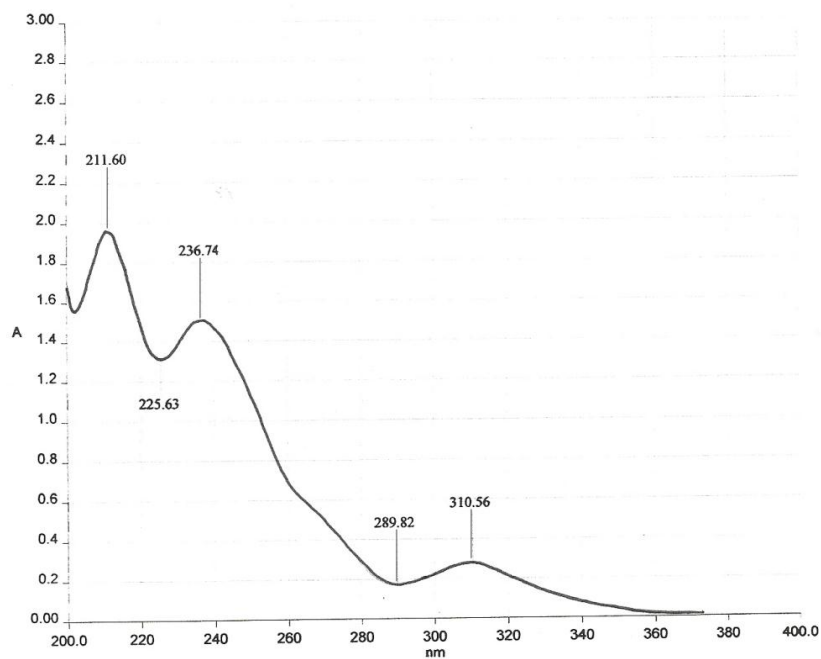
Rycina 45. Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR związku Ps\_1 (kwas salzynowy) [c].





Rycina 46. Widmo  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC związku Ps\_1 (kwas salazykowy).

### Analiza spektralna w nadfiolecie związku Ps\_1

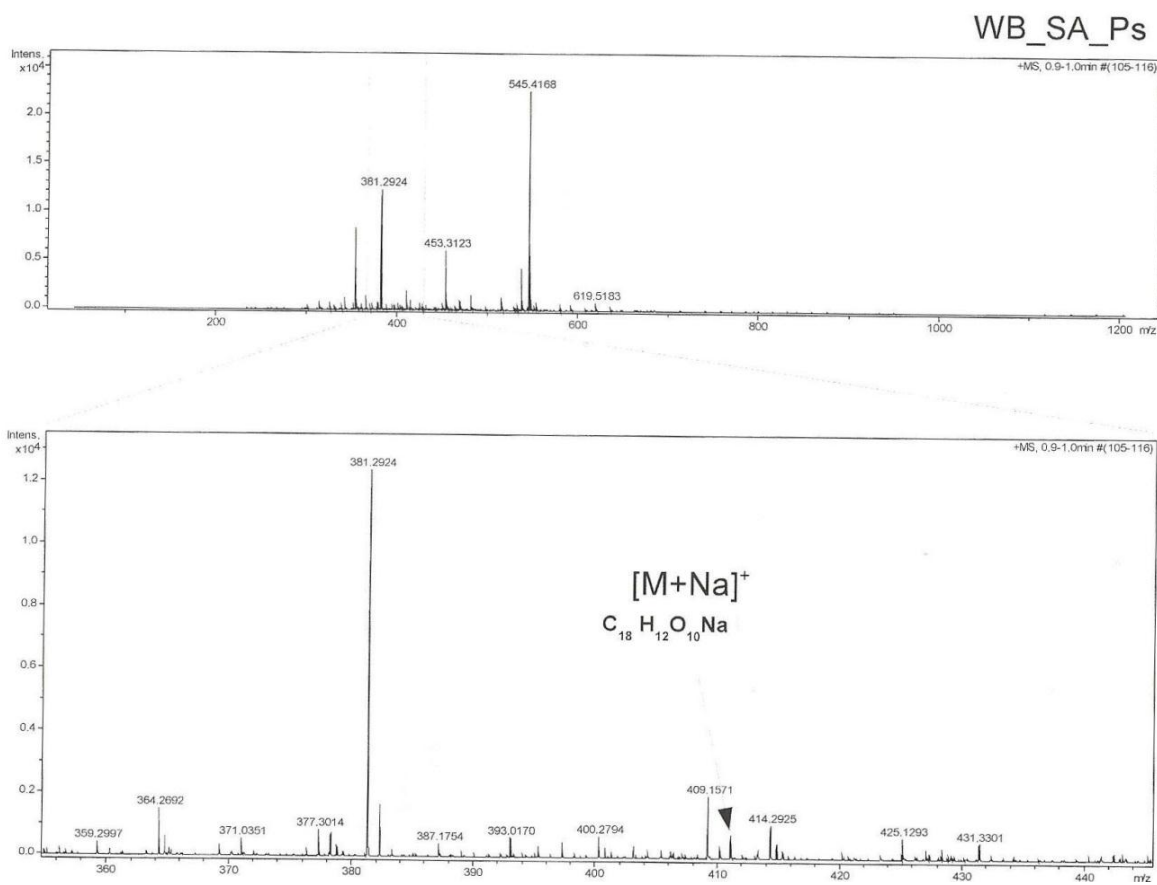


Rycina 47. Widmo w nadfiolecie związku Ps\_1 (kwas salazykowy).

## Analiza spektralna MS związku Ps\_1

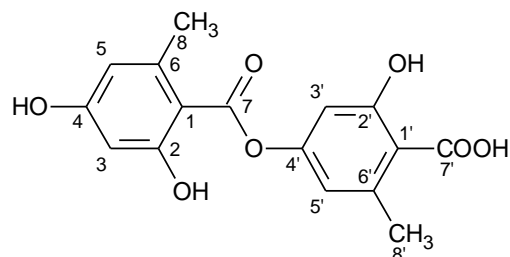
Tabela 33. ESI-MS związku Ps\_1 (kwas salazynowy)

Tryb jonizacji	Fragmentacja	m/z	Wzór sumaryczny	Masa cząsteczkowa	
				wyznaczona	teoretyczna
ES <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	411	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>10</sub>	388	388,28188

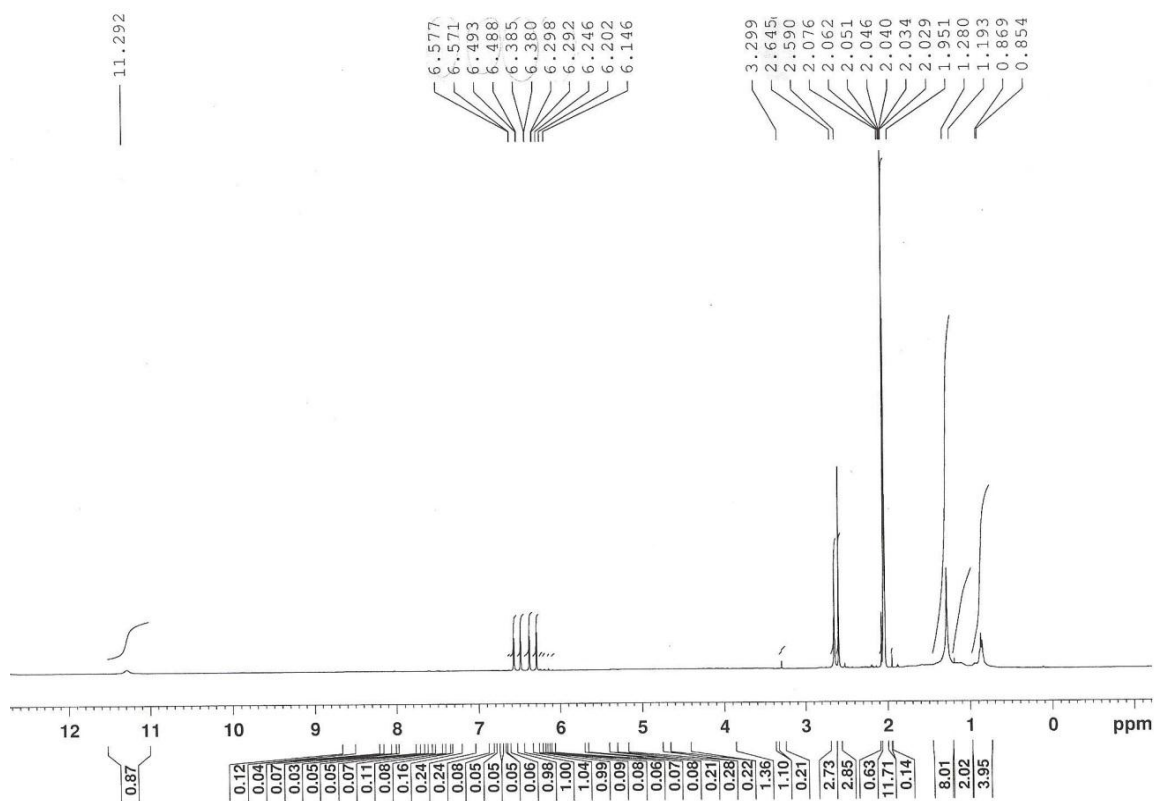


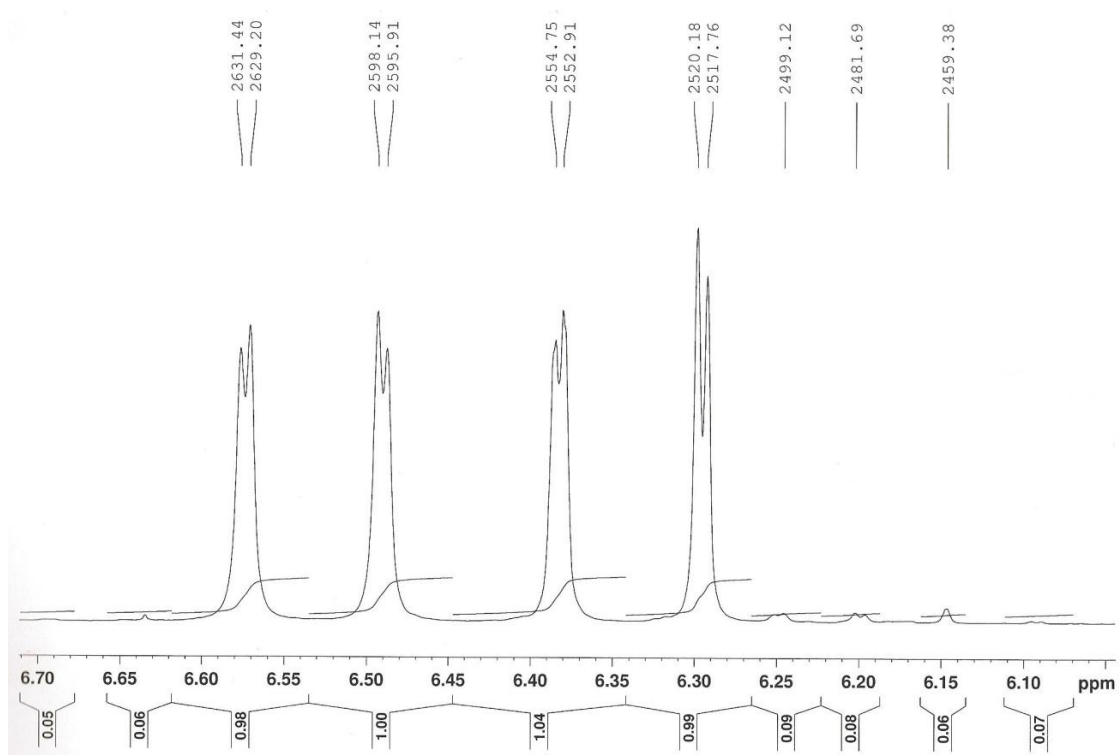
Rycina 48. Widmo ESI-MS związku Ps\_1 (kwas salazynowy).

## 5.4.5. Identyfikacja związku Hs\_1 (kwas lekanorowy)

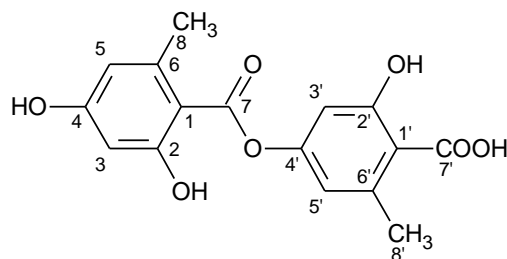
Analiza spektralna  $^1\text{H}$  NMR związku Hs\_1Tabela 34.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) związku Hs\_1 (kwas lekanorowy); aceton- $d_6$ 

Pozycja	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	Multiplietowość	$J$ (Hz)
3	6,30	d	1H 2,42
3'	6,38	d	1H 1,84
5	6,49	d	1H 2,23
5'	6,57	d	1H 2,24
CH <sub>3</sub> -8	2,59	s	3H
CH <sub>3</sub> -8'	2,65	s	3H
OH	11,29	s	1H

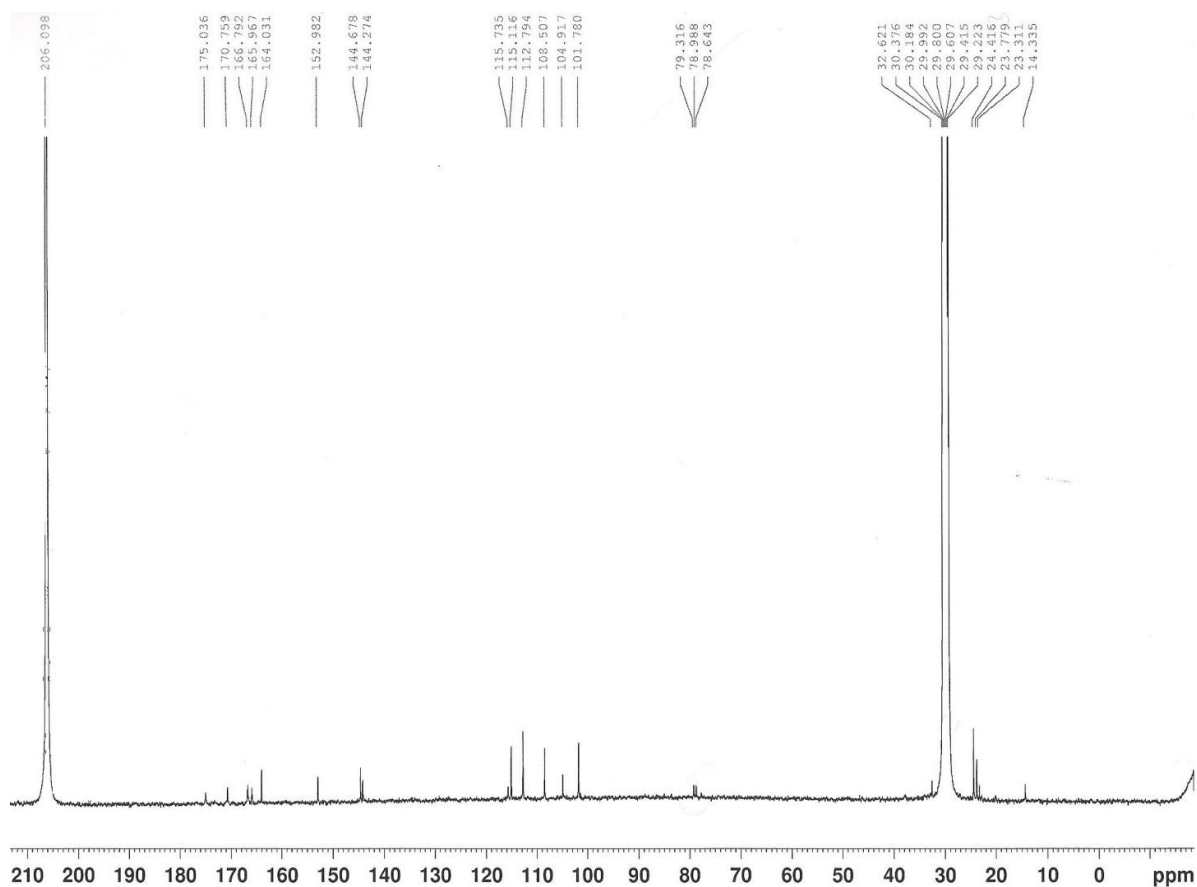
Rycina 49. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku Hs\_1 (kwas lekanorowy) [a].

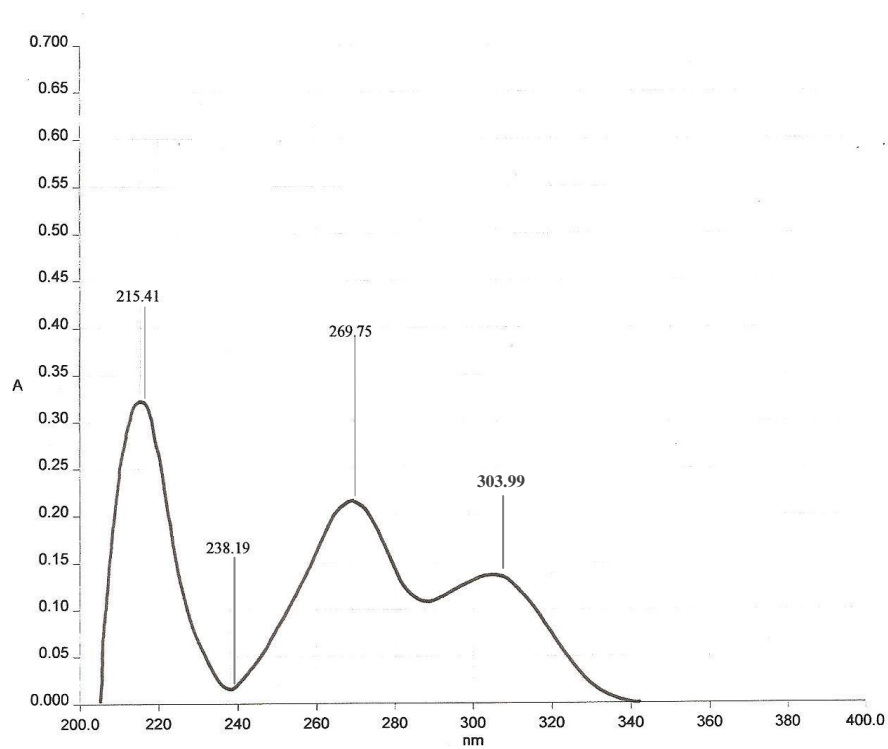


Rycina 50. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku Hs\_1 (kwas lekanorowy) [b].

Analiza spektralna  $^{13}\text{C}$  NMR związku Hs\_1Tabela 35.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) związku Hs\_1 (kwas lekanorowy); aceton- $d_6$ 

Pozycja	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Pozycja	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	104,92	1'	115,12
2	164,03	2'	152,98
3	101,78	3'	108,51
4	165,97	4'	164,03
5	112,79	5'	115,74
6	144,68	6'	144,27
7	166,79	7'	170,76
8	24,42	8'	23,78

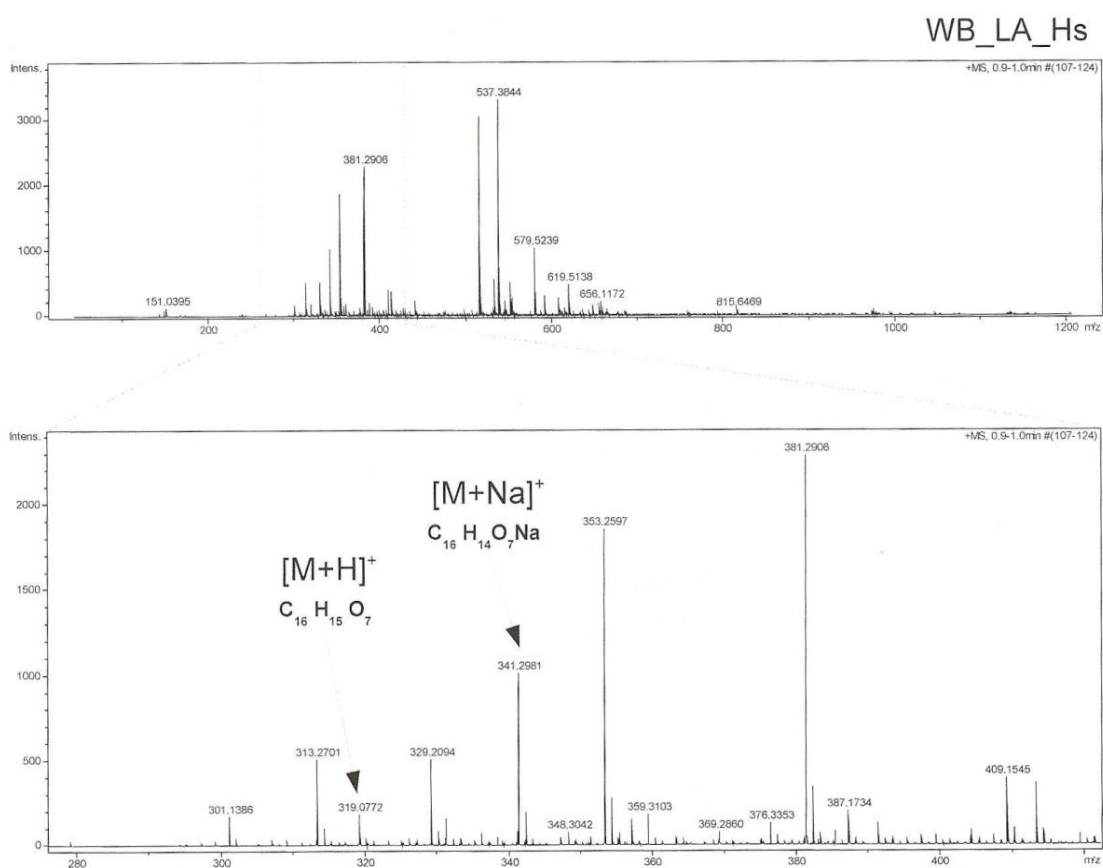
Rycina 51. Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR związku Hs\_1 (kwas lekanorowy).

**Analiza spektralna w nadfiolecie związku Hs\_1****Rycina 52.** Widmo w nadfiolecie związku Hs\_1 (kwas lekanorowy).

## Analiza spektralna MS związku Hs\_1

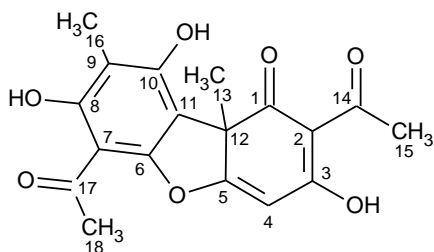
Tabela 36. ESI-MS związku Hs\_1 (kwas lekanorowy)

Tryb jonizacji	Fragmentacja	m/z	Wzór sumaryczny	Masa cząsteczkowa	
				wyznaczona	teoretyczna
ES+	[M+H] <sup>+</sup>	319,0772	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	318	318,27816
	[M+Na] <sup>+</sup>	341,2981			

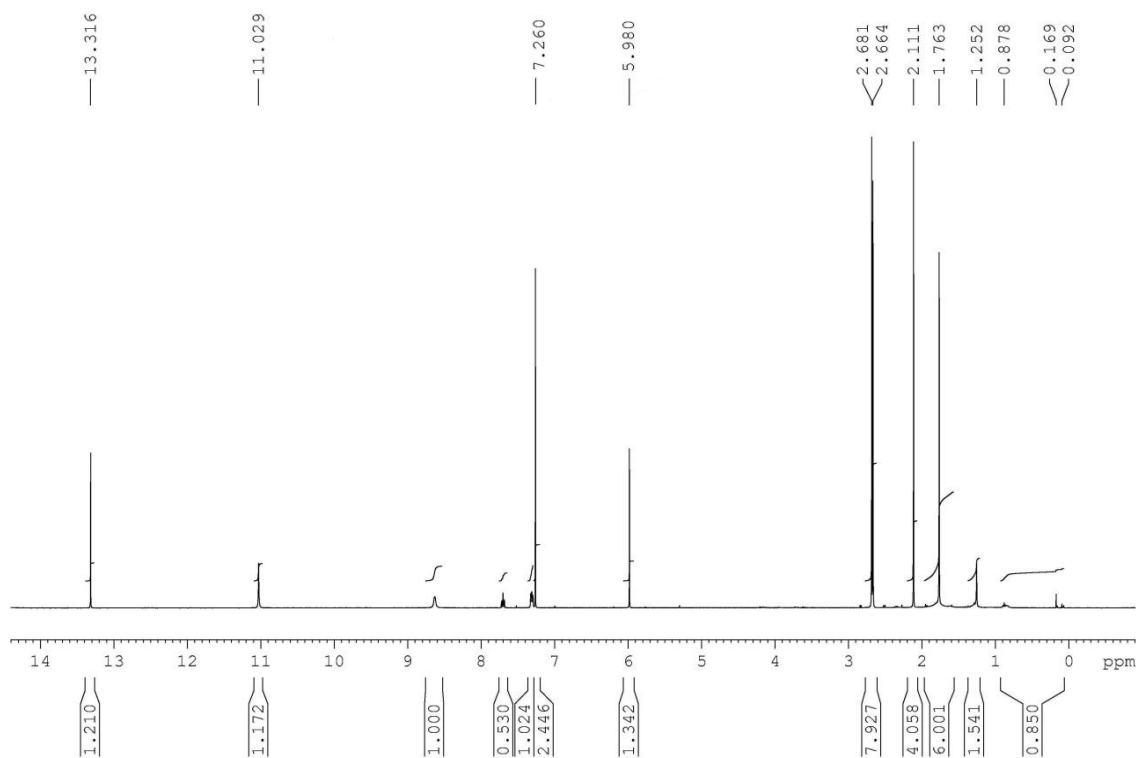


Rycina 53. Widmo ESI-MS związku Hs\_1 (kwas lekanorowy).

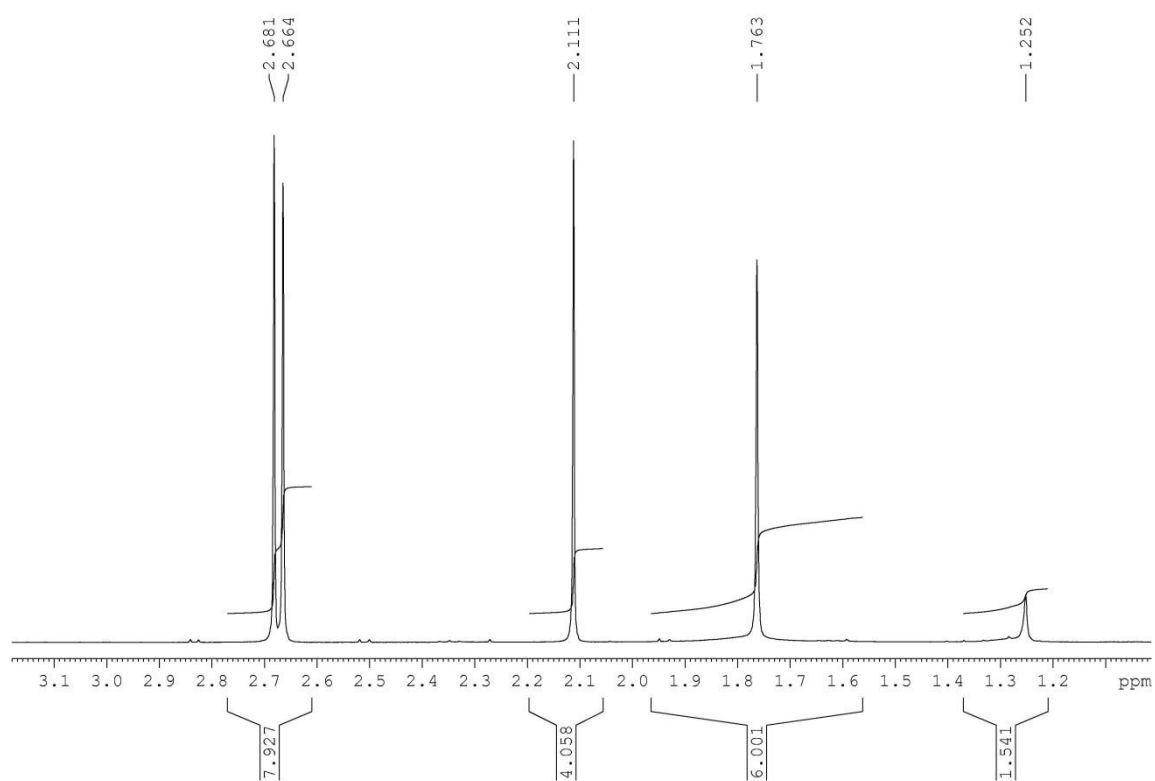
## 5.4.6. Identyfikacja związku Cu\_1 (kwas usninowy)

Analiza spektralna  $^1\text{H}$  NMR związku Cu\_1Tabela 37.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) związku Cu\_1 (kwas (-)-usninowy); chloroform-*d*

Pozycja	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	Multipletowość	
4	5,98	s	1H
OH-8	13,32	s	1H
OH-10	11,03	s	1H
13	1,76	s	3H
15	2,66	s	3H
16	2,11	s	3H
18	2,68	s	3H

Rycina 54. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku Cu\_1 (kwas (-)-usninowy) [a].

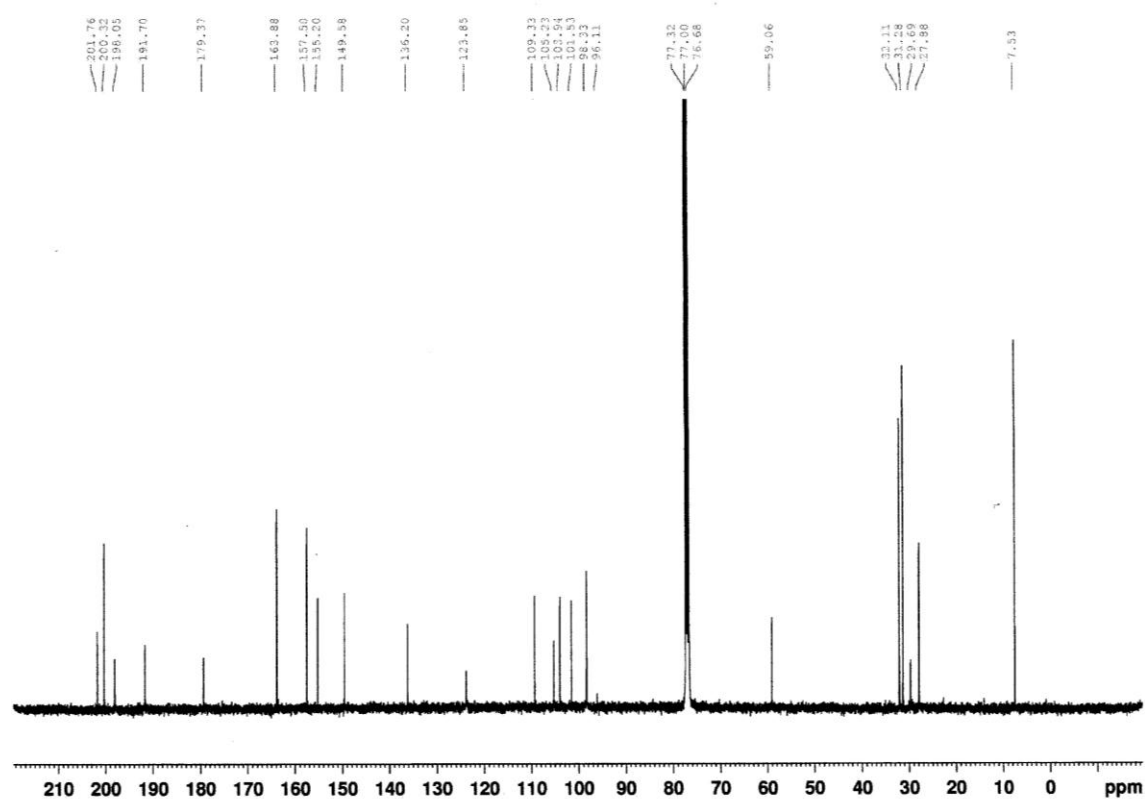
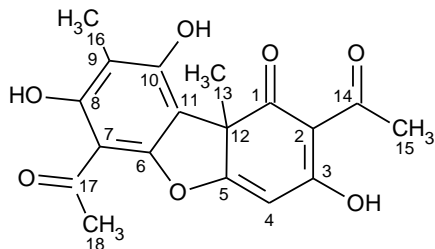


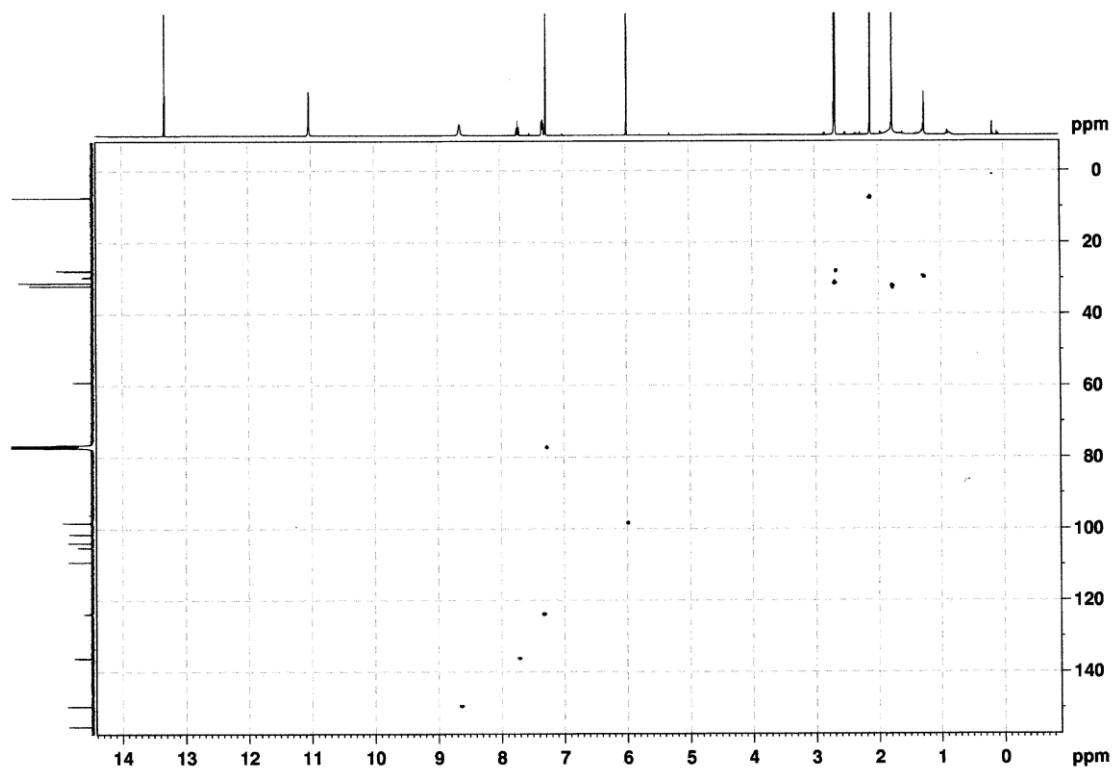


Rycina 55. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku Cu\_1 (kwas (-)-usninowy) [b].

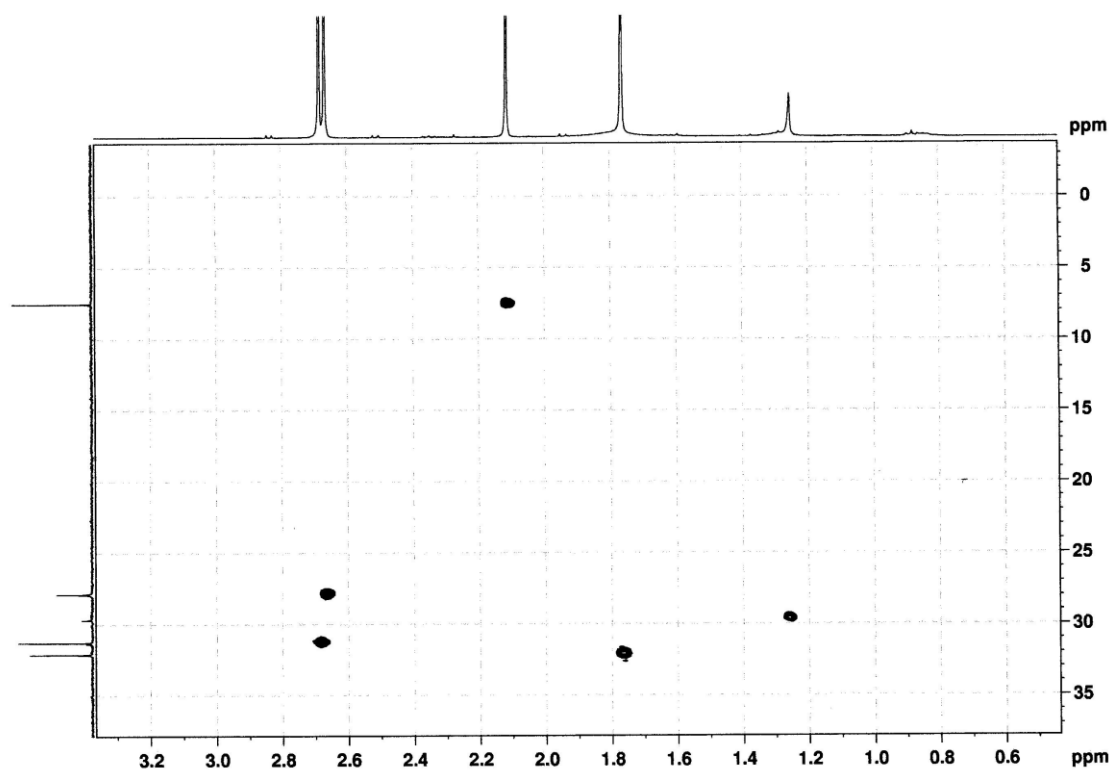
Analiza spektralna  $^{13}\text{C}$  i 2D NMR związku Cu\_1Tabela 38.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) i  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (400 MHz) związku Cu\_1 (kwas (-)-usninowy); chloroform-*d*

Pozycja	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	HSQC	Pozycja	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	HSQC
1	198,05		10	163,88	
2	179,37		11	105,23	
3	155,20		12	59,06	
4	98,33	5,98	13	32,11	1,76
5	101,53		14	200,32	
6	96,11		15	27,88	2,66
7	109,33		16	7,53	2,11
8	157,50		17	201,76	
9	103,94		18	31,28	2,68

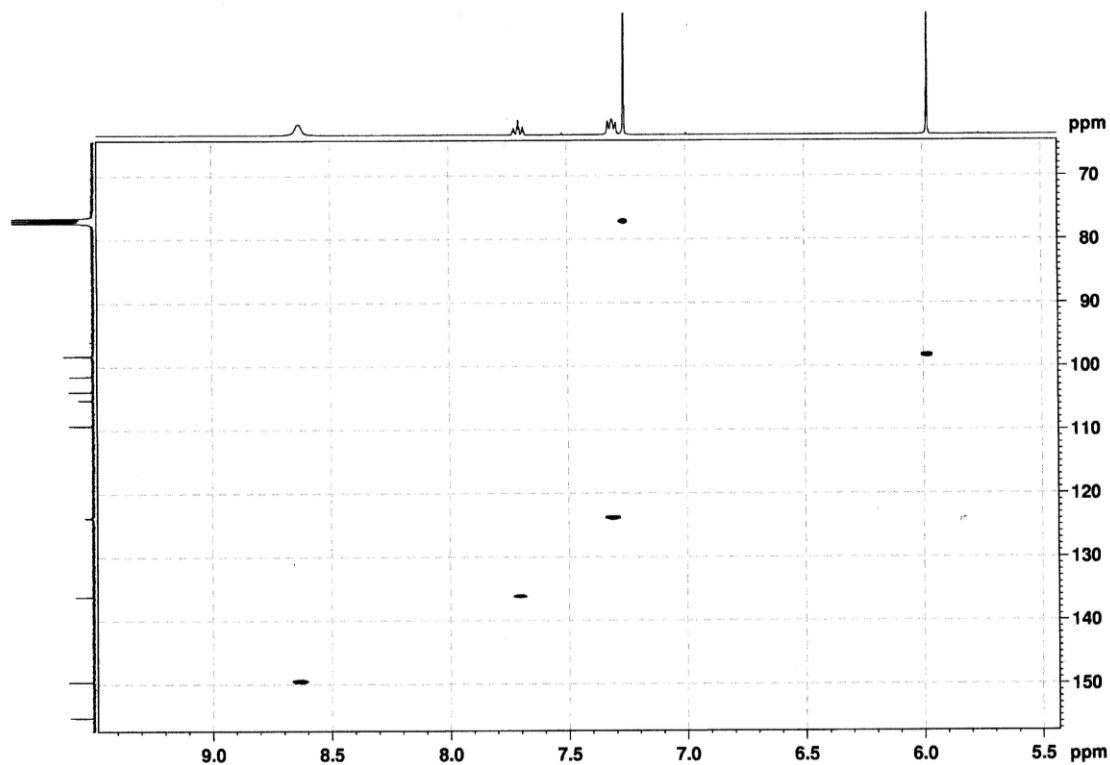
Rycina 56. Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR związku Cu\_1 (kwas (-)-usninowy).



Rycina 57. Widmo  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC NMR związku Cu\_1 (kwas (-)-usninowy) [a].

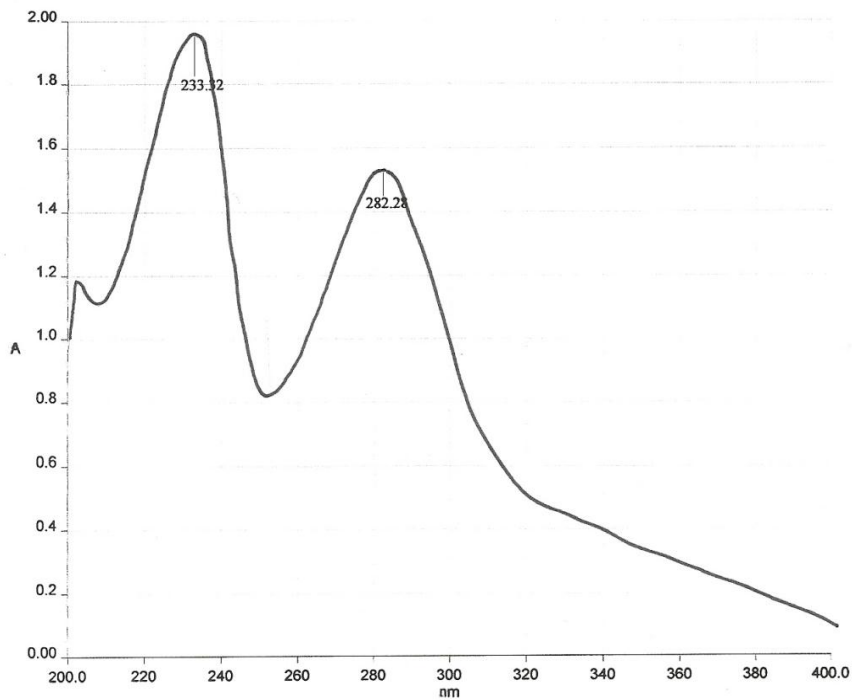


Rycina 58. Widmo  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC NMR związku Cu\_1 (kwas (-)-usninowy) [b].



Rycina 59. Widmo  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC związku Cu\_1 (kwas (-)-usninowy) [c].

### Analiza spektralna w nadfiolecie związku Cu\_1

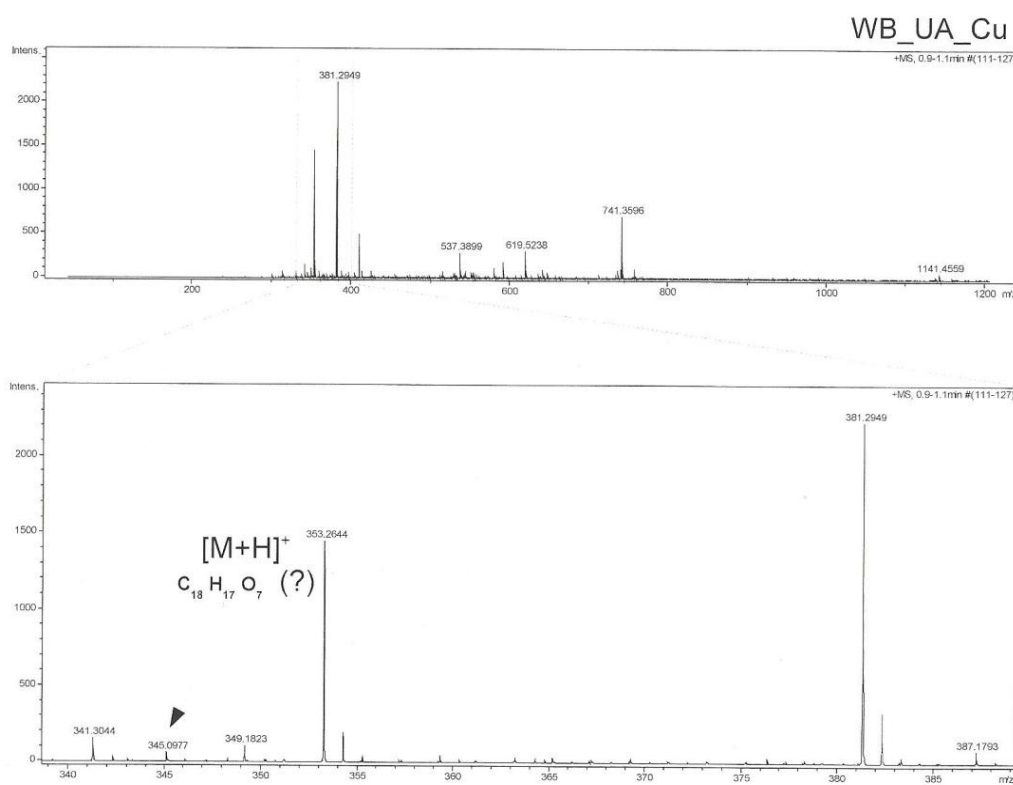


Rycina 60. Widmo w nadfiolecie związku Cu\_1 (kwas (-)-usninowy).

## Analiza spektralna MS związku Cu\_1

Tabela 39. ESI-MS związku Cu\_1 (kwas (-)-usninowy)

Tryb jonizacji	Fragmentacja	m/z	Wzór sumaryczny	Masa cząsteczkowa	
				wyznaczona	teoretyczna
ES+	[M+H] <sup>+</sup>	345,0977	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	344	344,31544



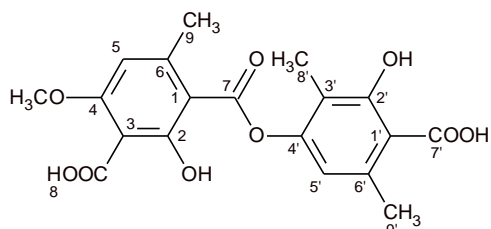
Rycina 61. Widmo ESI-MS związku Cu\_1 (kwas (-)-usninowy).

## Badanie skręcalności optycznej związku Cu\_1

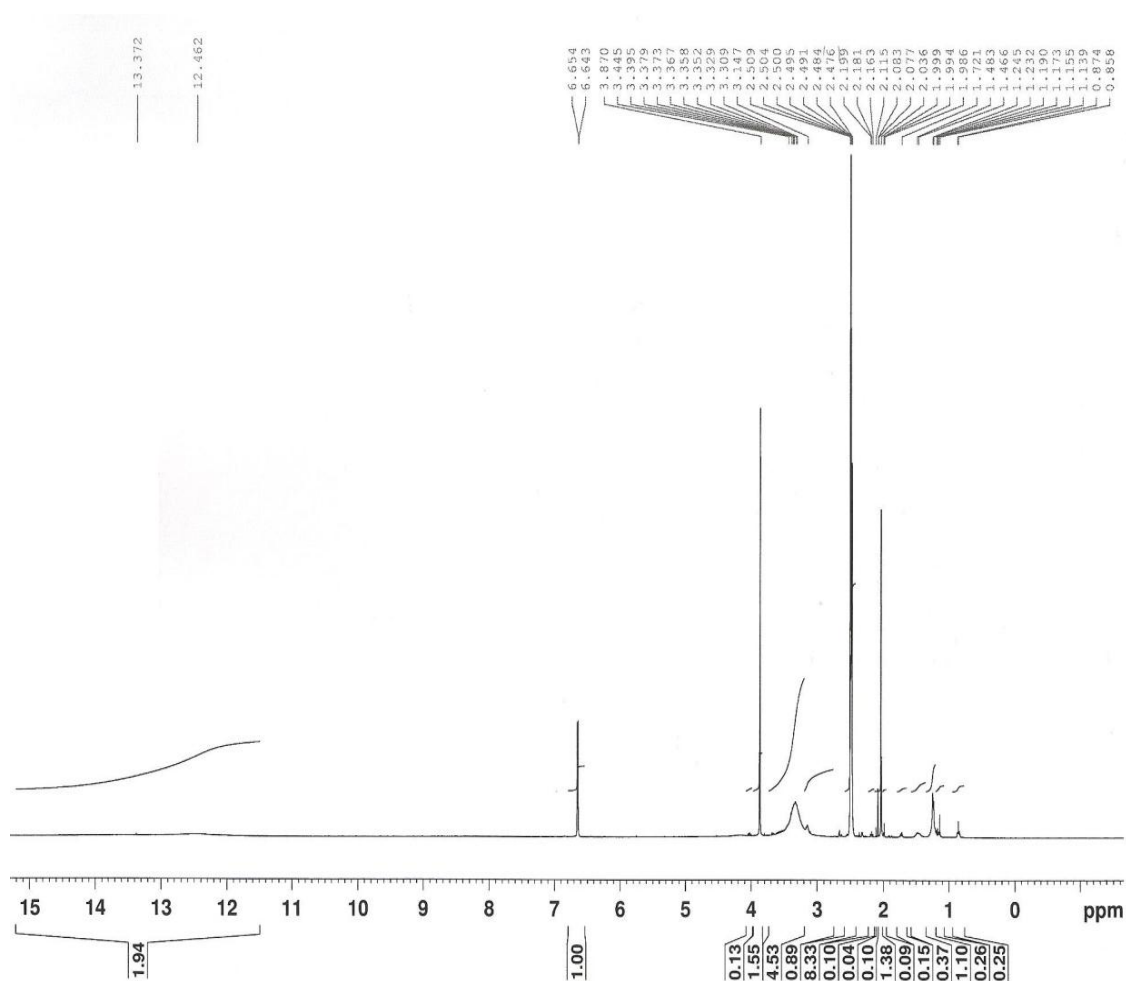
Tabela 40. Skręcalność optyczna związku Cu\_1 (kwas (-)-usninowy)

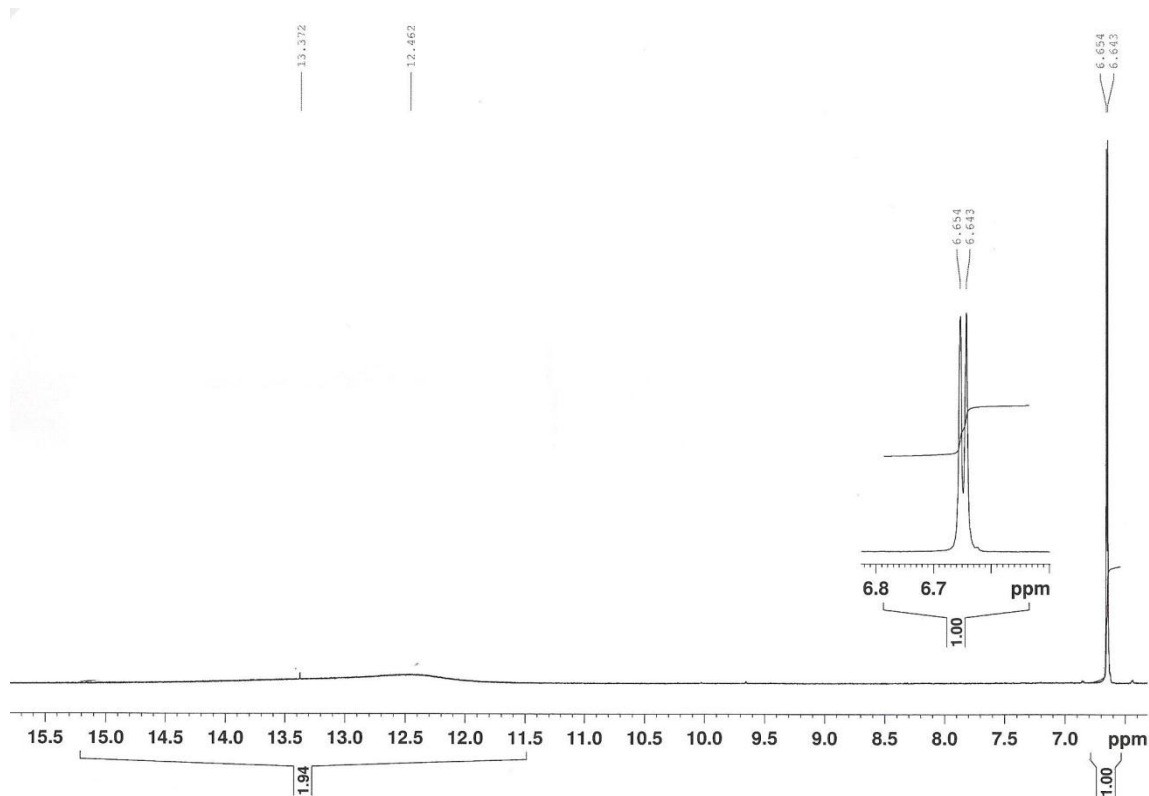
Próbka kwasu usninowego	[α] <sub>D</sub>	Parametry
Soxhlet	-18,3	C=0,6; CHCl <sub>3</sub>
ultradźwięki	-537,2	C=0,29; CHCl <sub>3</sub>

## 5.4.7. Identyfikacja związku Cu\_2 (kwas skwamatowy)

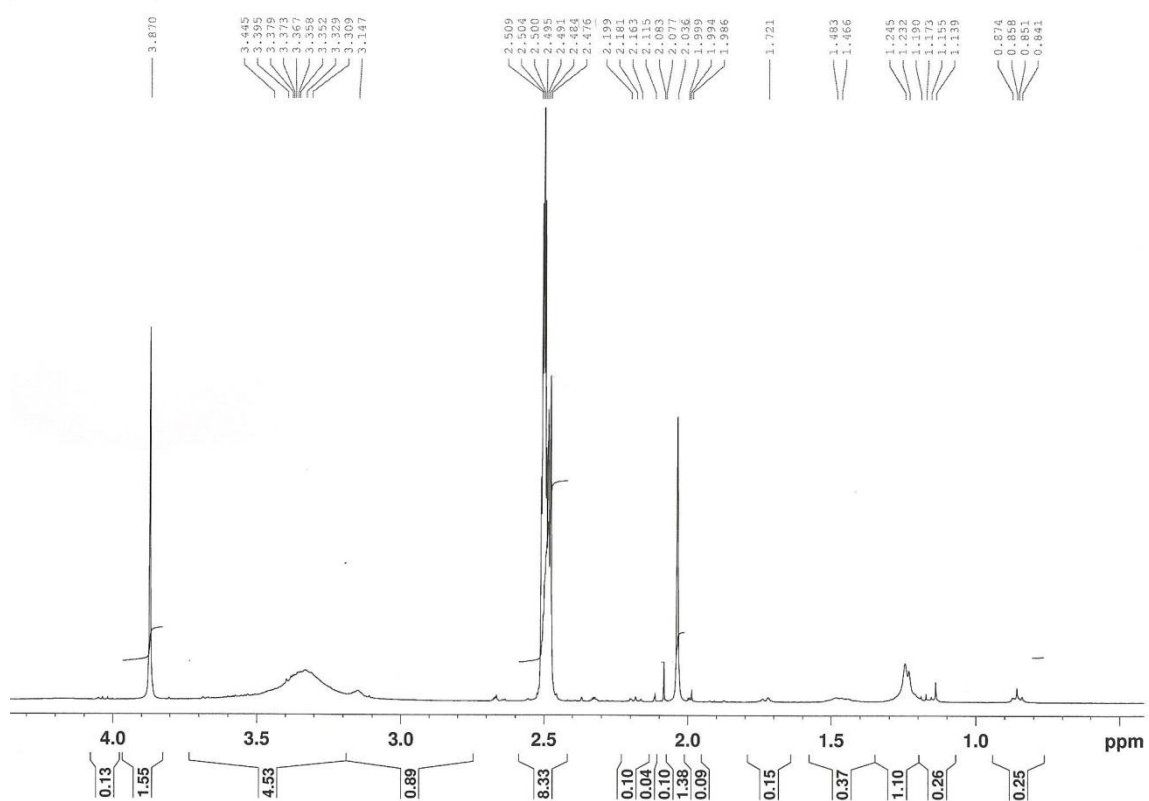
Analiza spektralna  $^1\text{H}$  NMR związku Cu\_2Tabela 41.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) związku Cu\_2 (kwas skwamatowy);  $\text{DMSO}-d_6$ 

Pozycja	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	Multiplietowość	
$\text{CH}_3\text{O-4}$	3,87	s	3H
5	6,64	s	1H
5'	6,65	s	1H
8'	2,04	s	3H
9	2,48	s	3H
9'	2,48	s	3H

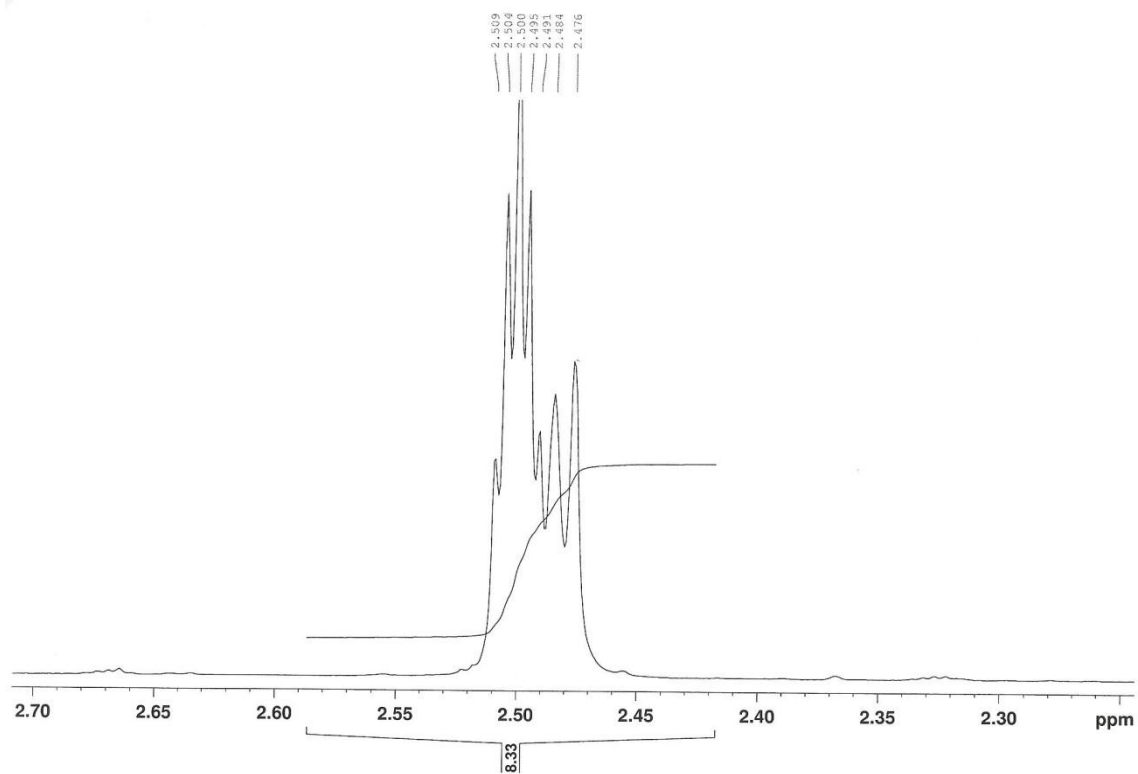
Rycina 62. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku Cu\_2 (kwas skwamatowy) [a].



Rycina 63. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku Cu<sub>2</sub> (kwas skwamatowy) [b].



Rycina 64. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku Cu<sub>2</sub> (kwas skwamatowy) [c].

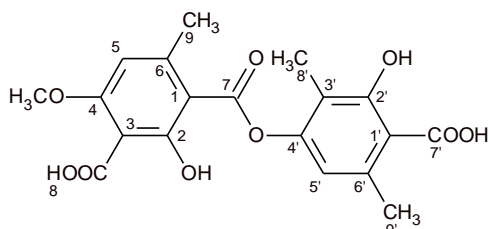


**Rycina 65.** Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku Cu<sub>2</sub> (kwas skwamatowy) [d].

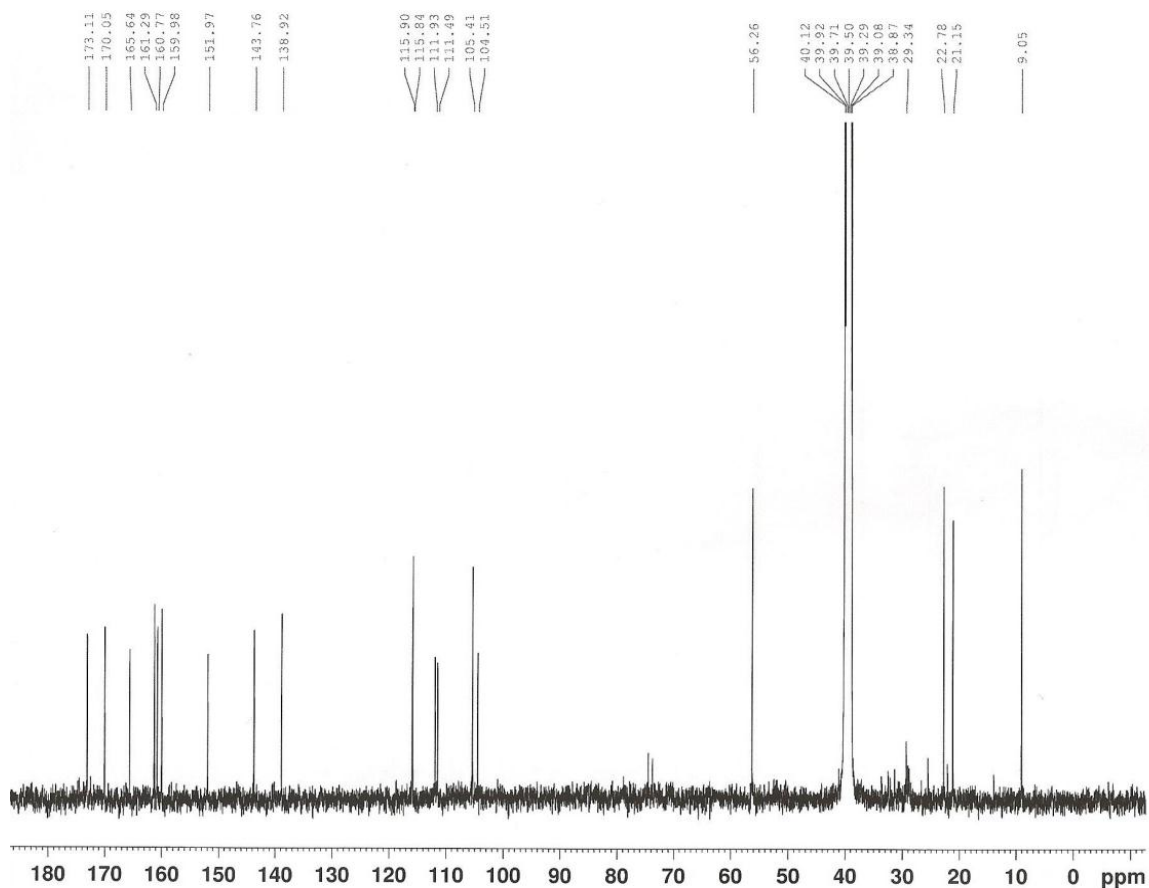


## Analiza spektralna $^{13}\text{C}$ i 2D NMR związku Cu\_2

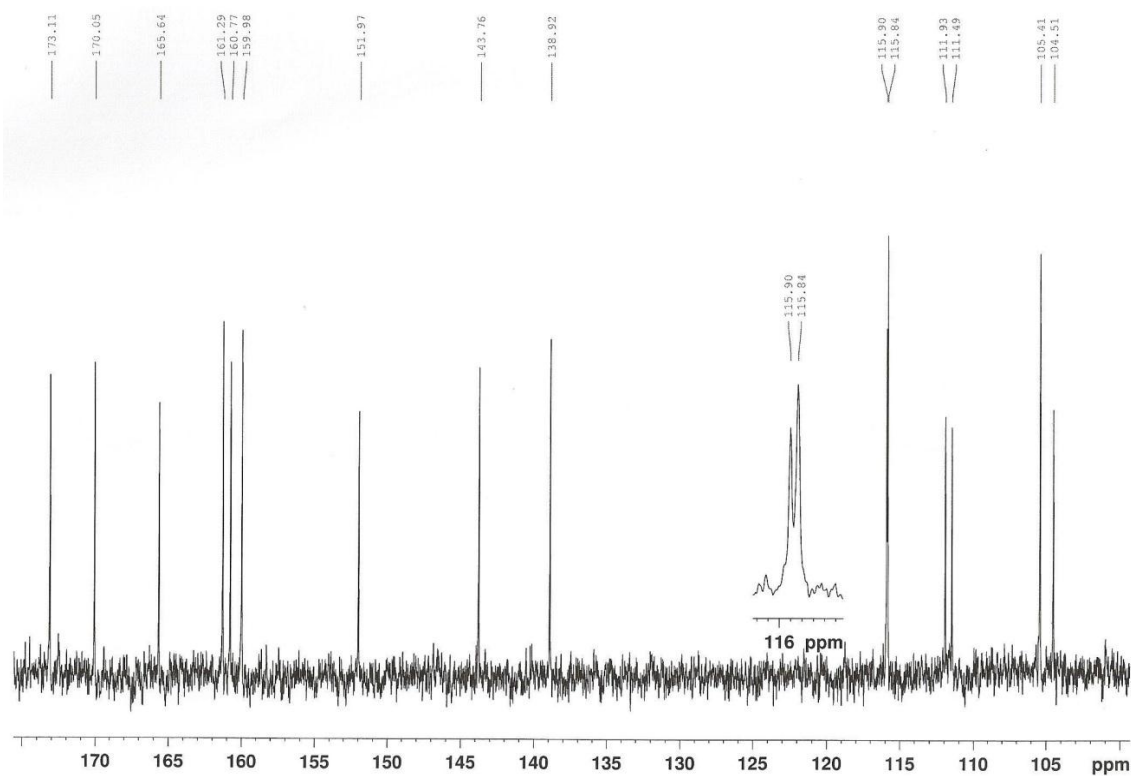
**Tabela 42.**  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) i  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (400 MHz) związku Cu\_2 (kwas skwamatowy);  $\text{DMSO-}d_6$



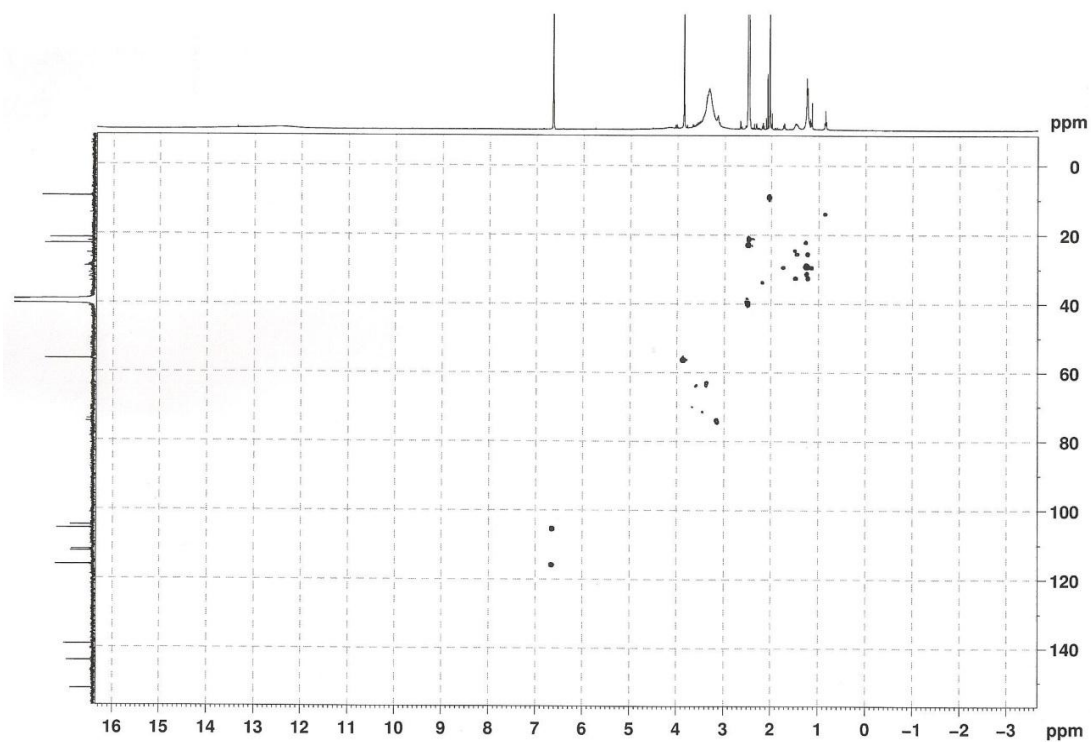
Pozycja	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	HSQC	Pozycja	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	HSQC
1	111,49		1'	111,93	
2	159,98		2'	161,93	
3	104,51		3'	115,84	
4	160,77		4'	151,97	
5	105,41	6,64	5'	115,90	6,65
6	143,76		6'	138,92	
7	165,64		7'	173,11	
8	170,20		8'	9,05	2,04
9	21,15	2,48	9'	22,78	2,48
			CH <sub>3</sub> O-4	56,26	3,87



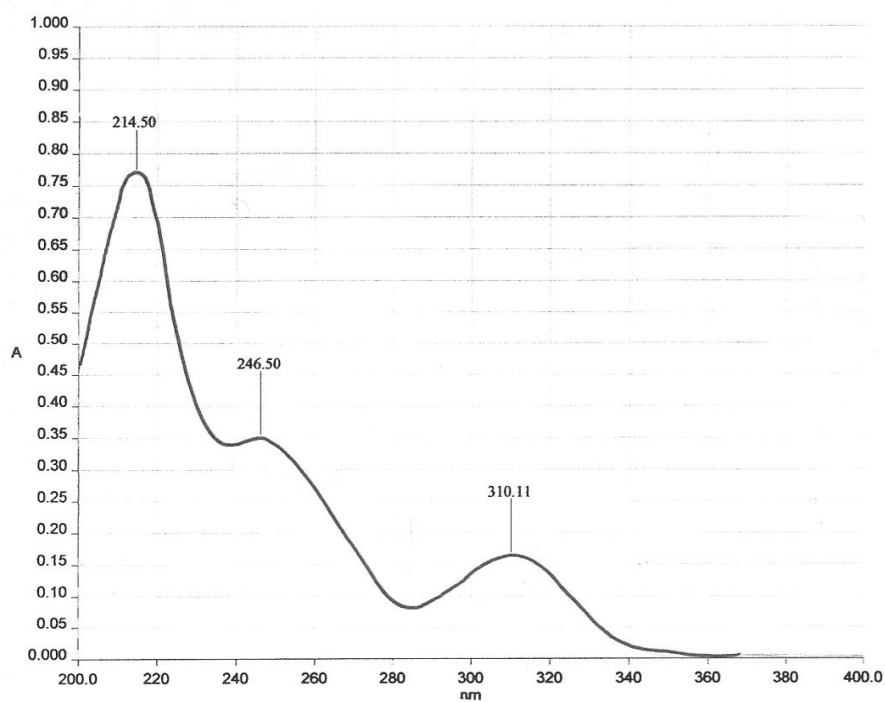
**Rycina 66.** Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR związku Cu\_2 (kwas skwamatowy) [a].



Rycina 67. Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR związku Cu<sub>2</sub> (kwas skwamatowy) [b].



Rycina 68. Widmo  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC związku Cu<sub>2</sub> (kwas skwamatowy).

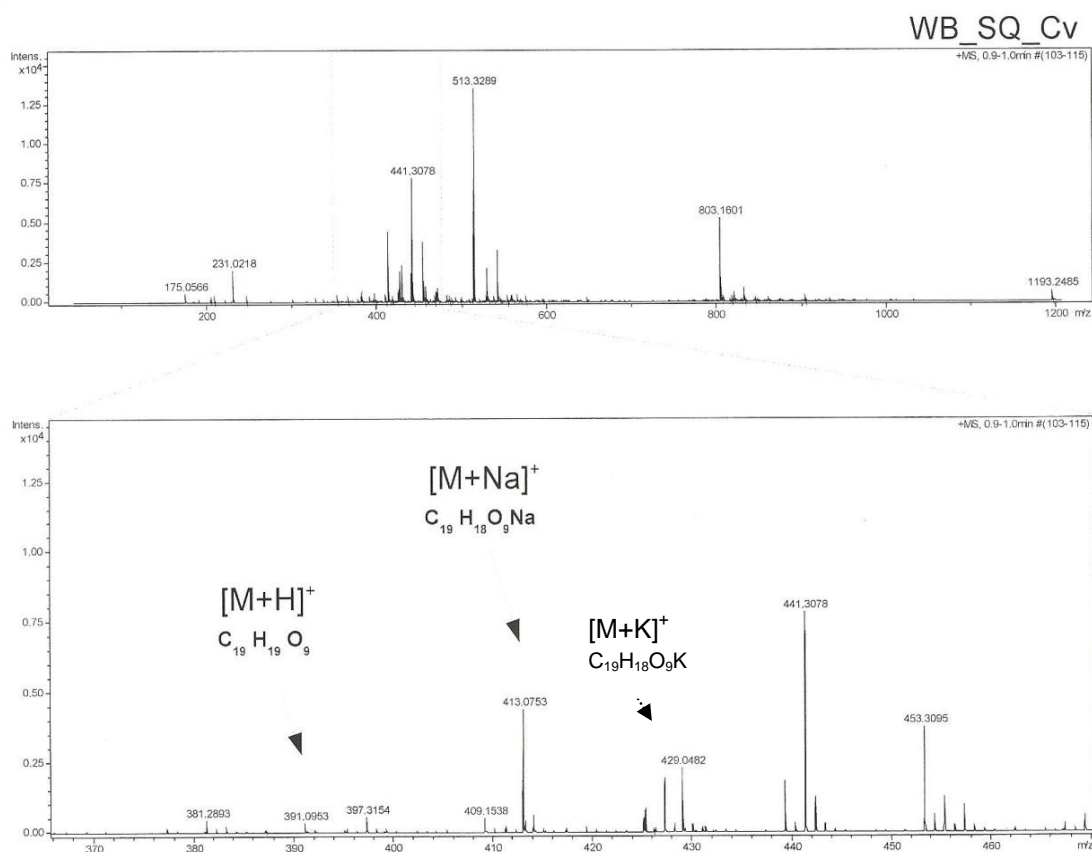
**Analiza spektralna w nadfiolecie związku Cu\_2**

**Rycina 69.** Widmo w nadfiolecie związku Cu<sub>2</sub> (kwas skwamatowy).

## Analiza spektralna MS związku Cu\_2

Tabela 43. ESI-MS związku Cu\_2 (kwas skwamatowy)

Tryb jonizacji	Fragmentacja	m/z	Wzór sumaryczny	Masa cząsteczkowa	
				wyznaczona	teoretyczna
ES <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	391,0953	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	390	390,34082
	[M+Na] <sup>+</sup>	413,0753			
	[M+K] <sup>+</sup>	429,0482			



Rycina 70. Widmo ESI-MS związku Cu\_2 (kwas skwamatowy).

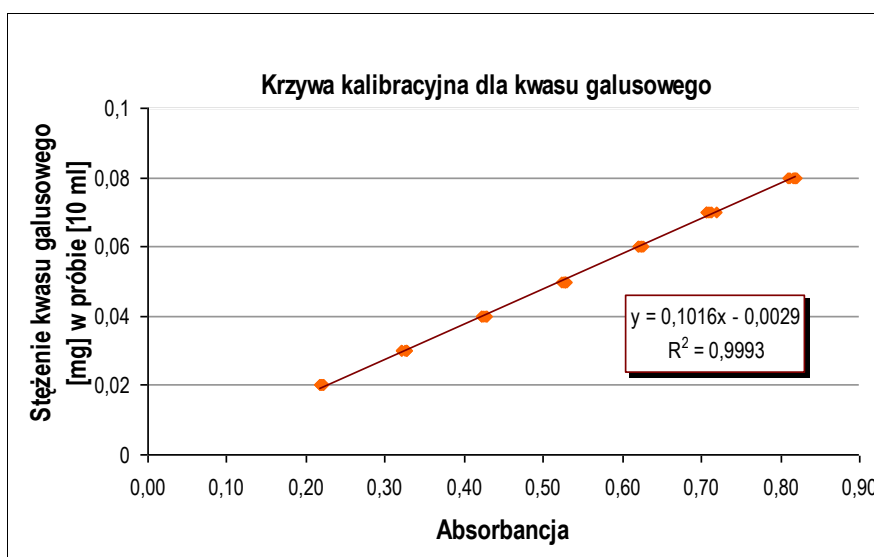
## 5.5. Oznaczenie sumy polifenoli metodą z odczynnikiem Folin-Ciocalteu

### 5.5.1. Krzywa kalibracyjna dla kwasu galusowego

Wyniki pomiaru absorbancji próbek zawierających określone stężenie kwasu galusowego posłużyły do wykreślenia krzywej kalibracyjnej, przedstawiającej zależność stężenia kwasu galusowego od wartości zmierzonej w eksperymencie absorbancji. Otrzymane wyniki wraz z oceną parametrów statystycznych przedstawiono w tabeli poniżej (tabela 44). Krzywą kalibracyjną przedstawia rycina 71.

**Tabela 44.** Wartości absorbancji dla krzywej kalibracyjnej roztworu kwasu galusowego i wyniki analizy statystycznej

Zawartość kwasu galusowego [mg] w próbce [10 ml]		0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08
Wartości absorbancji	1	0,2213	0,3260	0,4231	0,5286	0,6252	0,7099	0,8109
	2	0,2195	0,3276	0,4223	0,5284	0,6220	0,7093	0,8187
	3	0,2176	0,3264	0,4278	0,5273	0,6256	0,7181	0,8184
	4	0,2180	0,3215	0,4227	0,5272	0,6241	0,7061	0,8091
	5	0,2228	0,3277	0,4269	0,5254	0,6201	0,7066	0,8195
	6	0,2203	0,3216	0,4294	0,5235	0,6193	0,7136	0,8167
Absorbancja średnia		<b>0,2199</b>	<b>0,3251</b>	<b>0,4254</b>	<b>0,5267</b>	<b>0,6227</b>	<b>0,7106</b>	<b>0,8156</b>
Ocena statystyczna n=6 f=n-1=5=2,571	S	0,0020	0,0029	0,0030	0,0020	0,0027	0,0046	0,0044
	S <sub>sr</sub>	0,0008	0,0012	0,0012	0,0008	0,0011	0,0019	0,0018
	Wz%	0,9000	0,8777	0,7146	0,3704	0,4275	0,6408	0,5434
	μ	0,2199 ± 0,0021	0,3251 ± 0,0030	0,4254 ± 0,0032	0,5267 ± 0,0020	0,6227 ± 0,0028	0,7106 ± 0,0048	0,8156 ± 0,0047
	A <sub>sr</sub> ±2S	0,2199 ±0,0040	0,3251 ± 0,0057	0,4254 ± 0,0061	0,5267 ± 0,0039	0,6227 ± 0,0053	0,7106 ± 0,0091	0,8156 ± 0,0089



**Rycina 71.** Krzywa kalibracyjna dla roztworu wzorcowego kwasu galusowego.

### 5.5.2. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli w badanych wyciągach w przeliczeniu na kwas galusowy

Zawartość sumy polifenoli w wyciągach acetonowych i metanolowych z badanych porostów obliczono z krzywej kalibracyjnej i przeliczono na kwas galusowy.

**Tabela 45.** Zawartość polifenoli [%] w wyciągach acetonowych i metanolowych z badanych porostów

Gatunek porostu	Zawartość polifenoli w wyciągu [%]	
	aceton	metanol
<i>H. physodes</i>	29,94	19,74
<i>P. sulcata</i>	13,08	7,49
<i>H. scalaris</i>	47,69	26,89
<i>C. uncialis</i>	7,04	3,07

#### 5.5.2.1. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli w wyciągach z *H. physodes*

**Tabela 46.** Zawartość polifenoli w wyciągach: acetonowym a) i metanolowym b), z *H. physodes* w przeliczeniu na kwas galusowy [mg GAE/g wyciągu]

a)

b)

Wyciąg acetonowy			
n	Absorbancja	Zawartość polifenoli [mg GAE/g wyciągu]	Parametry oceny statystycznej
1	0,6222	301,5776	n = 12 f = n-1 = 11 (2,201) S = 4,9393 S <sub>sr</sub> = 1,4258 Wz% = 1,6497 μ = 299,4017 ± 3,1383 A <sub>sr</sub> ±2S = 299,4017 ± 9,8785
2	0,6228	301,8824	
3	0,6278	304,4224	
4	0,6269	303,9652	
5	0,6286	304,8288	
6	0,6311	306,0988	
7	0,6146	297,7168	
8	0,6119	296,3452	
9	0,6029	291,7732	
10	0,6068	293,7544	
11	0,6099	295,3292	
12	0,6095	295,1260	
<b>Średnia</b>	<b>0,6179</b>	<b>299,4017</b>	

Wyciąg metanolowy			
n	Absorbancja	Zawartość polifenoli [mg GAE/g wyciągu]	Parametry oceny statystycznej
1	0,6117	197,4957	n = 12 f = n-1 = 11 (2,201) S = 3,3302 S <sub>sr</sub> = 0,9613 Wz% = 1,6868 μ = 197,4224 ± 2,1159 A <sub>sr</sub> ±2S = 197,4224 ± 6,6604
2	0,6090	196,5813	
3	0,6217	200,8824	
4	0,6258	202,2709	
5	0,6172	199,3584	
6	0,6157	198,8504	
7	0,6136	198,1392	
8	0,6145	198,4440	
9	0,5930	191,1627	
10	0,6169	199,2568	
11	0,6024	194,3461	
12	0,5963	192,2803	
<b>Średnia</b>	<b>0,6115</b>	<b>197,4224</b>	

### 5.5.2.2. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli w wyciągach z *P. sulcata*

**Tabela 47.** Zawartość polifenoli w wyciągach: acetonowym a) i metanolowym b), z *P. sulcata* w przeliczeniu na kwas galusowy [mg GAE/g wyciągu]

a)

Wyciąg acetonowy			
n	Absorbancja	Zawartość polifenoli [mg GAE/g wyciągu]	Parametry oceny statystycznej
1	0,6642	129,1654	n = 12; f = n-1 = 11 (2,201) S = 1,4655 S <sub>sr</sub> = 0,4231 Wz% = 1,1208 μ = 130,7521 ± 0,9311 A <sub>sr</sub> ±2S = 130,7521 ± 2,9310
2	0,6864	133,6765	
3	0,6728	130,9130	
4	0,6781	131,9899	
5	0,6810	132,5792	
6	0,6606	128,4339	
7	0,6737	131,0958	
8	0,6725	130,8520	
9	0,6674	129,8157	
10	0,6701	130,3643	
11	0,6702	130,3846	
12	0,6671	129,7547	
<b>Średnia</b>	<b>0,6720</b>	<b>130,7521</b>	

b)

Wyciąg metanolowy			
n	Absorbancja	Zawartość polifenoli [mg GAE/g wyciągu]	Parametry oceny statystycznej
1	0,7715	75,4844	n = 12; f = n-1 = 11 (2,201) S = 0,8150 S <sub>sr</sub> = 0,2353 Wz% = 1,0884 μ = 74,8799 ±0,5178 A <sub>sr</sub> ±2S = 74,8799 ±1,6300
2	0,7741	75,7486	
3	0,7747	75,8095	
4	0,7738	75,7181	
5	0,7697	75,3015	
6	0,7660	74,9256	
7	0,7506	73,3610	
8	0,7629	74,6106	
9	0,7653	74,8545	
10	0,7659	74,9154	
11	0,7625	74,5700	
12	0,7496	73,2594	
<b>Średnia</b>	<b>0,7656</b>	<b>74,8799</b>	

### 5.5.2.3. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli w wyciągach z *H. scalaris*

**Tabela 48.** Zawartość polifenoli w wyciągach: acetonowym a) i metanolowym b), z *H. scalaris* w przeliczeniu na kwas galusowy [mg GAE/g wyciągu]

a)

Wyciąg acetonowy			
n	Absorbancja	Zawartość polifenoli [mg GAE/g wyciągu]	Parametry oceny statystycznej
1	0,5066	485,7056	n = 12; f = n-1 = 11 (2,201) S = 8,5726 S <sub>sr</sub> = 2,4747 Wz% = 1,7974 μ = 476,9426 ± 5,4468 A <sub>sr</sub> ±2S = 476,9426 ±17,1452
2	0,5024	481,4384	
3	0,5027	481,7432	
4	0,5010	480,0160	
5	0,5046	483,6736	
6	0,5104	489,5664	
7	0,4985	477,4760	
8	0,4885	467,3160	
9	0,4826	461,3216	
10	0,4953	474,2248	
11	0,4869	465,6904	
12	0,4962	475,1392	
<b>Średnia</b>	<b>0,4980</b>	<b>476,9426</b>	

b)

Wyciąg metanolowy			
n	Absorbancja	Zawartość polifenoli [mg GAE/g wyciągu]	Parametry oceny statystycznej
1	0,5482	263,9856	n = 12; f = n-1 = 11 (2,201) S = 4,4499 S <sub>sr</sub> = 1,2846 Wz% = 1,6585 μ = 268,3121 ±2,8274 A <sub>sr</sub> ±2S = 268,3121 ± 8,8999
2	0,5695	274,8060	
3	0,5688	274,4504	
4	0,5579	268,9132	
5	0,5669	273,4852	
6	0,5632	271,6056	
7	0,5479	263,8332	
8	0,5538	266,8304	
9	0,5566	268,2528	
10	0,5443	262,0044	
11	0,5482	263,9856	
12	0,5553	267,5924	
<b>Średnia</b>	<b>0,5567</b>	<b>268,3121</b>	

5.5.2.4. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli w wyciągach z *C. uncialis*Tabela 49. Zawartość polifenoli w wyciągach: acetonowym a) i metanolowym b), z *C. uncialis* w przeliczeniu na kwas galusowy [mg GAE/g wyciągu]

a)

Wyciąg acetonowy			
n	Absorbancja	Zawartość polifenoli [mg GAE/g wyciągu]	Parametry oceny statystycznej
1	0,7191	70,1606	n = 12; f = n-1 = 11 (2,201) S = 1,4180 S <sub>sr</sub> = 0,4093 Wz% = 2,0154 μ = 70,3604 ±0,9010 A <sub>sr</sub> ±2S = 70,3604 ± 2,8360
2	0,7315	71,4204	
3	0,7279	71,0546	
4	0,7416	72,4466	
5	0,7379	72,0706	
6	0,7233	70,5873	
7	0,7232	70,5771	
8	0,7225	70,5060	
9	0,7142	69,6627	
10	0,7186	70,1098	
11	0,6983	68,0473	
12	0,6947	67,6815	
<b>Średnia</b>	<b>0,7211</b>	<b>70,3604</b>	

b)

Wyciąg metanolowy			
n	Absorbancja	Zawartość polifenoli [mg GAE/g wyciągu]	Parametry oceny statystycznej
1	0,4805	30,6125	n = 12; f = n-1 = 11 (2,201) S = 0,2863 S <sub>sr</sub> = 0,0827 Wz% = 0,9323 μ = 30,6887 ±0,1819 A <sub>sr</sub> ±2S = 30,6887 ± 0,5726
2	0,4823	30,7345	
3	0,4823	30,7345	
4	0,4837	30,8293	
5	0,4842	30,8631	
6	0,4842	30,8631	
7	0,4854	30,9444	
8	0,4797	30,5583	
9	0,4857	30,9647	
10	0,4842	30,8631	
11	0,4716	30,0097	
12	0,4757	30,2874	
<b>Średnia</b>	<b>0,4816</b>	<b>30,6887</b>	



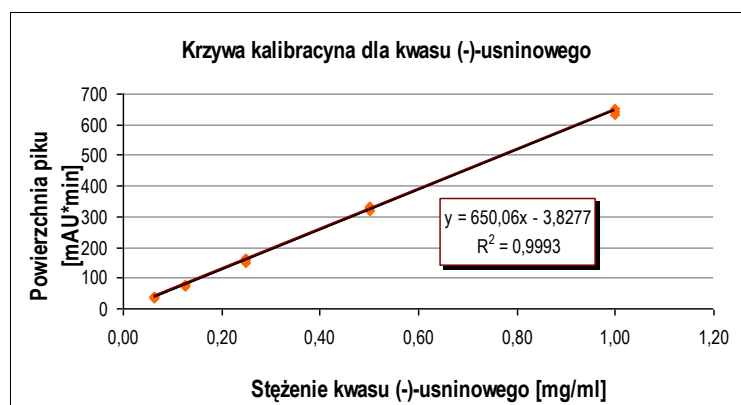
## 5.6. Oznaczenie zawartości kwasu (-)-usninowego w wyciągach z *C. uncialis* metodą HPLC

### Wykreślenie krzywej kalibracyjnych dla wzorcowego kwasu (-)-usninowego

Parametry krzywej kalibracyjnej dla wzorcowego kwasu (-)-usninowego zamieszczono w tabeli 50, a krzywą kalibracyjną przedstawiono na rycinie 72.

Tabela 50. Wyniki analizy HPLC dla krzywej kalibracyjnej kwasu (-)-usninowego

Próbka badana	Badane stężenie [mg/ml]	Czas retencji [min]	Powierzchnia [mAU*min]	Zawartość [mg/mg wyciągu]	Parametry oceny statystycznej
Roztwór wzorcowego kwasu (-)-usninowego	1,0	8,808	634,7610	0,9824	n = 3; f = n-1 = 2 (4,303) S = 9,3492; S <sub>sr</sub> = 5,3978 Wz% = 1,4516 μ = 644,058±23,2265 P <sub>sr</sub> ±2S = 644,058±18,6984
		8,792	643,9555	0,9965	
		8,800	653,4585	1,0111	
	Średnia	<b>8,800</b>	<b>644,058</b>	<b>0,9967</b>	
	0,5	8,783	319,6061	0,4975	n = 3; f = n-1 = 2 (4,303) S = 6,5256; S <sub>sr</sub> = 3,7676 Wz% = 1,9976 μ = 326,6694±16,2118 P <sub>sr</sub> ±2S = 326,6694±13,0512
		8,775	327,9285	0,5103	
		8,775	332,4738	0,5173	
	Średnia	<b>8,778</b>	<b>326,6694</b>	<b>0,5084</b>	
	0,25	8,792	151,1838	0,2385	n = 3; f = n-1 = 2 (4,303) S = 5,7835; S <sub>sr</sub> = 3,3391 Wz% = 3,6676 μ = 157,6911±14,3682 P <sub>sr</sub> ±2S = 157,6911±11,5670
		8,792	159,6449	0,2515	
		8,783	162,2447	0,2555	
	Średnia	<b>8,789</b>	<b>157,6911</b>	<b>0,2485</b>	
	0,125	8,800	71,4414	0,1158	n = 3; f = n-1 = 2 (4,303) S = 3,0293; S <sub>sr</sub> = 1,7490 Wz% = 4,0570 μ = 74,6682±7,5258 P <sub>sr</sub> ±2S = 74,6682±6,0586
		8,783	75,1123	0,1214	
		8,808	77,4510	0,1250	
	Średnia	<b>8,797</b>	<b>74,6682</b>	<b>0,1208</b>	
0,0625	8,808	35,7450	0,0609	n = 3; f = n-1 = 2 (4,303) S = 1,5835; S <sub>sr</sub> = 0,9142 Wz% = 4,2503 μ = 37,2568±3,9340 P <sub>sr</sub> ±2S = 37,2568±3,1670	
	8,800	37,1218	0,0630		
	8,792	38,9034	0,0657		
Średnia	<b>8,800</b>	<b>37,2568</b>	<b>0,0632</b>		

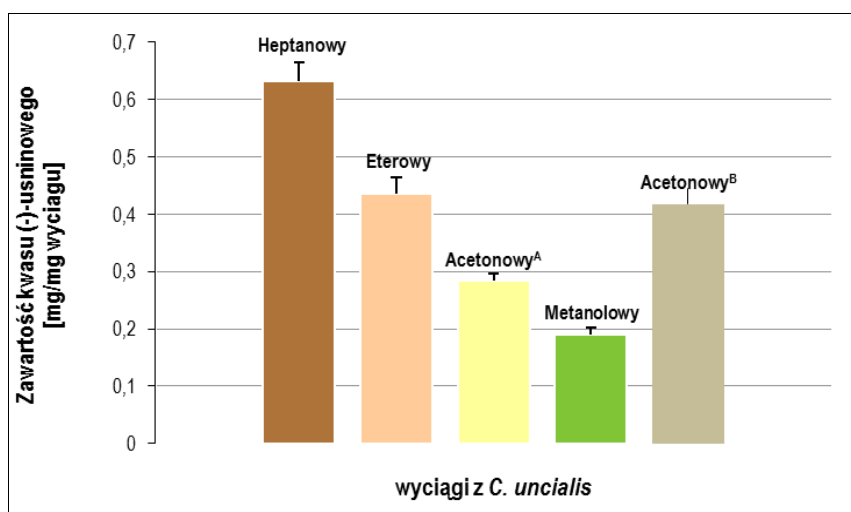


Rycina 72. Krzywa kalibracyjna dla roztworu wzorcowego kwasu (-)-usninowego.

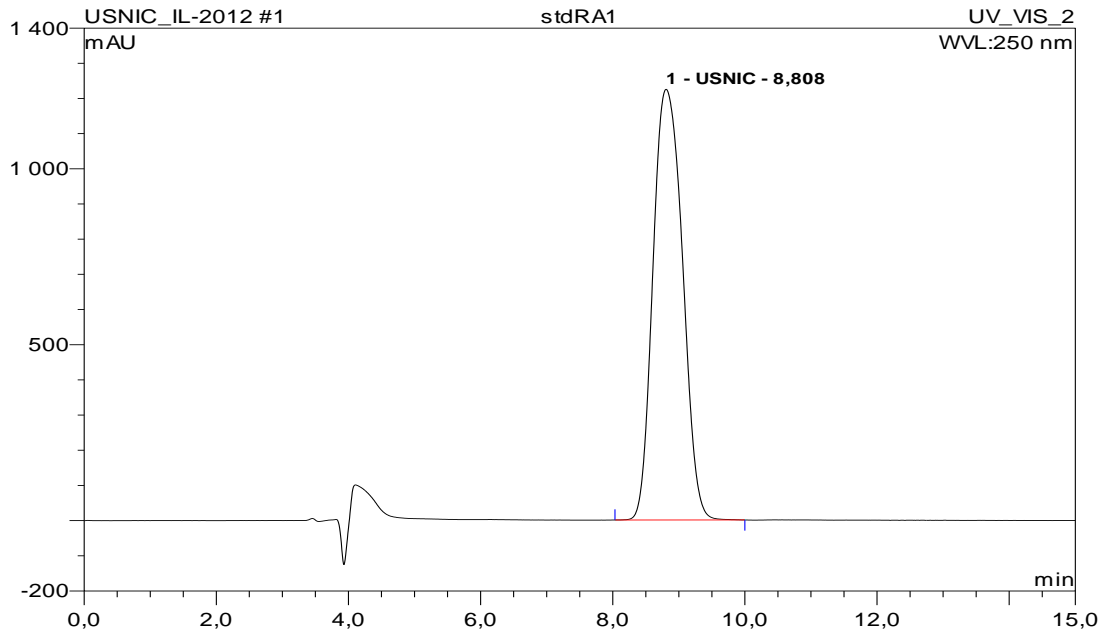
Oznaczenie zawartości kwasu (-)-usninowego w wyciągach z *C. uncialis*Tabela 51. Wyniki analizy zawartości kwasu (-)-usninowego w wyciągach z *C. uncialis*

Badany wyciąg	Czas retencji [min]	Powierzchnia [mAU*min]	Zawartość [mg/mg wyciągu]	Zawartość [%]	Parametry oceny statystycznej
heptanowy <sup>A</sup>	8,833	383,082	0,5952	<b>63,25</b>	n = 3; f = n-1 = 2 (4,303) S = 0,0328; S <sub>sr</sub> = 0,0190 Wz% = 5,1910 μ = 0,6325±0,0816 P <sub>sr</sub> ±2S = 0,6325±0,0657
	8,817	415,854	0,6456		
	8,817	423,160	0,6568		
Średnia	<b>8,822</b>	<b>407,365</b>	<b>0,6325</b>		
eteru dietylowego <sup>A</sup>	8,850	260,913	0,4073	<b>43,67</b>	n = 3; f = n-1 = 2 (4,303) S = 0,0272; S <sub>sr</sub> = 0,0157 Wz% = 6,2363 μ = 0,4367±0,0677 P <sub>sr</sub> ±2S = 0,4367±0,0235
	8,825	283,484	0,4420		
	8,817	295,827	0,4610		
Średnia	<b>8,831</b>	<b>280,075</b>	<b>0,4367</b>		
acetonowy <sup>A</sup>	8,808	171,2536	0,2693	<b>28,40</b>	n = 3; f = n-1 = 2 (4,303) S = 0,0131; S <sub>sr</sub> = 0,0075 Wz% = 4,5756 μ = 0,2840±0,0323 P <sub>sr</sub> ±2S = 0,2840±0,0260
	8,800	183,9010	0,2888		
	8,808	187,2809	0,2940		
Średnia	<b>8,805</b>	<b>180,8118</b>	<b>0,2840</b>		
metanolowy <sup>A</sup>	8,825	111,583	0,1775	<b>19,00</b>	n = 3; f = n-1 = 2 (4,303) S = 0,0117; S <sub>sr</sub> = 0,0068 Wz% = 6,1749 μ = 0,1900±0,0291 P <sub>sr</sub> ±2S = 0,1900±0,0235
	8,825	120,748	0,1916		
	8,808	126,726	0,2008		
Średnia	<b>8,819</b>	<b>119,686</b>	<b>0,1900</b>		
acetonowy <sup>B</sup>	8,850	248,1273	0,3876	<b>41,76</b>	n = 3; f = n-1 = 2 (4,303) S = 0,0270; S <sub>sr</sub> = 0,0156 Wz% = 6,4587 μ = 0,4176±0,0670 P <sub>sr</sub> ±2S = 0,4176±0,0539
	8,842	272,8172	0,4256		
	8,850	282,0407	0,4398		
Średnia	<b>8,847</b>	<b>267,662</b>	<b>0,4176</b>		

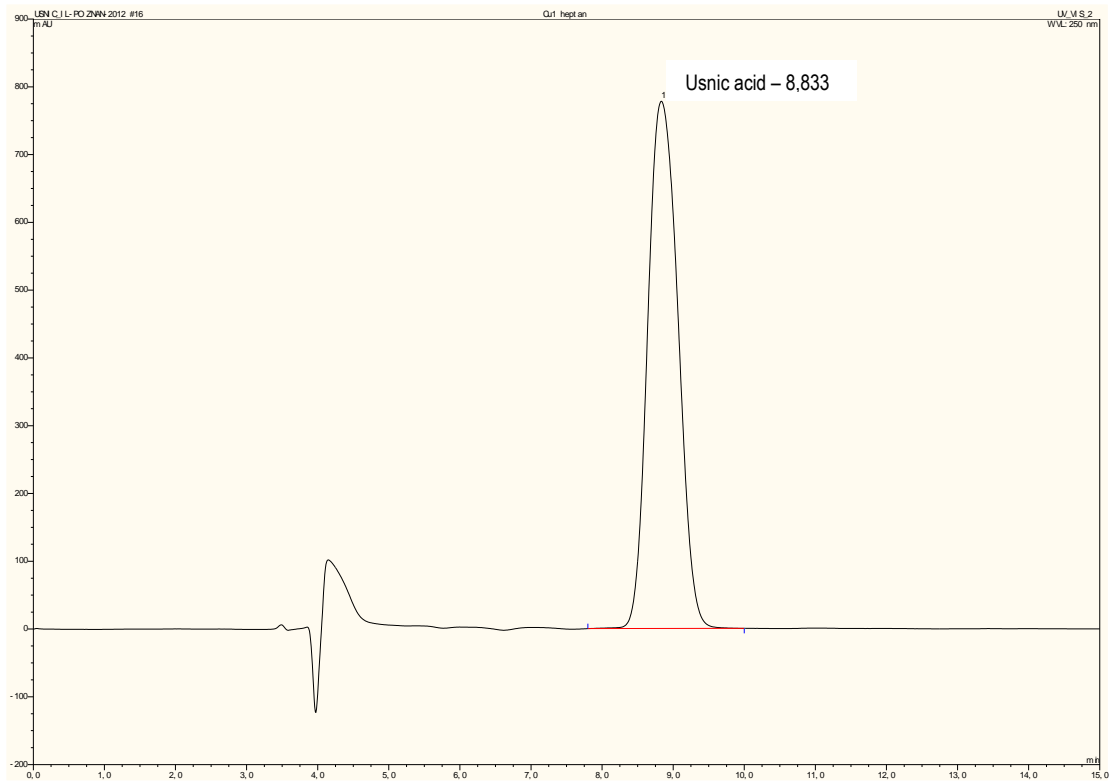
Wyciągi do badań aktywności: <sup>A</sup>przeciwdrobnoustrojowej; <sup>B</sup>antyoksydacyjnej i cytotoksycznej.

Rycina 73. Zawartość kwasu (-)-usninowego w wyciągach z *C. uncialis* (± S).

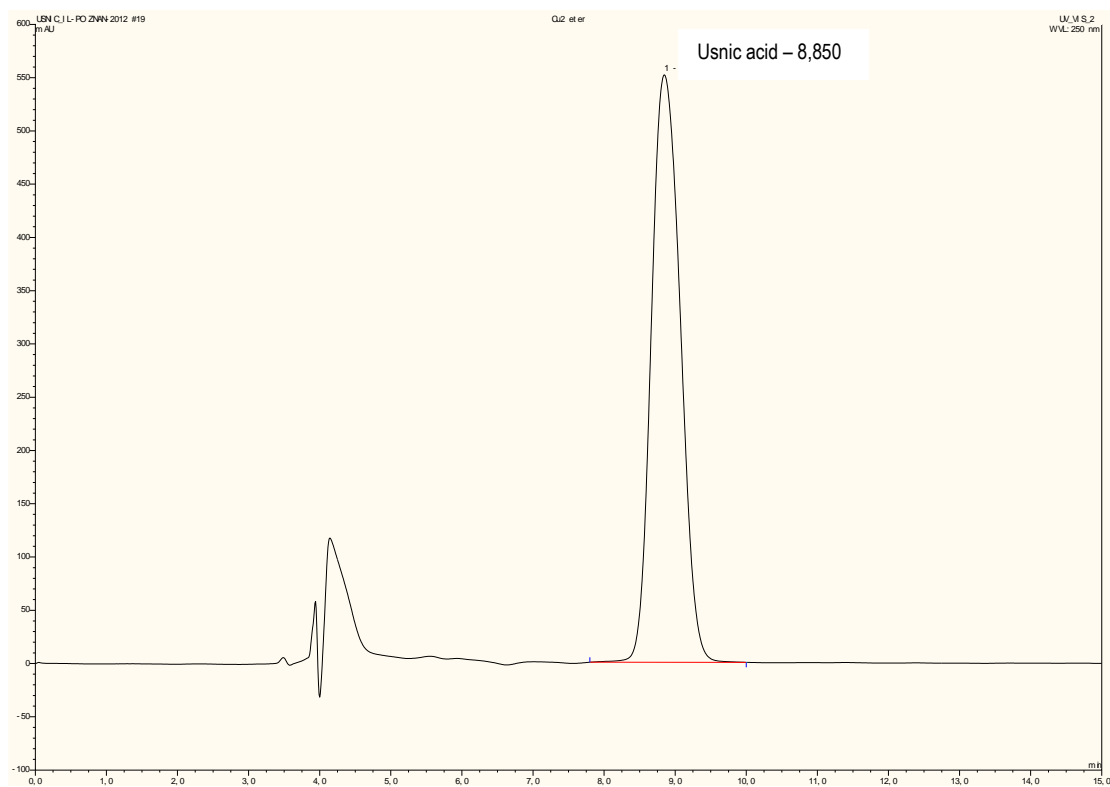
Wyciągi do badań: <sup>A</sup>mikrobiologicznych; aktywności antyoksydacyjnej i cytotoksycznej.



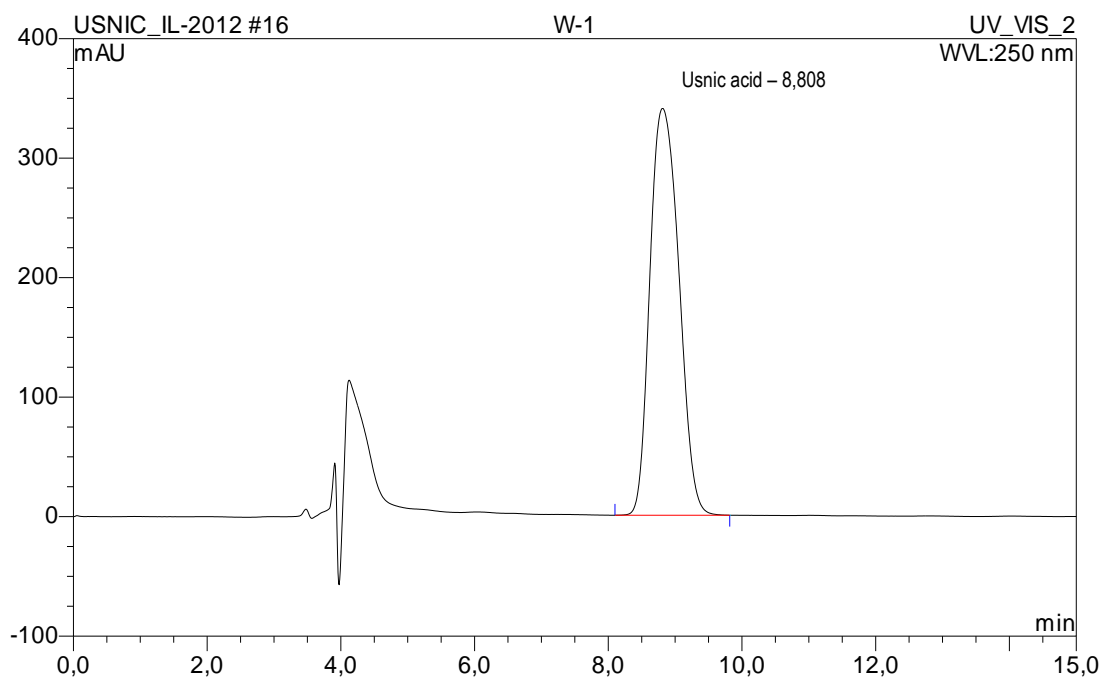
Rycina 74. Chromatogram HPLC kwasu (-)-usninowego.



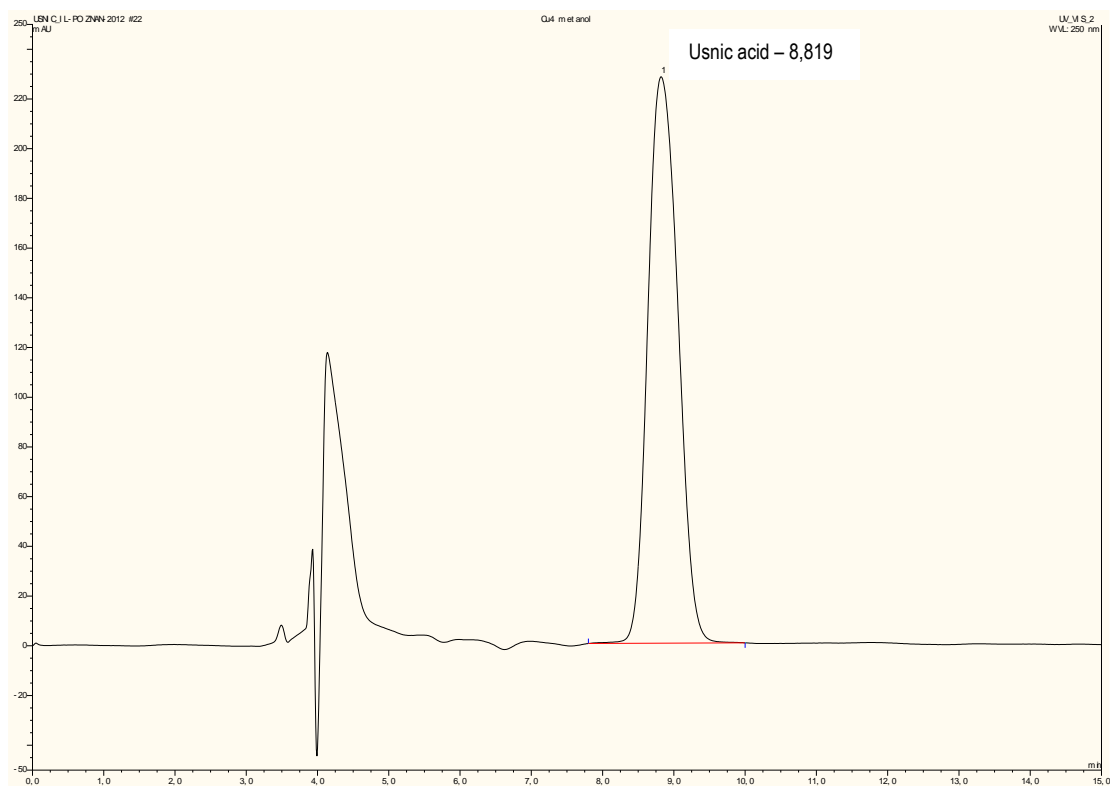
Rycina 75. Chromatogram HPLC wyciągu heptanowego z *C. uncialis*.



**Rycina 76.** Chromatogram HPLC wyciągu eteru dietylowego z *C. uncialis*.



**Rycina 77.** Chromatogram HPLC wyciągu acetonowego z *C. uncialis*.  
(wyciąg do badań przeciwdrobnoustrojowych)



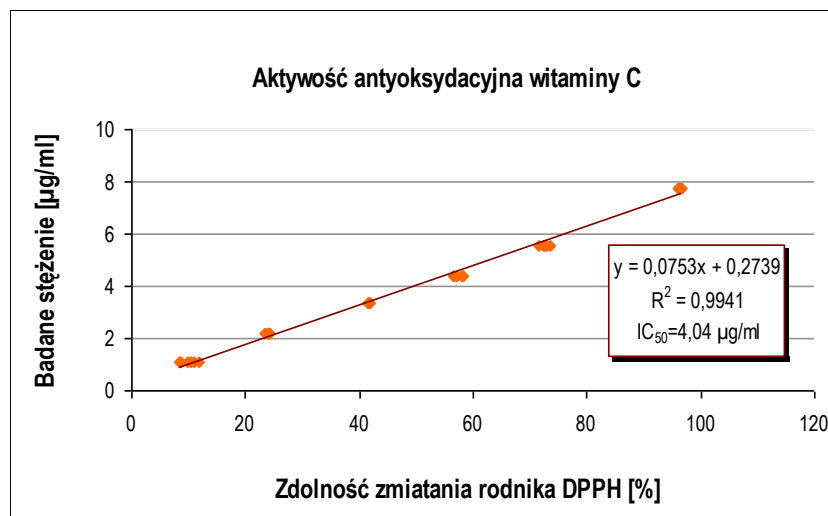
**Rycina 78.** Chromatogram HPLC wyciągu metanolowego z *C. uncialis*.

## **5.7. Badania aktywności antyoksydacyjnej**

### **5.7.1. Oznaczenie właściwości zmiatania wolnych rodników z zastosowaniem odczynnika DPPH**

Zdolność zmiatania wolnych rodników przez wyciągi acetonowe otrzymane z porostów *H. physodes*, *H. scalaris*, *P. sulcata*, *C. uncialis* badano stosując roztwór wolnego rodnika DPPH<sup>•</sup>. Jako substancje porównawcze wykorzystano witaminę C i BHA. Obliczony dla badanej próbki parametr IC<sub>50</sub> oznaczający stężenie związku/wyciągu zmiatające 50% rodnika DPPH<sup>•</sup>, jak również aktywność antyoksydacyjną wyrażoną jako równoważnik witaminy C [μg/ml], przedstawiono poniżej (tabele 52-57, ryciny 79-84).

## Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej witaminy C metodą DPPH

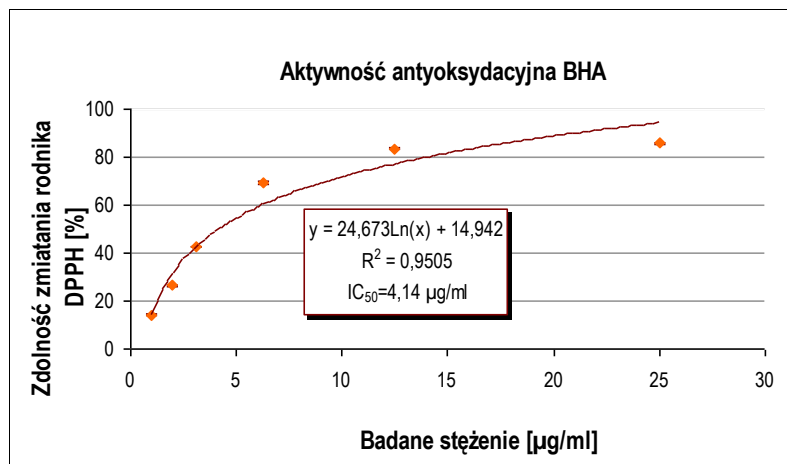


Rycina 79. Aktywność antyoksydacyjna witaminy C.

Tabela 52. Aktywność antyoksydacyjna witaminy C (metoda z DPPH)

Stężenie witaminy C w próbce badanej [µg/ml]		1,1	2,2	3,3	4,4	5,5	7,7
Aktywność antyoksydacyjna zdolność zmiatania DPPH [%]	1	10,3103	23,8839	41,6938	56,5589	72,2648	96,0720
	2	11,7664	23,8647	41,5788	56,4646	72,3031	96,4265
	3	8,6867	24,1521	41,8567	57,1979	72,6097	96,0337
	4	8,3514	24,1809	41,5118	57,0198	73,4336	96,4936
	5	10,8969	23,8168	41,8279	58,0673	73,0025	96,7331
	6	9,9123	23,2899	41,5022	58,3082	71,4696	96,1774
Średnia zdolność zmiatania rodnika DPPH* [%]		10,2967	23,8647	41,6619	57,4163	72,5139	96,3227
Ocena statystyczna n=6 f=n-1=5 (2,571)	S	1,3016	0,3211	0,1559	0,7663	0,6769	0,2742
	S <sub>sr</sub>	0,5314	0,1311	0,0636	0,3128	0,2763	0,1119
	Wz%	13,0321	1,3457	0,3741	1,3380	0,9334	0,2846
	µ	10,2967 ± 1,3661	23,8647 ± 0,3371	41,6619 ± 0,1636	57,4163 ± 0,8043	72,5139 ± 0,7104	96,3227 ± 0,2878
	A <sub>sr</sub> ±2S	10,2967 ± 2,6031	23,8647 ± 0,6423	41,6619 ± 0,3117	57,4163 ± 1,5325	72,5139 ± 1,3537	96,3227 ± 0,5483
Wartość IC <sub>50</sub>		4,04 µg/ml					

## Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej butylowanego hydroksyanizolu (BHA) metodą DPPH



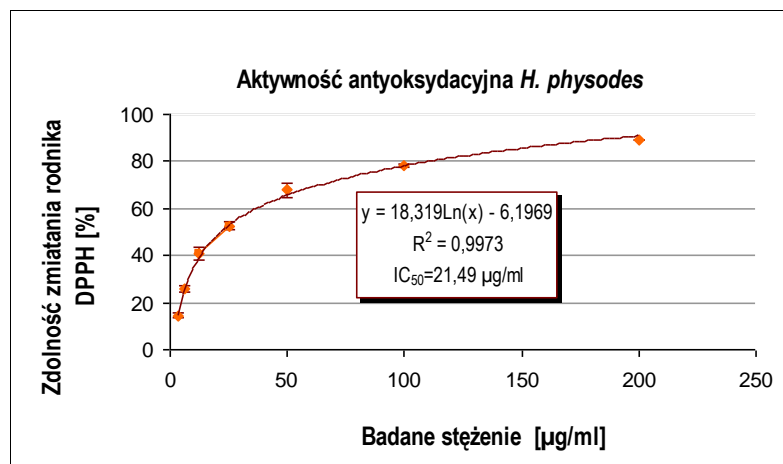
Rycina 80. Aktywność antyoksydacyjna BHA ( $\pm$ S).

Tabela 53. Aktywność antyoksydacyjna BHA (metoda z DPPH)

Stężenie w próbce badanej [µg/ml]		1	2	3,125	6,25	12,5	25
Aktywność antyoksydacyjna zdolność zmierzania DPPH· [%]	1	14,2782	26,1413	42,6389	69,1678	83,9249	85,4026
	2	14,2049	26,8428	42,4692	69,4374	83,2859	85,1530
	3	15,0216	26,9580	42,8686	70,0065	83,2759	86,1814
	4	13,9955	26,5077	42,5890	68,8183	83,3658	85,7321
	5	14,2573	26,3612	42,9085	68,9481	83,8051	85,4725
	6	13,8489	26,3193	43,0383	68,4589	83,0862	86,1315
Średnia zdolność zmierzania rodnika DPPH* [%]		14,2678	26,5217	42,7521	69,1395	83,4573	85,6789
Ocena statystyczna n=6 f=n-1=5 (2,571)	S	0,4055	0,3178	0,2188	0,5374	0,3311	0,4137
	S <sub>sr</sub>	0,1170	0,0918	0,0632	0,1551	0,0956	0,1194
	Wz%	2,8418	1,1984	0,5118	0,7773	0,3967	0,4828
	µ	14,2678 ± 0,3009	26,5217 ± 0,2359	42,7521 ± 0,1624	69,1395 ± 0,3989	83,4573 ± 0,2457	85,6789 ± 0,3070
	A <sub>sr</sub> ±2S	14,2678 ± 0,8109	26,5217 ± 0,6357	42,7521 ± 0,4376	69,1395 ± 1,0749	83,4573 ± 0,6621	85,6789 ± 0,8274
Wartość IC <sub>50</sub>		4,14 µg/ml					



## Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej wyciągu acetonowego z *Hypogymnia physodes* metodą DPPH

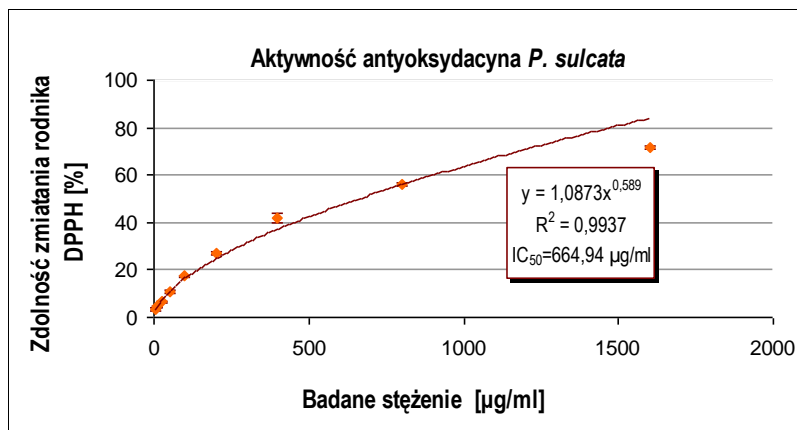


Rycina 81. Aktywność antyoksydacyjna wyciągu acetonowego z *H. physodes* ( $\pm S$ ).

Tabela 54. Aktywność antyoksydacyjna wyciągu acetonowego z *H. physodes* (metoda z DPPH) i stężenie polifenoli w próbce badanej

Stężenie w próbce badanej [µg/ml]		3,125	6,25	12,5	25	50	100	200
Polifenole [µg GA /ml]		0,94	1,87	3,74	7,49	14,97	29,94	59,88
Aktywność antyoksydacyjna zdolność zmiatania DPPH· [%]	1	14,2571	24,3949	37,6871	54,1669	70,3166	76,9593	89,0788
	2	14,5379	27,0111	39,1808	53,6746	71,8901	77,9825	89,3935
	3	15,5510	24,0520	35,8102	53,0858	70,7703	77,6715	89,4126
	4	13,9963	24,4341	38,8183	54,6303	70,6352	78,1731	89,6320
	5	14,1969	26,7956	42,7573	55,1419	69,8050	77,4107	88,8022
	6	14,9391	27,2757	45,8536	54,0994	71,6584	78,1731	88,8117
	7	13,1919	26,6736	42,3370	50,9143	64,6876	78,2859	89,2505
	8	15,9817	26,6435	42,4372	49,7561	65,1116	79,1324	89,4126
	9	14,3017	26,1024	40,6334	52,5687	64,3774	79,7953	88,7640
	10	15,8289	25,8017	40,9941	51,6898	65,6183	78,2553	88,7449
	11	15,0042	25,7616	39,8918	50,9660	64,9565	78,5714	88,9262
	12	13,5585	25,7316	43,1287	51,5760	65,8147	79,2038	89,2409
Średnia zdolność zmiatania rodnika DPPH* [%]		14,6121	25,8898	40,7941	52,6892	67,9701	78,3012	89,1225
Równoważnik wit C [µg/ml]		1,36	2,21	3,34	4,24	5,39	6,17	6,99
Ocena statystyczna n=12 f=n-1=11 (2,201)	S	0,8741	1,0874	2,7280	1,7072	3,0733	0,7942	0,3079
	S <sub>sr</sub>	0,2523	0,3139	0,7875	0,4928	0,8872	0,2293	0,0889
	Wz%	5,9823	4,2000	6,6873	3,2401	4,5216	1,0143	0,3454
	µ	14,612 ± 0,5554	25,8898 ± 0,6909	40,7941 ± 1,7333	52,6892 ± 1,0847	67,9701 ± 1,9527	78,3012 ± 0,5046	89,1225 ± 0,1956
	A <sub>sr</sub> ±2S	14,612± 1,7483	25,8898 ±2,1748	40,9096 ±5,4560	52,6892 ±3,4144	67,9701 ±6,1466	78,3012 ±1,5883	89,1225 ±0,6157
Wartość IC <sub>50</sub>		21,49 µg/ml						

## Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej wyciągu acetonowego z *Parmelia sulcata* metodą DPPH

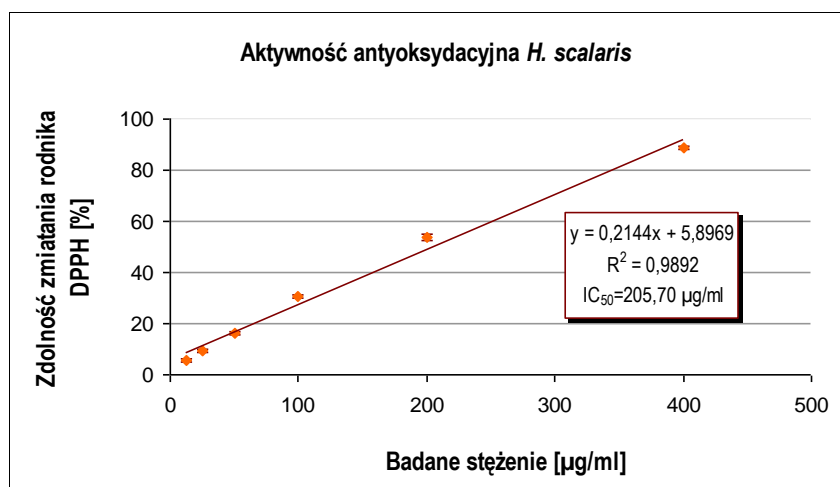


Rycina 82. Aktywność antyoksydacyjna wyciągu acetonowego z *P. sulcata* ( $\pm$ S).

Tabela 55. Aktywność antyoksydacyjna wyciągu acetonowego z *P. sulcata* (metoda z DPPH) i stężenie polifenoli w próbce badanej

Stężenie w próbce badanej [µg/ml]		6,25	12,5	25	50	100	200	400	800	1600
Polifenole [µg GA /ml]		0,82	1,63	3,27	6,54	13,08	26,15	52,30	104,60	209,20
Aktywność antyoksydacyjna zdolność zmierzania DPPH* [%]	1	3,2196	2,6553	4,9782	4,5676	7,0502	26,7462	42,3087	55,9002	72,0214
	2	3,2706	2,9322	4,7899	4,8155	7,5857	26,6504	45,4844	56,5066	71,8840
	3	3,7499	2,4153	4,9688	5,3781	6,6093	25,9600	42,8274	55,7960	71,9135
	4	3,3827	3,0245	4,8369	5,1778	6,8298	26,1901	44,9339	56,7151	72,3942
	5	3,3623	2,4615	5,0159	6,1123	7,1027	26,5832	43,3990	56,7435	72,0214
	6	3,8009	3,0338	4,7145	4,7773	7,3547	26,7271	44,5846	55,6443	72,0606
	7	2,3230	4,5840	7,6545	6,2616	7,5857	28,0076	41,5919	56,7469	70,9226
	8	2,3322	4,9753	4,4435	6,9282	6,6093	27,6476	41,0234	55,2460	71,5799
	9	2,2953	4,7245	2,0955	6,8171	6,8298	27,9176	39,8484	54,9419	71,3641
	10	2,7845	4,9452	7,6545	7,0763	7,1027	28,0176	39,8673	55,1381	71,1679
	11	3,1261	3,9017	2,4467	6,7985	7,3547	27,4476	40,1990	55,9425	71,2170
	12	2,3784	5,2162	4,6944	6,4190	7,0887	27,8276	40,1232	55,7365	72,4138
Średnia zdolność zmierzania rodnika DPPH* [%]		3,2247	4,6617	6,5934	10,7913	17,3055	27,1436	42,1826	55,9215	71,7467
Równoważnik wit C [µg/ml]		0,50	0,61	0,76	1,07	1,56	2,31	3,44	4,48	5,67
Ocena statystyczna n=12 f=n-1=11 (2,201)	S	0,6389	0,3291	0,3142	0,6177	0,5991	0,7460	2,0633	0,6387	0,4889
	S <sub>sr</sub>	0,1844	0,0950	0,0907	0,1783	0,1729	0,2154	0,5956	0,1844	0,1411
	Wz%	19,8127	7,0608	4,7653	5,7237	3,4619	2,7485	4,8914	1,1421	0,6814
	µ	3,2247 ±0,4059	4,6617 ±0,2091	6,5934 ±0,1996	10,7913 ±0,3924	17,3055 ±0,3807	27,1436 ±0,4740	42,1826 ±1,3110	55,9215 ±0,4058	71,7467 ±0,3106
	A <sub>sr</sub> ±2S	3,2247 ±1,2778	4,6617 ±0,6583	6,5934 ±0,6284	10,7913 ±1,2353	17,3055 ±1,1982	27,1436 ±1,4921	42,1826 ±4,1266	55,9215 ±1,2773	71,7467 ±0,9778
Wartość IC <sub>50</sub>		664,94 µg/ml								

### Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej wyciągu acetonowego z *Hypocenomyce scalaris* metodą DPPH

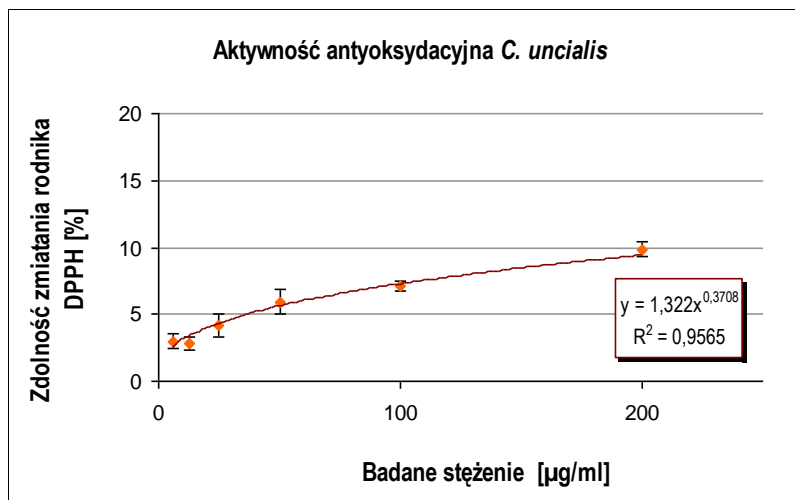


Rycina 83. Aktywność antyoksydacyjna wyciągu acetonowego z *H. scalaris* ( $\pm S$ ).

Tabela 56. Aktywność antyoksydacyjna wyciągu acetonowego z *H. scalaris* (metoda z DPPH) i stężenie polifenoli w próbce badanej

Stężenie w próbce badanej [µg/ml]		12,5	25	50	100	200	400
Polifenole [µg GA /ml]		5,96	11,92	23,84	47,67	95,34	190,68
Aktywność antyoksydacyjna zdolność zmierzania DPPH <sup>+</sup> [%]	1	5,1381	9,3044	16,0773	30,0731	52,0966	88,8179
	2	5,7138	8,6868	15,9412	30,5651	53,3746	89,0276
	3	6,2372	9,8069	15,5853	30,6279	51,3478	88,4485
	4	5,1067	9,4824	15,9098	30,4081	53,0351	88,9776
	5	5,2742	8,8543	15,6899	31,0676	53,2748	87,9493
	6	5,3265	9,6708	16,8100	30,7012	53,8638	89,2372
	7	4,9920	8,9956	17,8810	30,9860	54,2396	89,5343
	8	5,8107	10,3435	17,9423	29,5436	55,3036	89,3809
	9	4,9820	10,9824	16,0599	30,0551	54,5772	87,7747
	10	6,2001	9,3351	15,7837	29,8709	55,2831	87,7338
	11	6,5296	9,6845	16,2543	29,6152	54,7205	89,0944
	12	5,2017	9,9940	15,4768	31,2418	53,9225	87,6110
Średnia zdolność zmierzania rodnika DPPH* [%]		5,5427	9,5950	16,2843	30,3963	53,7533	88,6323
Równoważnik wit C [µg/ml]		0,68	0,98	1,49	2,55	4,32	6,95
Ocena statystyczna n=12 f=n-1=11 (2,201)	S	0,5390	0,6467	0,8351	0,5659	1,2081	0,6974
	S <sub>sr</sub>	0,1556	0,1867	0,2411	0,1634	0,3487	0,2013
	Wz%	9,7250	6,7400	5,1283	1,8618	2,2475	0,7868
	µ	5,5427± 0,3425	9,5950 ± 0,4109	16,2843 ± 0,5306	30,3963 ± 0,3596	53,7533 ± 0,7676	88,6323± 0,4431
	A <sub>sr</sub> ±2S	5,5427 ± 1,0781	9,5950 ± 1,2934	16,2843 ± 1,6702	30,3963 ± 1,1318	53,7533 ± 2,4162	88,6323± 1,3947
Wartość IC <sub>50</sub>		205,70 µg/ml					

### Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej wyciągu acetonowego z *Cladonia uncialis* metodą DPPH



Rycina 84. Aktywność antyoksydacyjna wyciągu acetonowego z *C. uncialis* ( $\pm$ S).

Tabela 57. Aktywność antyoksydacyjna wyciągu acetonowego z *C. uncialis* (metoda z DPPH) i stężenie polifenoli w próbce badanej

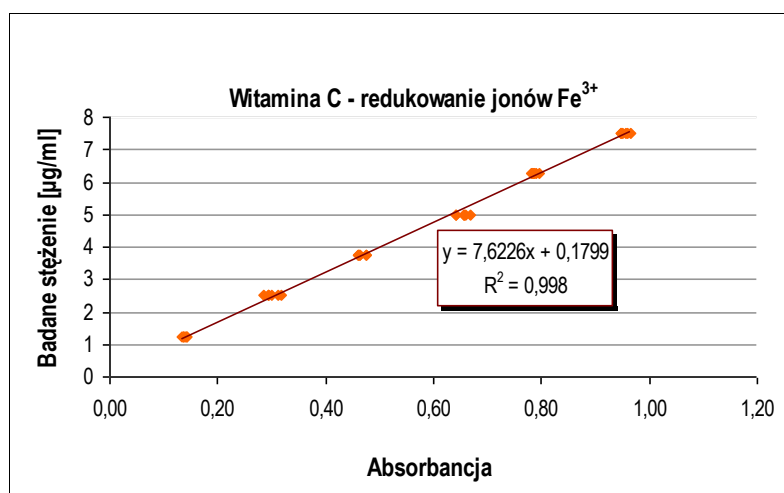
Stężenie w próbce badanej [µg/ml]		6,25	12,5	25	50	100	200
Polifenole [µg GA /ml]		0,44	0,88	1,76	3,52	7,04	14,07
Aktywność antyoksydacyjna zdolność zmiatania DPPH [%]	1	3,2196	2,6553	4,9782	4,5676	7,0502	10,7040
	2	3,2706	2,9322	4,7899	4,8155	7,5857	9,6855
	3	3,7499	2,4153	4,9688	5,3781	6,6093	10,2525
	4	3,3827	3,0245	4,8369	5,1778	6,8298	10,0110
	5	3,3623	2,4615	5,0159	6,1123	7,1027	9,8430
	6	3,8009	3,0338	4,7145	4,7773	7,3547	10,0635
	7	2,3230	3,1659	3,9314	6,2616	7,5857	9,1614
	8	2,3322	3,8698	3,9842	6,9282	6,6093	10,3049
	9	2,2953	2,4093	4,0545	6,8171	6,8298	9,6630
	10	2,7845	3,5442	2,6908	7,0763	7,1027	10,2247
	11	3,1261	2,4797	2,4797	6,7985	7,3547	8,7602
	12	2,3784	2,4621	3,6498	6,4190	7,0887	9,3219
Średnia zdolność zmiatania rodnika DPPH* [%]		3,0021	2,8711	4,1745	5,9274	7,0919	9,8330
Równoważnik wit C [µg/ml]		0,48	0,47	0,57	0,71	0,79	1,00
Ocena statystyczna n=12 f=n-1=11 (2,201)	S	0,5602	0,4812	0,8818	0,9308	0,3345	0,5485
	S <sub>sr</sub>	0,1617	0,1389	0,2545	0,2687	0,0966	0,1583
	Wz%	18,6613	16,7600	21,1224	15,7039	4,7172	5,5782
	µ	3,0021 ± 0,3425	2,8711 ± 0,3057	4,1745 ± 0,5603	5,9274 ± 0,5914	7,0919 ± 0,2126	9,8330 ± 0,3485
	A <sub>sr</sub> ±2S	3,0021 ± 1,0781	2,8711 ± 0,9624	4,1745 ± 1,7635	5,9274 ± 1,8617	7,0919 ± 0,6691	9,8330 ± 1,0970
Wartość IC <sub>50</sub>		>200 µg/ml					

### 5.7.2. Oznaczenie zdolności redukowania jonów żelaza $Fe^{3+}$ (FRAP)

Zdolność redukowania jonów żelaza przez wyciągi acetonowe otrzymane z porostów *H. physodes*, *H. scalaris*, *P. sulcata*, *C. uncialis* badano stosując mieszaninę reakcyjną FRAP. Wyniki przedstawiono jako równoważnik witaminy C ( $FRAP_{VCE}$ ;  $\mu\text{g/ml}$ ).

### Oznaczenie zdolności redukowania jonów żelaza przez witaminę C

Wyniki pomiaru absorbancji próbek zawierających określone stężenie witaminy C posłużyły do wykreślenia krzywej. Otrzymane wyniki wraz z oceną parametrów statystycznych i wartościami parametrów równania krzywej przedstawiono w tabeli 58 i na rycinie 85.



Rycina 85. Właściwości redukujące witaminy C (metoda z odczynnikiem FRAP).

Tabela 58. Właściwości redukujące witaminy C (metoda z odczynnikiem FRAP)

Stężenie witaminy C w próbce badanej [µg/ml]		1,25	2,5	3,75	5,00	6,25	7,50
Wartości absorbancji	1	0,1380	0,3179	0,4750	0,6564	0,7819	0,9504
	2	0,1416	0,2932	0,4597	0,6411	0,7856	0,9653
	3	0,1363	0,2840	0,4648	0,6676	0,7827	0,9577
	4	0,1421	0,2948	0,4646	0,6569	0,7972	0,9478
	5	0,1328	0,3013	0,4763	0,6582	0,7899	0,9480
	6	0,1409	0,3129	0,4599	0,6430	0,7876	0,9592
Absorbancja średnia		<b>0,1386</b>	<b>0,3007</b>	<b>0,4667</b>	<b>0,6539</b>	<b>0,7875</b>	<b>0,9547</b>
Ocena statystyczna n=6 f=n-1=5 (2,571)	S	0,0036	0,0128	0,0073	0,0100	0,0056	0,0071
	S <sub>sr</sub>	0,0015	0,0052	0,0030	0,0041	0,0023	0,0029
	Wz%	2,6176	4,2460	1,5578	1,5356	0,7135	0,7445
	µ	0,1386 ± 0,0038	0,3007 ± 0,0134	0,4667 ± 0,0076	0,6539 ± 0,0105	0,7875 ± 0,0059	0,9547 ± 0,0075
	A <sub>sr</sub> ±2S	0,1386 ± 0,0073	0,3007 ± 0,0255	0,4667 ± 0,0145	0,6539 ± 0,0201	0,7875 ± 0,0112	0,9547 ± 0,0142

**Oznaczenie zdolności redukowania jonów żelaza przez wyciągi acetonowe z *H. physodes*, *H. scalaris*, *P. sulcata*, *C. uncialis***

Oznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej metodą z odczynnikiem FRAP przeprowadzono dla stężenia 50 µg/ml (stężenie w próbie badanej). Otrzymane wyniki przedstawiono jako równoważnik witaminy C (FRAP<sub>VCE</sub> µg/ml). Nie udało się zbadać metodą FRAP potencjału antyoksydacyjnego wyciągu z *C. uncialis* (rozdział 6.6.1.).

**Tabela 59.** Właściwości redukujące wyciągów acetonowych z porostów (metoda z odczynnikiem FRAP)

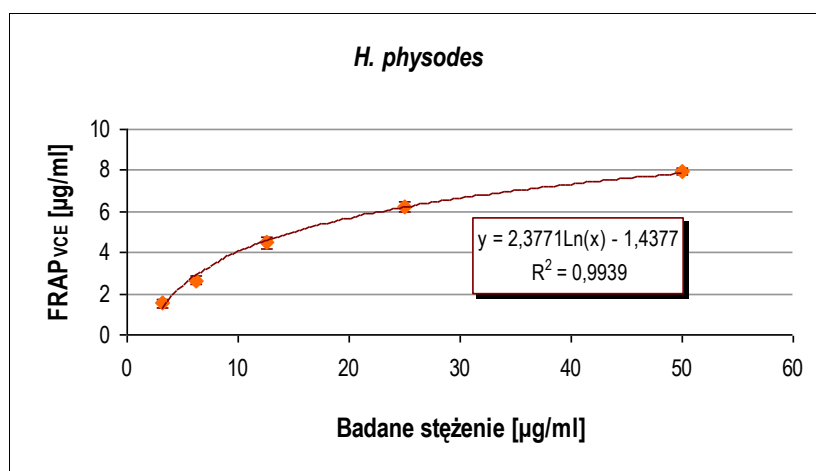
Wyciąg acetonowy stężenie w pr. badanej 50 µg/ml		<i>H. physodes</i>	<i>H. scalaris</i>	<i>P. sulcata</i>	<i>C. uncialis</i>
Zdolność redukowania jonów żelaza jako równoważnik wit C [µg/ml]	1	8,2576	1,4498	0,6685	n.o.
	2	7,9687	1,1396	0,7043	n.o.
	3	8,0876	1,1533	0,7066	n.o.
	4	8,2454	1,2364	0,6487	n.o.
	5	8,0114	1,1769	0,7760	n.o.
	6	7,9588	1,2196	0,6723	n.o.
	7	7,7507	1,1899	0,7020	n.o.
	8	7,9252	1,0588	0,7501	n.o.
	9	7,8200	1,1099	0,7386	n.o.
	10	7,8177	1,2333	0,8957	n.o.
	11	7,9214	1,0885	0,8957	n.o.
	12	7,8399	1,2615	0,7859	n.o.
Średnia zdolność redukowania Fe <sup>3+</sup>		<b>7,97</b>	<b>1,17</b>	<b>0,75</b>	n.o.
Ocena statystyczna n=12 f=n-1=11 (2,201)	S	0,1621	0,1139	0,0817	n.o.
	S <sub>śr</sub>	0,0468	0,0329	0,0236	n.o.
	Wz%	2,0351	9,7719	10,9649	n.o.
	µ	7,9670 ± 0,1030	1,1652 ± 0,0723	0,7454 ± 0,0519	n.o.
	A <sub>śr</sub> ±2S	7,9670 ± 0,3243	1,1652 ± 0,2277	0,7454 ± 0,1635	n.o.

n.o. – określono

## Oznaczenie zdolności redukowania jonów żelaza $Fe^{3+}$ przez wyciąg acetonowy *Hypogymnia physodes*

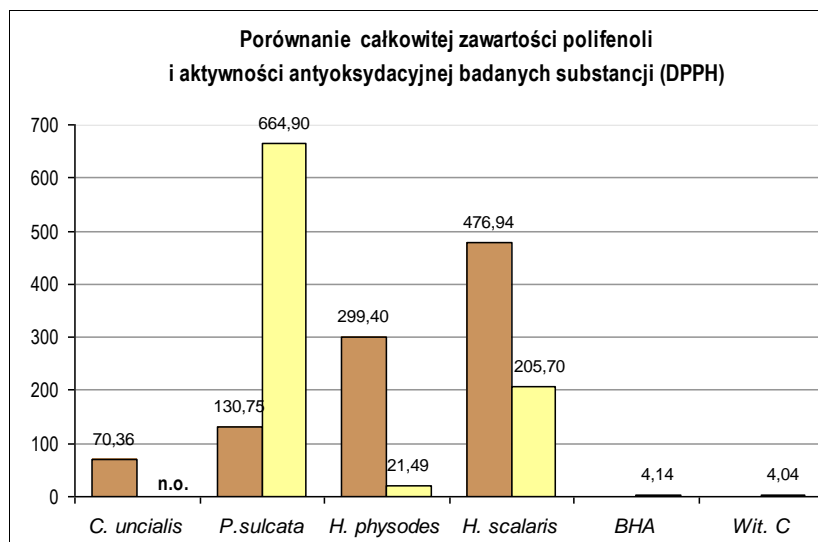
**Tabela 60.** Właściwości redukujące wyciągu acetonowego z *H. physodes* (metoda z odczynnikiem FRAP)

Stężenie w próbce badanej [ $\mu\text{g/ml}$ ]		3,125	6,25	12,50	25,00	50,00
Zdolność redukowania jonów żelaza jako równoważnik wit C [ $\mu\text{g/ml}$ ]	1	1,7189	2,7929	4,7756	6,4731	8,2576
	2	1,6877	2,8265	4,6094	6,3992	7,9687
	3	1,6823	2,8935	4,6879	6,3847	8,0876
	4	1,7166	2,7457	4,7085	6,4907	8,2454
	5	1,7098	2,8082	4,8190	6,4868	8,0114
	6	1,7052	2,8760	4,7946	6,4876	7,9588
	7	1,3248	2,4331	4,2610	6,0836	7,7507
	8	1,3751	2,4286	4,2336	5,8953	7,9252
	9	1,3980	2,4461	4,2549	6,0920	7,8200
	10	1,3172	2,4423	4,1833	5,8953	7,8177
	11	1,3241	2,4377	4,2275	6,0706	7,9214
	12	1,3553	2,4446	4,2084	5,9601	7,8399
Średnia zdolność redukowania $Fe^{3+}$		1,53	2,63	4,48	6,23	7,97
Ocena statystyczna $n=12$ $f=n-1=11$ (2,201)	S	0,1866	0,2045	0,2694	0,2476	0,1621
	$S_{\text{sr}}$	0,0539	0,0590	0,0778	0,0715	0,0468
	Wz%	12,2279	7,7715	6,0128	3,9769	2,0351
	$\mu$	1,5262 $\pm 0,1186$	2,6313 $\pm 0,1299$	4,4803 $\pm 0,1712$	6,2266 $\pm 0,1573$	7,9670 $\pm 0,1030$
	$A_{\text{sr}} \pm 2S$	1,5262 $\pm 0,3733$	2,6313 $\pm 0,4090$	4,4803 $\pm 0,5388$	6,2266 $\pm 0,4953$	7,9670 $\pm 0,3243$



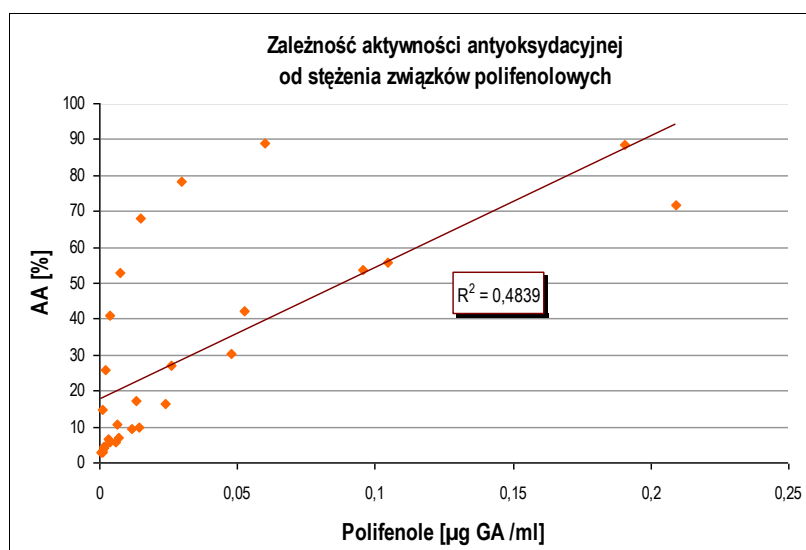
**Rycina 86.** Właściwości redukujące wyciągu acetonowego z *H. physodes* (FRAP) ( $\pm S$ ).

### 5.7.3. Zestawienie wyników badań aktywności antyoksydacyjnej i oznaczenia całkowitej zawartości polifenoli w analizowanych wyciągach



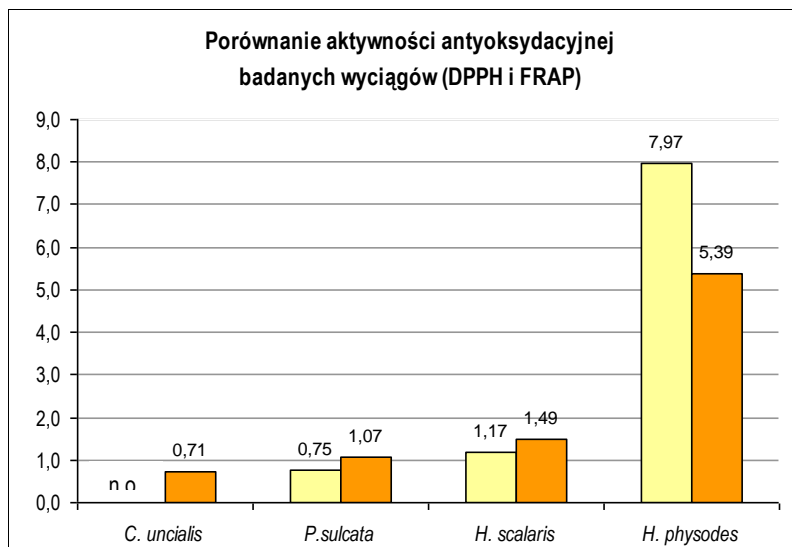
**Rycina 87a.** Zawartość związków polifenolowych (mg GAE/g wyciągu) w wyciągach acetonowych z badanych gatunków porostów oraz aktywność antyoksydacyjna wyciągów i substancji wzorcowych ( $IC_{50}$ ) (DPPH).

n.o. – nie określono

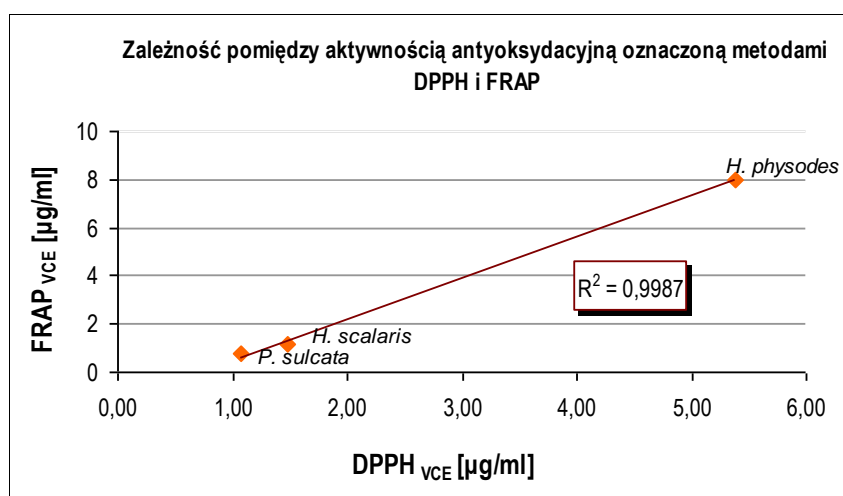


**Rycina 87b.** Zależność aktywności przeciwutleniającej (DPPH) wyciągów acetonowych z porostów: *H. physodes*, *P. sulcata*, *H. scalaris*, *C. uncialis* od stężenia związków polifenolowych w badanych próbach.





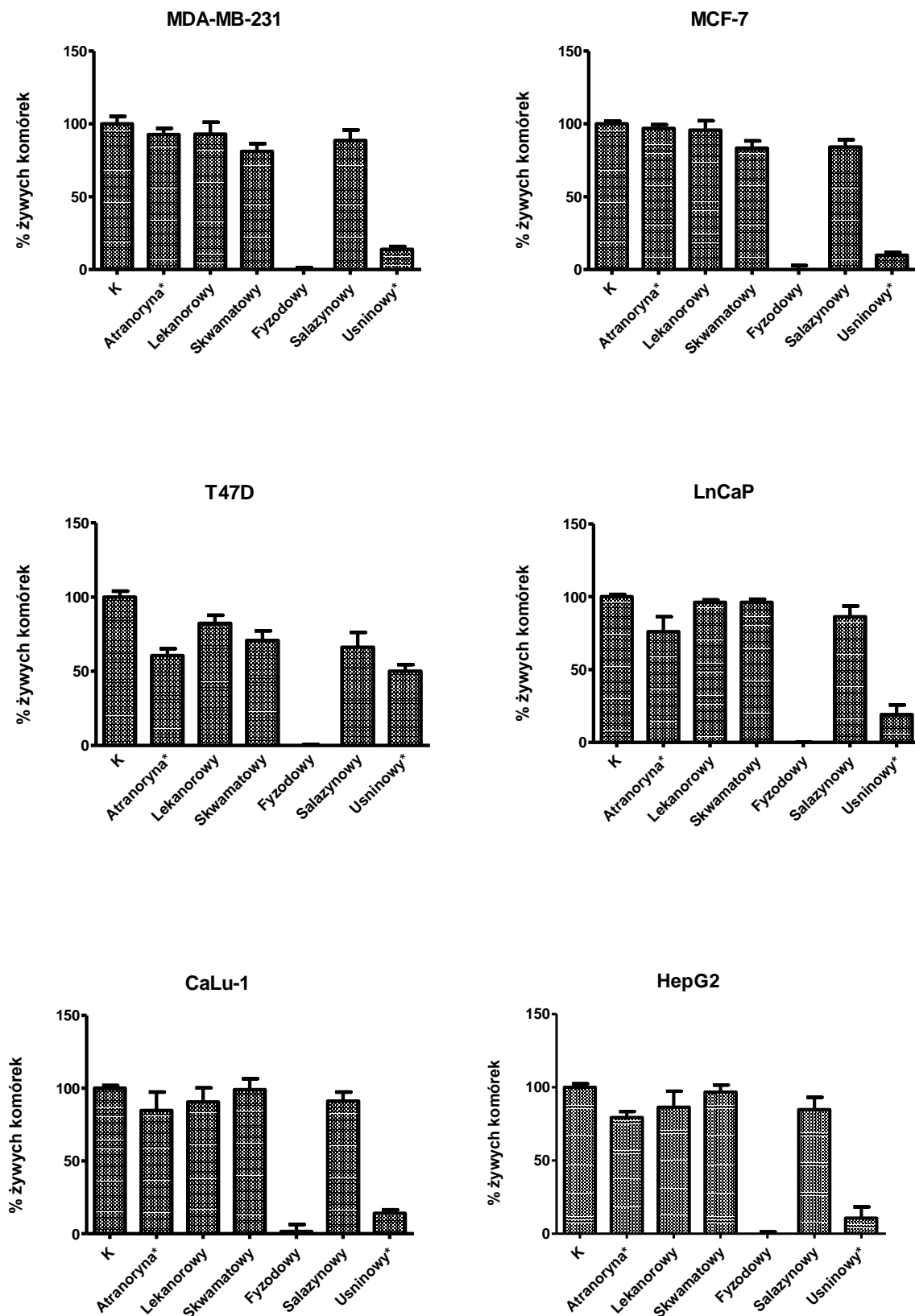
**Rycina 88.** Porównanie aktywności antyoksydacyjnej wyciągów acetonowych z: *C. uncialis*, *P. sulcata*, *H. scalaris* i *H. physodes* (50 µg/ml), badanej metodą DPPH i FRAP, wyrażonej jako równoważnik witaminy C (VCE) [µg/ml].  
n.o. – nie określono



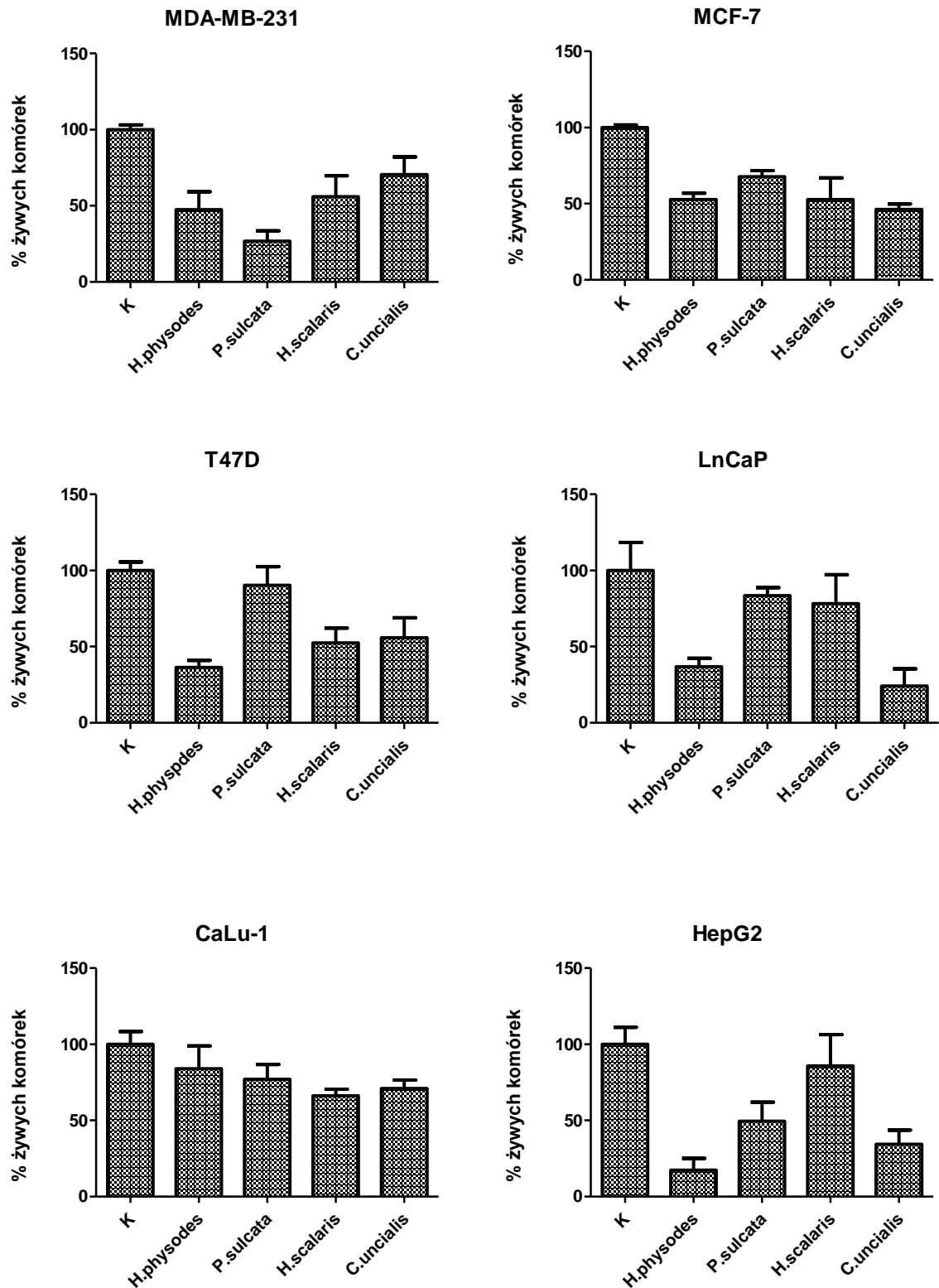
**Rycina 89.** Wykres zależności pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną (DPPH) i zdolnością redukowania jonów  $Fe^{3+}$  (FRAP) dla wyciągów acetonowych (50 µg/ml) z *H. physodes*, *P. sulcata*, *H. scalaris*, wyrażoną jako równoważnik witaminy C (VCE) [µg/ml].

## 5.8. Badania aktywności cytotoksycznej

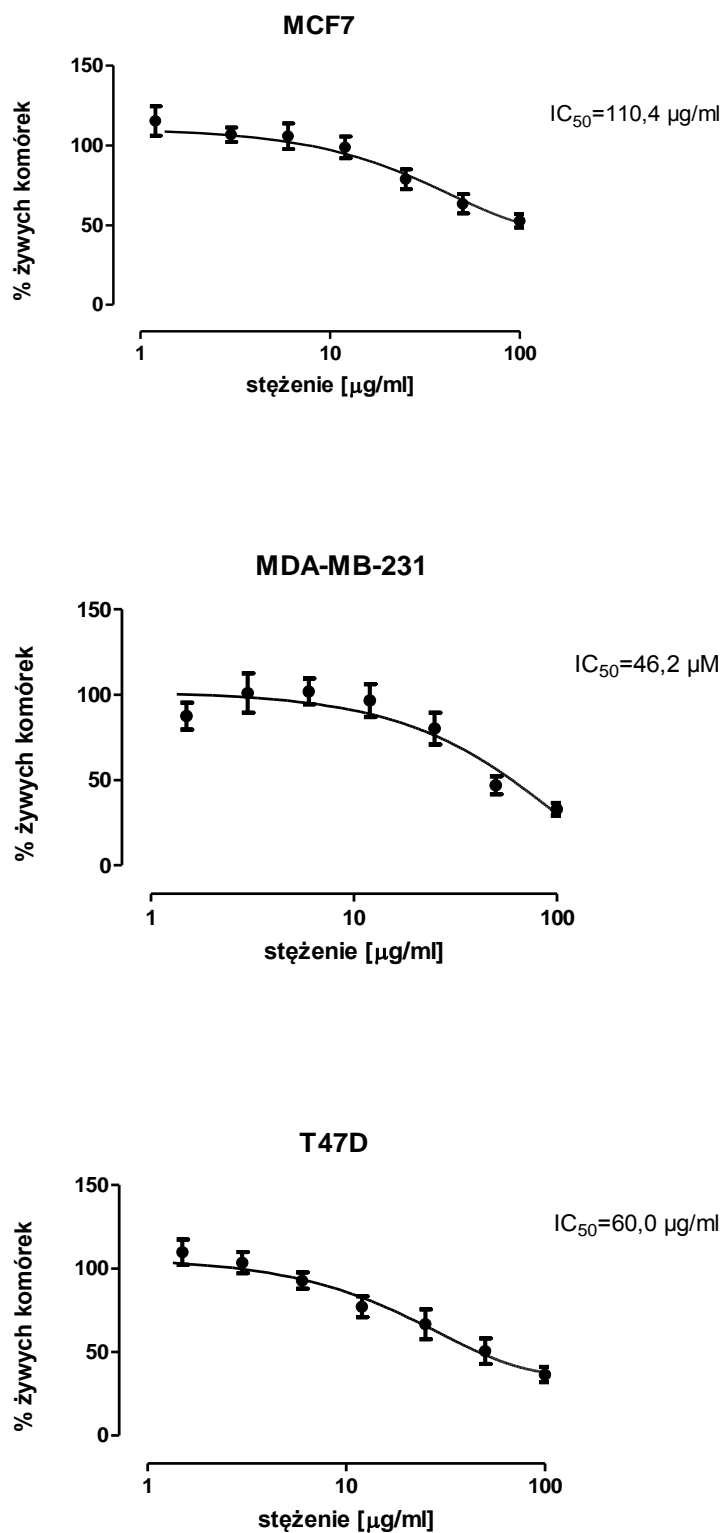
Wpływ związków i wyciągów otrzymanych z porostów na żywotność komórek wybranych linii nowotworowych: piersi (MDA-MB-231, T47D, MCF7), płuc (CaLu-1), wątroby (HepG2), prostaty (LnCaP) oraz nienowotworowej linii komórek nabłonka gruczołu piersiowego (MCF-10A) (tabela 11, rozdział 4.3.6.2.2.), oceniono za pomocą różnych testów (MTT, CV i NRU). Dla 3 badanych wyciągów acetonowych cytotoksyczność zbadano w stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$ , natomiast acetonowy ekstrakt z *H. physodes* badano również w niższych stężeniach. Kwas lekanorowy, kwas skwamatowy i kwas salazynowy badano w jednym stężeniu (100  $\mu\text{M}$ ), natomiast aktywność kwasu fyzodowego oraz kwasu (-)-usninowego analizowano także w niższych stężeniach. Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci tabel i wykresów (tabela 61-62, ryciny 90-95).



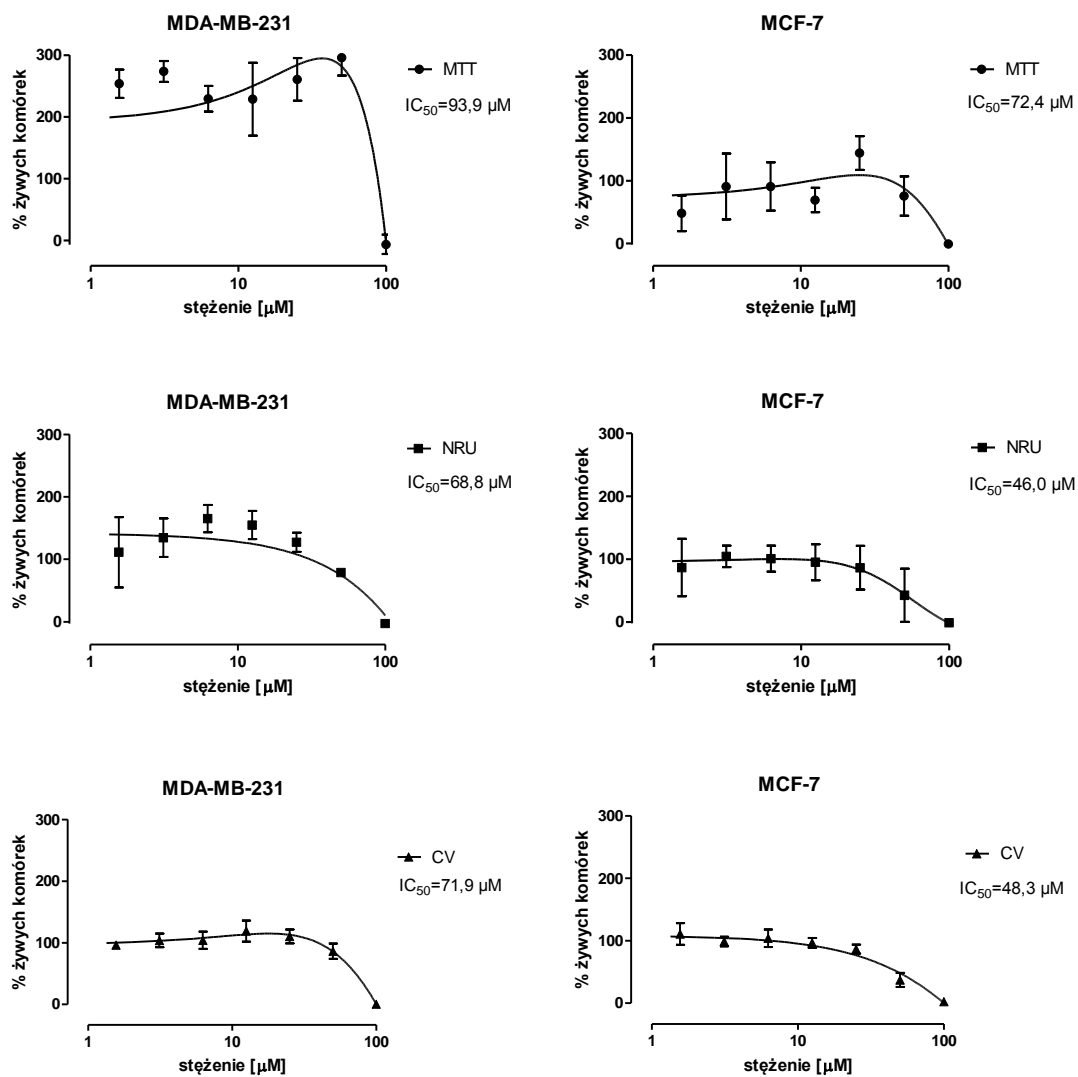
**Rycina 90.** Wpływ związków (100  $\mu$ M; \*25  $\mu$ M): \*atranoryny, kwasu lekanorowego, kwasu skwamatowego, kwasu fizodowego, kwasu salazynowego, \*kwasu (+)-usninowego, na przeżywalność komórek: MDA-MB-231, MCF-7, T47D, LnCaP, CaLu-1, HepG2 (72 godziny inkubacji, test MTT). Wyniki porównywano do próby kontrolnej ( $\pm$  S).



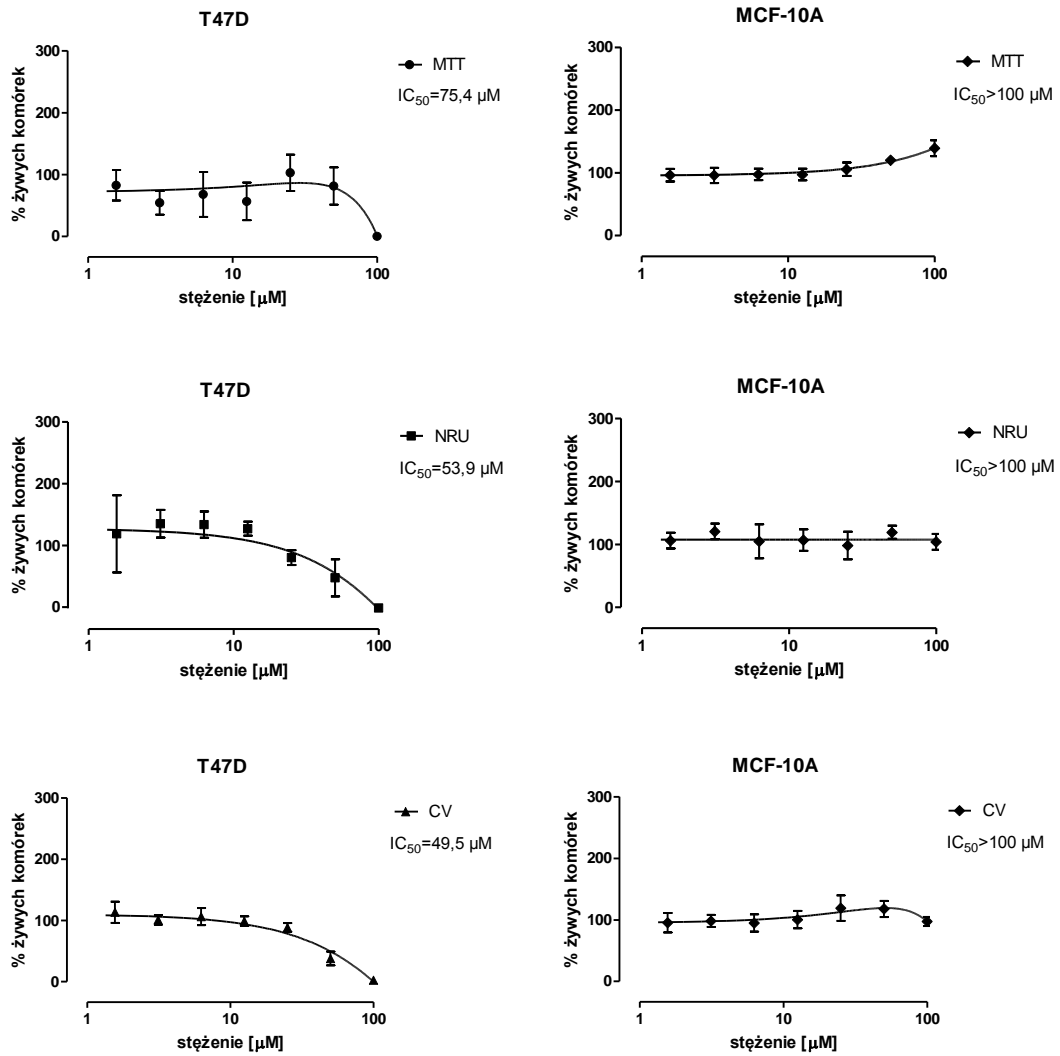
**Rycina 91.** Wpływ wyciągów acetonowych (100 µg/ml) z *H. physodes*, *P. sulcata*, *H. scalaris*, *C. uncialis* na przeżywalność komórek: MDA-MB-231, MCF-7, T47D, LnCaP, CaLu-1 (72 godziny inkubacji, test MTT). Wyniki porównywano do próby kontrolnej (± S).



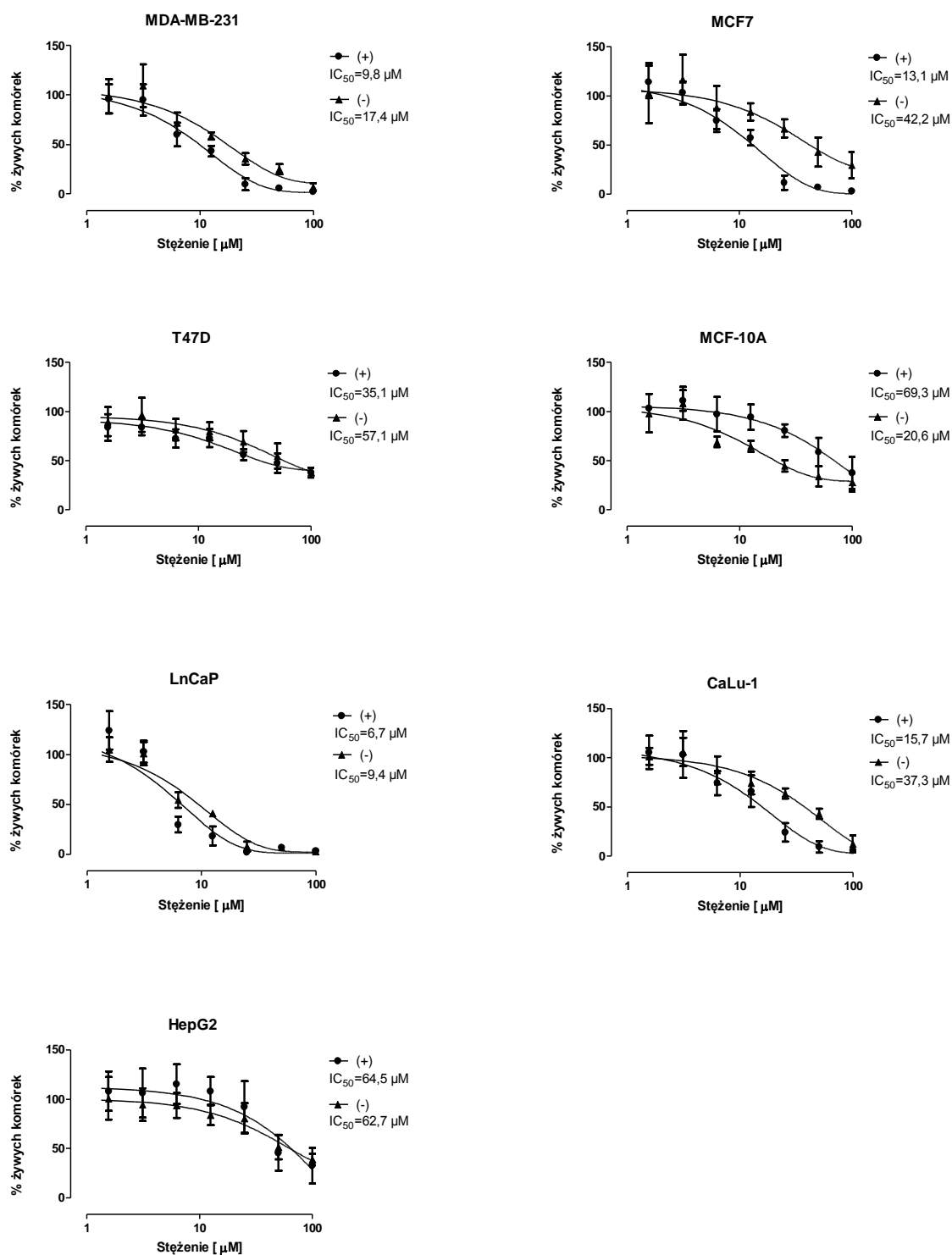
**Rycina 92.** Wpływ wyciągów acetonowych z *H. physodes* na przeżywalność komórek: MCF7, MDA-MB-231, T47D (72 godziny inkubacji, test MTT) ( $\pm$  S).



**Rycina 93.** Wpływ kwasu fizodowego na przeżywalność komórek: MDA-MB-231, MCF-7 (72 godziny inkubacji, test MTT, NRU, CV) ( $\pm S$ ).



**Rycina 94.** Wpływ kwasu fydowego na przeżywalność komórek: T47D, MCF-10A (72 godziny inkubacji, test MTT, NRU, CV) ( $\pm S$ ).



**Rycina 95.** Wpływ kwasów: (+)- usninowego i (-)-usninowego, na przeżywalność komórek: MDA-MB-231, MCF-7, T47D, MCF-10A, LnCaP, CaLu-1, HepG2 (72 godziny inkubacji, test MTT) ( $\pm$  S).



**Tabela 61.** Aktywność cytotoksyczna kwasu (+)- i (-)-usninowego (test MTT) oraz kwasu fizodowego (test MTT, NRU, CV), na komórki nowotworowe raka piersi i linię komórek nienowotworowych nabłonka gruczołu piersiowego ( $\pm$ S)

Linia komórkowa	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]				
	Kwas usninowy		Kwas fizodowy		
	(+)	(-)	MTT	NRU	CV
	MTT				
MDA-MB-231	9,8	17,4	93,3	68,8	71,9
MCF-7	13,1	42,2	72,4	46,0	48,3
T47D	35,1	57,1	75,4	53,9	49,5
MCF-10A	69,3	20,6	>100	>100	>100

**Tabela 62.** Aktywność cytotoksyczna kwasu (+)- i (-)-usninowego oraz wyciągu acetonowego z *C. uncialis* z uwzględnieniem zawartości kwasu (-)-usninowego w badanym wyciągu ( $\pm$ S)

Linia komórkowa	Kwas usninowy [100 $\mu$ M = 34,4 $\mu$ g/ml]		Wyciąg z <i>C. uncialis</i> [100 $\mu$ g/ml = 41,8 $\mu$ g/ml UA]
	(+)	(-)	% żywych komórek
	% żywych komórek		
MDA-MB-231	2,4 $\pm$ 1,1	6,9 $\pm$ 3,9	70,6 $\pm$ 11,5
MCF-7	3,1 $\pm$ 1,7	29,3 $\pm$ 13,6	46,2 $\pm$ 3,6
T47D	37,9 $\pm$ 5,0	38,1 $\pm$ 3,0	55,8 $\pm$ 13,1
MCF-10A	37,5 $\pm$ 16,4	27,9 $\pm$ 9,2	n.o.
LnCaP	3,4 $\pm$ 1,8	3,1 $\pm$ 1,5	24,2 $\pm$ 11,1
CaLu-1	5,8 $\pm$ 1,4	12,6 $\pm$ 8,7	71,1 $\pm$ 5,5
HepG2	32,6 $\pm$ 18,1	38,8 $\pm$ 5,7	34,3 $\pm$ 9,4

n.o. – nie określono; UA-kwas usninowy

### 5.9. Badania aktywności mikrobiologicznej

Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej obejmowało ocenę wpływu wyciągów otrzymanych z czterech badanych gatunków porostów na komórki wzorcowych szczepów: bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus*), Gram-ujemnych (*E. coli*), a także na komórki drożdżoidalnego grzyba (*C. albicans*). Ponadto przeprowadzono ocenę wpływu wyciągu acetonowego z *C. uncialis* na kliniczne, metycylinooporne szczepy *S. aureus* (MRSA). Stosowanymi substancjami odniesienia był: chloramfenikol (aktywność przeciwbakteryjna), amfoterycyna B (aktywność przeciwgrzybicza). Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 63.

**Tabela 63.** Minimalne stężenie hamujące (MIC) wyciągów z badanych porostów na szczepy wzorcowe drobnoustrojów

Badany gatunek	Rodzaj wyciągu	MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
		<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	<i>E. coli</i> PZH O26B6	<i>C. albicans</i> PCM 1409 PZH
<i>H. physodes</i>	heksan	500,0	1000,0	750,0
	eter dietylowy	100,0	750,0	1000,0
	aceton	250,0	1000,0	750,0
	metanol	500,0	> 1000	1000,0
<i>P. sulcata</i>	heksan	250,0	n.o.	n.o.
	eter dietylowy	250,0	1000,0	500,0
	aceton	500,0	n.o.	n.o.
	metanol	750,0	n.o.	n.o.
<i>H. scalaris</i>	aceton	1000,0	n.o.	n.o.
	metanol	750,0	n.o.	n.o.
<i>C. uncialis</i>	heptan	5,0	1000,0	750,0
	eter dietylowy	2,5	1000,0	750,0
	aceton	0,5	1000,0	750,0
	metanol	10,0	1000,0	250,0
<b>Kwas (-)-usninowy</b>		2,5	n.o.	n.o.
<b>Kwas skwamatowy</b>		1250,0	n.o.	n.o.
<b>Chloramfenikol</b>		5,0	100,0	n.o.
<b>Amfoterycyna B</b>		n.o.	n.o.	1,0

n.o. – nie określono

**Tabela 64.** Minimalne stężenie hamujące (MIC) wyciągu acetonowego z *C. uncialis* na metycylinooporne szczepy *Staphylococcus aureus*

<b><i>C. uncialis</i> (wyciąg acetonowy)</b>		
<b>Lp</b>	<b>Szczepy MRSA <i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>MIC [<math>\mu\text{g/ml}</math>]</b>
1	rana oparzeniowa	<b>5,0</b>
2	rana oparzeniowa	<b>7,5</b>
3	rana pourazowa	<b>5,0</b>
4	rana wewnątrzustrojowa	<b>7,5</b>
5	rana pourazowa	<b>5,0</b>
6	rana odleżynowa	<b>7,5</b>
7	rana oparzeniowa	<b>5,0</b>
8	rana oparzeniowa	<b>7,5</b>
9	wydzielina z drzewa oskrzelowego	<b>5,0</b>
10	wydzielina z drzewa oskrzelowego	<b>2,5</b>

***OMÓWIENIE***  
***I DYSKUSJA WYNIKÓW***

## 6. Omówienie i dyskusja wyników

Prowadzone badania obejmowały **izolację i identyfikację** związków o charakterze depsydów, depsydonów oraz pochodnej dibenzofuranu z wyciągów przygotowanych z plech czterech gatunków porostów rosnących w Polsce. Prace fitochemiczne prowadzono w celu pozyskania wyciągów i związków do badań aktywności biologicznej. W wyciągach acetonowych i metanolowych z badanych porostów określono **całkowitą zawartość polifenoli**, natomiast w wyciągach heptanowym, eteru dietylowego, acetonowym i metanolowym z *C. uncialis* oceniono **zawartość kwasu usninowego** metodą z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). W zakres prac wchodziła też ocena aktywności **przeciwutleniającej, cytotoksycznej i przeciwdrobnoustrojowej** wybranych wyciągów oraz niektórych wyizolowanych związków. Przebieg prowadzonych badań ilustruje rycina 11a i 11b (strona 87 i 88).

### 6.1. Ekstrakcja

W pierwszym etapie badań z zebranych ze stanu naturalnego plech porostów przygotowano wyciągi z zastosowaniem łaźni ultradźwiękowej (*H. physodes*, *P. sulcata*, *H. scalaris*, *C. uncialis*) lub aparatu Soxhleta (*C. uncialis*). Masa ekstrahowanego surowca była uzależniona możliwością zbioru ze stanu naturalnego i charakterem badań, do których przeznaczono przygotowywane wyciągi. Ograniczenie to dotyczyło szczególnie *H. scalaris*, gdyż plecha tego gatunku jest bardzo drobna i trudno ją pozyskać w większej ilości. Objętość rozpuszczalnika użyta do ekstrakcji była w przypadku każdego gatunku porostu uzależniona od objętości plechy i dobierana w ten sposób aby całkowicie przykrywała rozdrobniony surowiec. Spowodowało to różnice w zastosowanych objętościach ekstrahenta.

W zależności od późniejszego przeznaczenia wyciągów surowiec ekstrahowano kolejno rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności (wyciągi do badań fitochemicznych) lub stosowano ekstrakcję oddzielnych partii surowców rozpuszczalnikami o różnej polarności (wyciągi do badań aktywności biologicznej). W przypadku otrzymywania wyciągów do badań fitochemicznych stosowanie kolejno odczynników o wzrastającej polarności, pozwoliło na uzyskanie wyciągów różniących się ilością obecnych w nich związków, co ułatwiło izolację metabolitów wtórnych. Ekstrakty do badań aktywności biologicznej, z uwagi na ekstrahowanie surowca jednym

rozpuszczalnikiem, charakteryzowała większa różnorodność związków czynnych. Rozpuszczalniki do ekstrakcji danego gatunku wybrano na podstawie przeprowadzonych prac wstępnych. W celu zwiększenia wydajności prowadzonych ekstrakcji warunki w jakich otrzymywano wyciągi do badań różniły się w zależności od gatunku porostu. Zastosowanie ultradźwięków pozwoliło skrócić czas otrzymywania wyciągów i obniżyć stosowaną temperaturę ekstrakcji, co jest korzystne, gdyż zmniejsza ryzyko zmian w strukturze lub rozpadu znajdujących się w wyciągu związków. Ekstrakcja w aparacie Soxhleta, zastosowana dla *C. uncialis*, nieznacznie zwiększyła wydajność procesu (tabela 13). Jednak konieczność stosowania wyższych temperatur (temp. wrzenia danego rozpuszczalnika: heptan 98°C, aceton 56°C, metanol 65°C) i dłuższego czasu ekstrakcji wpłynęła na skręcalność optyczną obecnego w surowcu kwasu (-)-usninowego (tabela 40, rozdział 5.4.6.).

Z danych piśmiennictwa wynika, że plechy niektórych gatunków porostów mogą zawierać duże ilości metabolitów wtórnych. Opisano, że ich zawartość może sięgać nawet ponad 20% s.m. plechy [Bystrek 1997]. W prowadzonych pracach stopień ekstrakcji związków z badanych gatunków porostów był zróżnicowany. Dla ekstrakcji wykonanej kolejno odczynnikami o wzrastającej polarności wydajność wynosiła 1,68 – 18,86% (*C. uncialis*, *H. scalaris*, odpowiednio; tabela 13), natomiast w przypadku ekstrakcji wyłącznie jednym odczynnikiem wahała się od 0,4% dla rozpuszczalników o bardzo dużej lipofilności (heksan - *H. physodes*), do nawet 28% w przypadku ekstrahentów bardziej polarnych (metanol - *H. scalaris*) (tabela 14). Analiza całkowitej wydajności ekstrakcji prowadzonych jednym rozpuszczalnikiem za pomocą ultradźwięków (tabela 14), pozwala wnioskować, że najwyższa była zawartość związków w *H. scalaris*, średnia w *H. physodes* > *P. sulcata* i najniższa w *C. uncialis*.

## 6.2. Analiza jakościowa

Uzyskane z porostów wyciągi i związki poddawano analizie jakościowej z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Z uwagi na zdolność pochłaniania promieniowania UV w zakresie długości fali  $\lambda$  200-400 nm przez opisywane w pracy depsydy i depsydony do badań wykorzystano płytki żelowe ze znacznikiem fluorescencji F<sub>254</sub>. Używane do TLC fazy ruchome charakteryzowała mała, bądź średnia polarność (rozdział 4.3.2.1.), co wynikało z charakteru chemicznego związków obecnych w wyciągach. W badaniach użyto faz rozwijających zwykle stosowanych w analityce porostów (rozdział 4.3.2.), za wyjątkiem faz oznaczonej jako

F<sub>2</sub> (toluen-octan etylu-kwas octowy lodowaty 60:30:5) oraz F<sub>5</sub> (eter dietylowy-kwas octowy lodowaty 100:1) zastosowanych do izolacji lub badań ilościowych. Obie fazy nie zostały dotąd opisane w literaturze, gdyż dobrano je eksperymentalnie na potrzeby niniejszej pracy. W przypadku wyciągów otrzymanych metodą ekstrakcji rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności, skład jakościowy różnił się w zależności od zastosowanego odczynnika. Wyciągi mniej polarne (heptanowe, heksanowe) zawierały niewielką liczbę metabolitów wtórnych, jednak ich procentowy udział w ekstrakcie był znaczący. W wyciągu heksanowym z *H. physodes* i *P. sulcata* występowała mieszanina dwóch związków (atranoryny i chloroatranoryny), wyciąg heptanowy z *C. uncialis* obfitował w kwas usninowy. Stwierdzono również, że w przypadku ekstrakcji jednym typem odczynnika (zastosowanej w celu pozyskania wyciągów do badań aktywności biologicznej), wyciągi acetonowe i metanolowe otrzymane z badanych gatunków porostów mają bardziej zróżnicowany skład od pozostałych. Typ faz rozwijających, jak i wartości  $R_f$ , charakteryzujące zaobserwowane na płytce związku sugeruje, że większość obecnych w badanych wyciągach substancji posiada stosunkowo niską polarność (również w wyciągach acetonowych czy metanolowych) (ryciny 16-19), rozdział 5.2.).

### 6.3. Izolacja związków

Z analizowanych gatunków porostów stosując własną metodykę otrzymano znane metabolity wtórne, których obecność w badanych porostach była już wcześniej opisywana. W izolacji związków wykorzystano technikę preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (kwas lekanorowy, kwas fizodalowy) oraz kolumnowej (kwas fizodowy), natomiast niektóre ze związków otrzymano z wyciągu przez krystalizację (kwas lekanorowy, kwas usninowy, kwas salazynowy, kwas skwamatowy, mieszanina atranoryny i chloroatranoryny). Metodyka izolacji związków techniką PTLC i CC (kwas fizodalowy, kwas lekanorowy i kwas fizodowy), została ustalona doświadczalnie podczas realizacji niniejszej pracy doktorskiej i nie była do tej pory nigdzie opisywana. Dla otrzymywania kwasu salazynowego zastosowano prostą metodę krystalizacji, zaczerpniętą z pracy Ingólfssdóttir i wsp. (1998), którą zmodyfikowano przez odpowiednie oczyszczenie wyciągu. Sposób oczyszczania ekstraktu opracowano w trakcie prowadzenia badań i jest prezentowany po raz pierwszy. Metoda otrzymywania kwasu lekanorowego z *H. scalaris* przez krystalizację frakcji eterowej uzyskanej z wyciągu acetonowego nie była do tej pory nigdzie przedstawiana.

W przypadku kwasu lekanorowego, krystalizacja była szybszym i bardziej wydajnym sposobem otrzymania depsydu, w porównaniu z zastosowaną wcześniej chromatografią preparatywną (obliczona wydajność obu metod wynosiła 46,1% i 18,7% - odpowiednio). Kwas usninowy uzyskano z wyciągów heptanowych *C. uncialis*, metodą krystalizacji. Wyciągi heptanowe sporządzono za pomocą różnych typów ekstrakcji (ultradźwięki i aparat Soxhleta). Okazało się, że wyciąg otrzymany metodą z zastosowaniem ultradźwięków zawierał kwas (-)-usninowy, natomiast uzyskany przez ekstrakcję w aparacie Soxhleta zawierał mieszaninę racemiczną obu izomerów optycznych kwasu usninowego (rozdział 6.4.). Do przeprowadzanych w ramach pracy doktorskiej badań biologicznych posłużył czysty kwas (-)-usninowy. Zastosowana w pracy metoda izolacji kwasu skwamatowego nie była do tej pory nigdzie opisywana. Warto podkreślić, że w wyniku prowadzonych prac udało się uzyskać stosunkowo duże ilości związków (tabela 65), co umożliwiło poddanie ich wybranym badaniom aktywności biologicznej w warunkach *in vitro*.

**Tabela 65.** Masy otrzymanych związków z badanych gatunków porostów

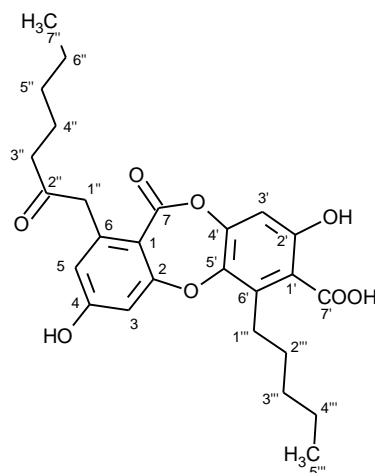
Związek	Kwas fyzodowy	Kwas fyzodalowy	Kwas salzynowy	Kwas lekanorowy	Kwas usninowy	Kwas skwamatowy	Atranoryna i chloroatranoryna
Masa [mg]	15,0	6,0	25,6	32,2	284,9	207,5	35,0

#### 6.4. Identyfikacja związków

W celu zidentyfikowania związków otrzymanych w wyniku prac izolacyjnych przeprowadzono analizy z wykorzystaniem: chromatografii cienkowarstwowej (TLC), metod spektroskopowych (NMR  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$ , UV), spektrometrycznych (MS) oraz polarymetrycznej w przypadku oznaczenia typu enancjomeru kwasu usninowego. Uzyskane rezultaty porównywano z wartościami literaturowymi, co ułatwiło interpretację otrzymanych wyników. Spójność danych otrzymanych w toku prowadzonych badań i literaturowych, potwierdziła tożsamość związków i ich duży stopień czystości.



### 6.4.1. Związek Hp\_1 (kwas fizodowy)



#### Analiza $^1\text{H NMR}$ i $^{13}\text{C NMR}$

W widmie  $^1\text{H NMR}$  (tabela 22, ryciny 23-26) zarejestrowano sygnały w postaci dubletów przy  $\delta$  6,77 i 6,68 (2xH, d, H-3, H-5) oraz  $\delta$  6,67 (H, s, H-3'), które świadczą o obecności w cząsteczce 3 aromatycznych atomów wodoru. Wartości stałych sprzężenia obliczone dla H-3 ( $J = 2,36$  Hz) i H-5 ( $J = 2,04$  Hz) wskazują na ich usytuowanie w cząsteczce w pozycji *meta*. Multiplet w zakresie wartości przesunięć chemicznych  $\delta$  1,37-1,68 (6x2H, m,  $-\text{CH}_2-$  4''-6'' i  $-\text{CH}_2-$  2'''-4'''), dowodzi obecności sześciu grup metylenowych w dwóch łańcuchach alifatycznych cząsteczki. Obecność dwóch grup metylowych potwierdzają dwa sygnały o charakterze tripletów przy  $\delta$  0,88 (3H, t,  $\text{CH}_3$ -7'',  $J = 6,98$  Hz) i 0,93 (3H, t,  $\text{CH}_3$ -5''',  $J = 7,22$  Hz). Wartości przesunięć chemicznych przy  $\delta$  4,03 (2H, s,  $-\text{CH}_2-$  1''), 3,24 (2H, bs,  $-\text{CH}_2-$  1''') i 2,52 (2H, t,  $-\text{CH}_2-$  3'',  $J = 7,36$  Hz) odpowiadają protonom grup metylenowych przyłączonych w pozycji 6 i 6' przy pierścieniu aromatycznym oraz protonom w grupie  $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ , odpowiednio.

Przeprowadzona analiza  $^{13}\text{C NMR}$  (tabela 23, rycina 27-31) potwierdza, że związek Hp\_1 jest tożsamy z kwasem fizodowym. Zarejestrowane widmo przedstawia 13 sygnałów pochodzących od atomów węgla tworzących szkielet badanego depsydonu. Wartości przesunięć chemicznych dla atomów węgla od C-1 do C-6 to:  $\delta$  114,07, 163,40, 106,51, 162,64, 117,81, 139,41 oraz C-1' do C-6':  $\delta$  111,28, 160,92, 107,76, 149,82, 142,91, 142,75, odpowiednio). Sygnał wskazujący na istnienie grupy estrowej występuje przy  $\delta$  163,05 (C-7). Atomy węgla przyłączonych do pierścieni aromatycznych dają sygnały przy  $\delta$  48,06, 42,84, 23,97, 31,75, 23,10, 14,20 (C-1'' i C-3'' do C-7'') oraz  $\delta$  33,01, 32,02, 28,65, 23,05, 14,31 (C-1''' do C-5'''). Grupa ketonowa jest widoczna jako pik przy  $\delta$  206,21 (C-2''), natomiast karboksylową grupę

występującą przy pierścieniu aromatycznym opisuje przesunięcie chemiczne  $\delta$  172,36 (C-7').

Wykonane widmo korelacyjne **HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMR** (tabela 23, ryciny 30-31), potwierdziło właściwe przyporządkowanie sygnałów w widmie protonowym odpowiednim atomom węgla.

#### Analiza spektralna w nadfiolecie

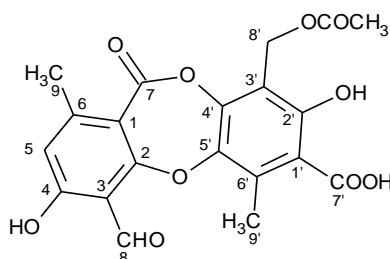
W widmie UV obserwowano trzy maksima absorpcji przy długościach fali  $\lambda_1 = 209$  nm,  $\lambda_2 = 266$  nm i  $\lambda_3 = 314$  nm. Widmo wykreślono w metanolu (rycina 32).

#### Analiza metodą spektrometrii masowej

W widmie masowym (ESI-MS) związku Hp\_1 (tabela 24, rycina 33) w trybie jonów dodatnich zaobserwowano sygnał protonowanej cząsteczki  $[\text{M}+\text{H}]^+$  przy  $m/z$  471,1974. Wyniki analizy pozwalają przypisać badanej cząsteczce masę 470, co odpowiada obliczonej masie kwasu fyzodowego (470,5116).

Rezultaty analiz są zgodne z opisywanymi dla kwasu fyzodowego [Huneck i Yoshimura 1999], stąd związek Hp\_1 zidentyfikowano jako **kwas fyzodowy**.

#### 6.4.2. Związek Hp\_2 (kwas fyzodalowy)



#### Analiza $^1\text{H}$ NMR, $^{13}\text{C}$ NMR

W zarejestrowanym widmie  $^1\text{H}$  NMR związku Hp\_2 (tabela 25, rycina 34) singlet przy  $\delta$  6,81 (H, s, H-5) świadczy o obecności aromatycznego atomu wodoru w cząsteczce. Obecność grup metylowych w związku potwierdzają sygnały  $\delta$  2,44 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -9) i 2,64 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -9') a także 1,96 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{OCO}$ -8'). Grupa metylenowa generuje sygnał przy  $\delta$  5,07 (2H, s,  $-\text{CH}_2$ -8'). Proton grupy aldehydowej daje sygnał przy  $\delta$  10,61.

W widmie  $^{13}\text{C}$  NMR związku Hp\_2 (tabela 26, rycina 35), zarejestrowano sygnały o wartościach przesunięć chemicznych wskazujących na obecność ugrupowań aromatycznych. Są one widoczne w cząsteczce w postaci pików o wartościach

przesunięć chemicznych:  $\delta$  111,55, 163,71, 111,55, 163,37, 116,73, 152,05 (od C-1 do C-6) oraz  $\delta$  115,30, 161,77, 112,67, 144,44, 139,42, 133,58 (od C-1' do C-6'). Sygnał od węgla z grupy estrowej łączącego pierścienie aromatyczne został zarejestrowany przy  $\delta$  164,93. Obecność podstawników metylowych w pierścieniu arylowym została odnotowana w postaci sygnałów przy  $\delta$  21,27 i 14,14 (C-9 i C-9'), a także przy  $\delta$  20,70 od CH<sub>3</sub> grupy CH<sub>3</sub>OCO-8'. Węgiel grupy aldehydowej (C-8) generuje sygnał przy  $\delta$  192,23 natomiast grupy karboksylowej (C-7') przy 170,40. Sygnał od grupy metylenowej -CH<sub>2</sub>- występuje przy  $\delta$  56,22.

Wykonane widmo **HSQC** <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C NMR (tabela 26, rycina 36), umożliwiło częściowe przyporządkowanie sygnałów w widmie protonowym odpowiednim atomom węgla. Korelację tę wykazano dla sygnałów pochodzących od H-5 ( $\delta$  6,81), CH<sub>3</sub>-9 ( $\delta$  2,44), -CH<sub>2</sub>-8' ( $\delta$  5,07), CH<sub>3</sub>-9' ( $\delta$  2,64) oraz CH<sub>3</sub>OCO-8' ( $\delta$  1,96).

#### Analiza spektralna w nadfiolecie

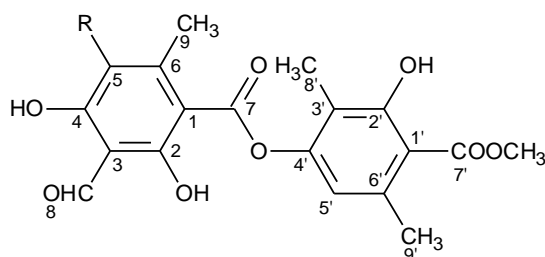
W widmie UV obserwowano trzy maksima absorpcji przy długościach fali  $\lambda_1 = 210$  nm,  $\lambda_2 = 239$  nm i  $\lambda_3 = 314$  nm. Widmo wykreślono w metanolu (rycina 37).

#### Analiza metodą spektrometrii masowej

W widmie masowym (ESI-MS) związku Hp\_2 (tabela 27, rycina 38) w trybie jonów dodatnich zaobserwowano sygnał adduktu jonu molekularnego z sodem [M+Na]<sup>+</sup> przy  $m/z$  439,0615. Na podstawie wyników analizy można wnioskować, że masa związku jest równa 416, co odpowiada obliczonej masie teoretycznej dla kwasu fyzodalowego (416,33504).

Wyniki wykonanych badań i dane literaturowe [Huneck i Yoshimura 1999], pozwoliły stwierdzić, że badany związek to **kwas fyzodalowy**.

#### 6.4.3. Związki Hp\_3 + Hp\_4 (mieszania atranoryny i chloroatranoryny)



R = H: atranoryna

R = Cl: chloroatranoryna

### Analiza $^1\text{H}$ NMR, $^{13}\text{C}$ NMR

W widmie  $^1\text{H}$  NMR (tabela 28, rycina 39) diarylową strukturę związków udowodniła obecność sygnałów o wartościach  $\delta$  6,40 (H, s, H-5) oraz 6,52 (2xH, s,  $\text{H}_{\text{atr.}-5'}$ ,  $\text{H}_{\text{chatr.}-5'}$ ), których obecność wskazuje na istnienie w cząsteczce protonów aromatycznych. W otrzymanym widmie zarejestrowano sygnały pochodzące od grup metylowych:  $\delta$  2,09 (2x3H, s,  $\text{CH}_{3\text{atr.}-8'}$ ,  $\text{CH}_{3\text{chatr.}-9}$ ), 2,55 (3H, s,  $\text{CH}_{3\text{chatr.}-8'}$ ), 2,69 (2x3H, s,  $\text{CH}_{3\text{atr.}-9}$ ,  $\text{CH}_{3\text{atr.}-9'}$ ) i 2,87 (3H, s,  $\text{CH}_3$   $\text{chatr.}-9'$ ). Sygnał świadczący o istnieniu ugrupowania estrowego  $\text{CH}_3\text{COO}-$  w obu cząsteczkach występował przy wartości  $\delta$  3,99 (2x3H, s,  $\text{CH}_3\text{COO}-7'$ ). Grupy aldehydowe dawały sygnały występujące przy wartości  $\delta$  10,36 i 10,38 (2xH, s, CHO-8), natomiast obecność grup hydroksylowych przy pierścieniach aromatycznych zarejestrowano przy  $\delta$  11,94, 12,33, 12,50 (3xH, s, OH-2', OH-2, OH-4) i 11,96, 12,33, 12,55 (OH-2', OH-2, OH-4) dla atranoryny i chloroatranoryny, odpowiednio. Analiza wysokości pików widma sugeruje, że w badanej mieszaninie jest wyższa zawartość atranoryny (około 75%) niż chloroatranoryny (około 25%).

Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR mieszaniny związków Hp\_3+Hp\_4 (tabelka 29, rycina 40) przedstawia sygnały pochodzące od atomów węgla tworzących cząsteczki atranoryny i chloroatranoryny. Sygnały węgla aromatycznych atranoryny posiadają następujące wartości przesunięć chemicznych od C-1 do C-6:  $\delta$  102,83, 169,08, 108,54, 167,48, 112,84, 152,42 oraz C-1' do C-6':  $\delta$  110,25, 162,87, 116,71, 151,97, 116,00 i 139,86. Obecne w atranorynie 3 grupy metylowe generują sygnały o wartości przesunięć:  $\delta$  24,01 (C-9'), 25,57 (C-9) i 9,35 (C-8'). Ugrupowania estrowe (C-7 i C-7') zostały zarejestrowane przy  $\delta$  169,69 i 172,15, odpowiednio. Grupa metylowa podstawnika  $\text{CH}_3\text{OOC}-$  generuje sygnał przy  $\delta$  52,33. W widmie zarejestrowano również sygnały pochodzące od atomów węgla budujących chloroatranorynę. Atomy węgla aromatycznych od C-1 do C-6, posiadają wartości przesunięć  $\delta$  104,31, 166,24, 108,65, 163,39, 115,78, 149,02 natomiast od C-1' do C-6'  $\delta$  110,40, 162,89, 116,77, 151,86, 115,78, 139,98. Grupy metylowe generują sygnały o wartości przesunięć chemicznych:  $\delta$  21,14 (C-9), 29,69 (C-9'), 9,40 (C-8'). Węgłe C-7 i C-7' dają sygnały  $\delta$  169,20 i 172,19. Grupa metylowa ugrupowania  $\text{CH}_3\text{OOC}-$  generuje sygnał przy  $\delta$  52,36.

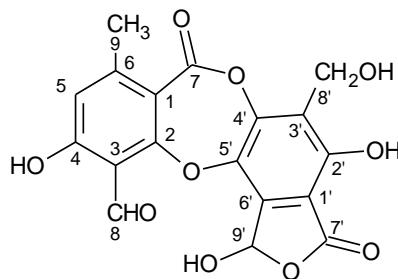
### Analiza metodą spektrometrii masowej

W widmie masowym (ESI-MS) związku Hp\_3+Hp\_4 (tabela 30, rycina 41) w trybie jonów ujemnych zaobserwowano sygnały deprotonowanych cząsteczek badanej mieszaniny  $[\text{M}-\text{H}]^-$  przy  $m/z$  407 oraz przy  $m/z$  373 oraz sygnały ich adduktów

z sodem przy  $m/z$  431 i  $m/z$  397. Na podstawie wyników analizy można określić masę atranoryny i chloroatranoryny (Hp\_4 i Hp\_3) jako 408 i 374, odpowiednio, co odpowiada obliczonej masie teoretycznej obu związków (408,78648 dla  $C_{19}H_{17}ClO_8$  i 374,34142 dla  $C_{19}H_{18}O_8$ ).

Na podstawie otrzymanych danych doświadczalnych oraz danych piśmiennictwa [Huneck i Yshimura 1999, Carvalho i wsp. 2000, Rubio i wsp. 2005, Vila i wsp. 2011] mieszaninę związków otrzymanych z wyciągu heksanowego *H. physodes*, zidentyfikowano jako mieszaninę atranoryny i chloroatranoryny.

#### 6.4.4. Związek Ps\_1 (kwas salazynowy)



#### Analiza $^1H$ NMR, $^{13}C$ NMR

Widmo  $^1H$  NMR (tabela 31, rycina 42) prezentuje sygnały protonów pierścienia aromatycznego obecne przy  $\delta$  6,80 (1H, s, H-5) i 6,94 (1H, s, H-9'). Obecność grupy metylowej potwierdza singlet występujący przy  $\delta$  2,49 (3H, s,  $CH_3$ -9). Grupy hydroksylowe OH-4, OH-2' i OH-9' generują sygnały usytuowane przy  $\delta$  12,25 (1H, s, OH-4),  $\delta$  9,50 (1H, s, OH-2') oraz 7,97 (1H, s, OH-9'). Atom wodoru grupy aldehydowej jest widoczny jako singlet przy  $\delta$  10,61 (1H, s, CHO-8). Grupa metylenowa daje sygnał przy 4,90 (2H, s,  $-CH_2$ -8').

Widmo węglowe  $^{13}C$  NMR związku Ps\_1 (tabela 32, ryciny 43-45) zawiera sygnały pochodzące od 18 atomów węgla, obecnych w cząsteczce kwasu salazynowego. Piki pochodzące od atomów węgla tworzących układ aromatyczny posiadają przesunięcia chemiczne o wartościach odpowiednio (od C-1 do C-6):  $\delta$  113,06, 164,94, 111,12, 165,85, 118,23, 153,96 oraz (C-1' do C-6')  $\delta$  110,25, 154,06, 123,11, 149,17, 138,92, 138,19. Podstawnik metylowy (C-9) daje sygnał  $\delta$  21,99, o obecności grupy aldehydowej świadczy pik przy  $\delta$  194,67 (C-8) a grupa estrowa (C-7) zaznacza się sygnałem przy  $\delta$  160,76. Podstawnik  $-CH_2-$  przy pierścieniu

aromatycznym generuje sygnał przy  $\delta$  55,22 (C-8'). Atom węgla grupy ketonowej uwidacznia się przy  $\delta$  167,40 (C-7') natomiast atom węgla C-9' przy  $\delta$  96,32.

Wykonane widmo heterokorelacyjne **HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMR** (tabela 32, rycina 46), pozwoliło przyporządkować sygnały H-5 ( $\delta$  6,80), CH<sub>3</sub>-9 ( $\delta$  2,49), -CH<sub>2</sub>- 8' ( $\delta$  4,90) i H-9' ( $\delta$  6,94) sygnałom odpowiednich węgli.

#### **Analiza spektralna w nadfiolecie**

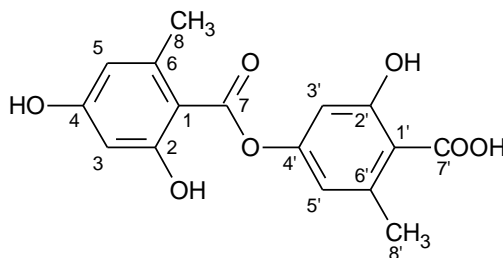
W widmie UV obserwowano trzy maksima absorpcji przy długościach fali  $\lambda_1 = 212$  nm,  $\lambda_2 = 237$  nm i  $\lambda_3 = 311$  nm. Widmo wykreślono w metanolu (rycina 47).

#### **Analiza metodą spektrometrii masowej**

W widmie masowym związku Ps\_1 (tabela 33, rycina 48), w trybie jonów dodatnich zarejestrowano sygnał przy  $m/z$  411 odpowiadający adduktowi jonu molekularnego z atomem sodu  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Na podstawie uzyskanych informacji można wnioskować, że masa badanej substancji wynosi 388 i odpowiada obliczonej masie teoretycznej kwasu salazynowego (388,28188).

Rezultaty wykonanych analiz i dostępna literatura [Huneck i Yoshimura 1999, Eifler-Lima i wsp. 2000] potwierdzają, że badany związek to **kwas salazynowy**.

#### **6.4.5. Związek Hs\_1 (kwas lekanorowy)**



#### **Analiza $^1\text{H}$ NMR, $^{13}\text{C}$ NMR**

Występujące w wykreślonym widmie protonowym (tabela 34, ryciny 49-50) sygnały w postaci dubletów przy  $\delta$  6,30 (1H, d, H-3,  $J = 2,42$ ), 6,38 (1H, d, H-3',  $J = 1,84$ ), 6,49 (1H, d, H-5,  $J = 2,23$ ),  $\delta$  6,57 (1H, d, H-5',  $J = 2,24$ ) świadczą o obecności w cząsteczce 4 protonów aromatycznych w położeniu *meta*. Grupy metylowe generują sygnały o wartości  $\delta$  2,59 (3H, s, CH<sub>3</sub>-8) i 2,65 (3H, s, CH<sub>3</sub>-8'). W obszarze  $\delta$  10-11 pojawia się sygnał charakterystyczny dla tzw. kwaśnego protonu ( $\delta$  11,29).

Analiza wykonanego widma węglowego  $^{13}\text{C}$  NMR (tabela 35, rycina 51) dostarcza informacji o 16 obecnych w cząsteczce atomach węgla. Dwa pierścienie

aromatyczne generują sygnały o wartości przesunięć chemicznych (od C-1 do C-6):  $\delta$  104,92, 164,03, 101,78, 165,97, 112,79, 144,68 oraz (od C-1' do C-6')  $\delta$  115,12, 152,98, 108,51, 164,03, 115,74, 144,27. Podstawniki metylowe przy pierścieniu aryłowym zaznaczają się w postaci pików przy  $\delta$  24,42 (C-8) i 23,78 (C-8'). Obecności grupy estrowej -COO- oraz karboksylowej COOH- dowodzą sygnały  $\delta$  166,79 (C-7) oraz 170,76 (C-7').

### Analiza spektralna w nadfiolecie

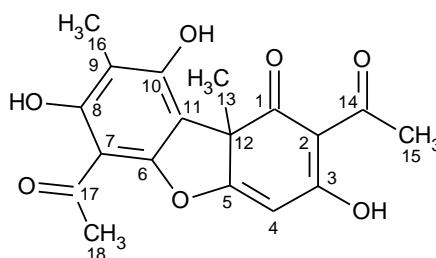
W widmie UV obserwowano trzy maksima absorpcji przy długościach fali  $\lambda_1 = 215$  nm,  $\lambda_2 = 270$  nm i  $\lambda_3 = 304$  nm. Widmo wykreślono w metanolu (rycina 52).

### Analiza metodą spektrometrii masowej

W widmie masowym związku Hs\_1 (tabela 36, rycina 53) w trybie jonów dodatnich są obecne piki pochodzące od protonowanej cząsteczki związku  $[M+H]^+$  przy  $m/z$  319,0772, a także adduktu jonu molekularnego z sodem  $[M+Na]^+$  przy  $m/z$  341,2981. Z uzyskanych wyników wnioskowano, że masa związku wynosi  $m/z$  318 co odpowiada teoretycznej masie cząsteczkowej kwasu lekanorowego (318,2782).

Wyniki przeprowadzonych analiz są zgodne z danymi literaturowymi [Huneck i Yoshimura 1999, Ivanova i wsp. 2011] i potwierdzają, że związek Hs\_1 to **kwas lekanorowy**.

#### 6.4.6. Związek Cu\_1 (kwas (-)-usninowy)



### Analiza $^1\text{H}$ NMR i $^{13}\text{C}$ NMR

Zarejestrowane widmo  $^1\text{H}$  NMR związku Cu\_1 (tabela 37, ryciny 54-55) potwierdza, że badany związek to kwas usninowy. Jedyne występujący w cząsteczce proton aromatyczny daje sygnał o wartości  $\delta$  5,98 (1H, s, H-4). Sygnały od czterech znajdujących się w cząsteczce grup metylowych występują przy  $\delta$  1,76 (3H, s, CH<sub>3</sub>-13), 2,66 (3H, s, CH<sub>3</sub>-15), 2,11 (3H, s, CH<sub>3</sub>-16), 2,68 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18). Ponadto w widmie

zarejestrowano sygnały od dwóch (z trzech występujących w cząsteczce) grup hydroksylowych:  $\delta$  13,32 (1H, s, OH-8) i 11,03 (1H, s, OH-10).

W widmie  $^{13}\text{C}$  NMR związku Cu\_1 zarejestrowano 18 sygnałów pochodzących od atomów węgla analizowanej cząsteczki kwasu usninowego. Aromatyczne atomy węgla generują sygnały o wartości przesunięć chemicznych: C-1 do C-11:  $\delta$  198,05, 179,37, 155,20, 98,33, 101,53, 96,11, 109,33, 157,50, 103,94, 163,88, 105,23. Sygnały wskazujące na obecność w cząsteczce grup aldehydowych występują przy  $\delta$  200,32 (C-14) i 201,76 (C-17). Cztery sygnały pochodzą od występujących w cząsteczce grup metylowych:  $\delta$  32,11 (C-13), 27,88 (C-15), 7,53 (C-16), 31,28 (C-18). Węgiel C-12 generuje sygnał o wartości przesunięcia chemicznego  $\delta$  59,06.

Widmo HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMR (tabela 38, ryciny 57-59) potwierdza przyporządkowanie protonom z cząsteczki kwasu usninowego odpowiednich atomów węgla.

#### **Analiza spektralna w nadfiolecie**

W widmie UV obserwowano dwa maksima absorpcji przy długościach fali  $\lambda_1 = 233$  nm,  $\lambda_2 = 282$  nm. Widmo wykreślono w metanolu (rycina 60).

#### **Analiza metodą spektrometrii masowej**

W widmie masowym (ESI-MS) związku Cu\_1 (tabela 39, rycina 61), w trybie jonów dodatnich obserwowano piki pochodzące od jonu molekularnego  $[\text{M}+\text{H}]^+$  przy  $m/z$  345,0977. Otrzymane wyniki pozwalają określić masę cząsteczkową badanego związku jako 344. Wartość ta jest zbieżna z obliczoną masą teoretyczną (344,31544) i potwierdza, że wyizolowany związek to kwas usninowy.

#### **Badanie skręcalności optycznej**

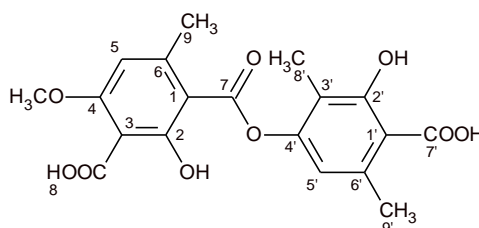
Skręcalność optyczna kwasu usninowego (tabela 40) została oceniona zarówno dla związku otrzymanego z wyciągu uzyskanego przez ekstrakcję surowca w aparacie Soxhleta oraz dla próbek, gdzie surowiec ekstrahowano z użyciem ultradźwięków. W przypadku pierwszej z zastosowanych metod ekstrakcji, otrzymano mieszaninę racemiczną kwasu usninowego, natomiast gdy do ekstrakcji używano ultradźwięków uzyskano jego enancjomer lewoskrętny. Biorąc pod uwagę różnice w sposobie otrzymania kwasu usninowego na zmianę skręcalności związków miała najprawdopodobniej wpływ temperatura zastosowana w czasie ekstrakcji. Ekstrakcja w aparacie Soxhleta przebiegała w temperaturze wrzenia heptanu (98°C), co mogło spowodować racemizację obecnego w surowcu kwasu usninowego. Przygotowanie



ekstraktu z użyciem ultradźwięków, przebiegało w znacznie niższej temperaturze (35-40°C) a otrzymany z niego kwas usninowy skręcał płaszczyznę światła spolaryzowanego w lewo. Dane piśmiennictwa wskazują, że *C. uncialis* zawiera kwas (-)-usninowy [Culberson 1979, Kinoshita 1997], co uzasadnia przypuszczenie o wpływie temperatury na przestrzenną konfigurację atomów w cząsteczce kwasu usninowego. Wnioski te wymagają jednak potwierdzenia przez przeprowadzenie dodatkowych eksperymentów. Ponieważ wiadomo, że w przypadku związków aktywnych biologicznie racemat charakteryzuje się często odmiennymi właściwościami od poszczególnych enancjomerów, informacje na temat czynności optycznej badanego związku są niezwykle istotne.

Wykonane analizy i zarejestrowane widma związku Cu\_1 są zgodne z danymi literaturowymi [Huneck i Yoshimura 1999], stąd obecny w *C. uncialis* związek to **kwas (-)-usninowy**.

#### 6.4.7. Związek Cu\_2 (kwas skwamatowy)



#### Analiza $^1\text{H NMR}$ , $^{13}\text{C NMR}$

W widmie  $^1\text{H NMR}$  (tabela 41, rycina 62-65) o obecności aromatycznych protonów świadczą sygnały  $\delta$  6,64 i 6,65 (2xH, s, H-5, H-5'). Sygnały od grup metylowych występują przy  $\delta$  2,04 i 2,48 (3H, s, CH<sub>3</sub>-8' oraz odpowiednio 2x3H, s, CH<sub>3</sub>-9, CH<sub>3</sub>-9'). Wartość sygnału przy  $\delta$  3,87 (3H, s, CH<sub>3</sub>O-4), została przyporządkowana grupie metoksyłowej przy pierścieniu aromatycznym.

Zarejestrowane widmo  $^{13}\text{C NMR}$  (tabela 42, rycina 66-67) wskazuje na obecność 19 atomów węgla w cząsteczce. 12 sygnałów pochodzi od aromatycznych atomów węgla. Są to piki zarejestrowane przy następujących wartościach przesunięć chemicznych (od C-1 do C-6):  $\delta$  111,49, 159,98, 104,51, 160,77, 105,41, 143,76 oraz od C-1' do C-6':  $\delta$  111,93, 161,29, 115,84, 151,97, 115,90, 138,92. Sygnały od podstawników metylowych występują przy  $\delta$  9,05 (C-8'), 21,15 (C-9) i 22,78 (C-9') oraz przy  $\delta$  56,26 dla grupy metoksyłowej CH<sub>3</sub>O- (C-4). Pik sugerujący istnienie

funkcji karboksylowej w cząsteczce został zarejestrowany przy 170,20 (C-8). Ponadto wartości przesunięć chemicznych przy  $\delta$  165,64 i 173,11 świadczą o obecności ugrupowania estrowego (C-7) i karboksylowego (C-7').

W wykreślonym widmie **HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMR** (tabela 42, rycina 68) obserwowano korelację wszystkich sygnałów występujących w cząsteczce protonów z atomami tworzącymi szkielet węglowy.

#### **Analiza spektralna w nadfiolecie**

W widmie UV obserwowano trzy maksima absorpcji przy długościach fali  $\lambda_1 = 215$  nm,  $\lambda_2 = 247$  nm i  $\lambda_3 = 310$  nm. Widmo wykreślono w metanolu (rycina 69).

#### **Analiza metodą spektrometrii masowej**

W widmie masowym (ESI-MS) związku Cu\_2 (tabela 43, rycina 70), w trybie jonów dodatnich obserwowano piki pochodzące od jonu molekularnego  $[\text{M}+\text{H}]^+$  przy  $m/z$  391,0953, jego adduktu z sodem  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  przy  $m/z$  413,0753 oraz potasem  $[\text{M}+\text{K}]^+$  przy 429,0482. Na podstawie analizy stwierdzono, że masa badanej cząsteczki jest równa 390 i odpowiada masie cząsteczkowej kwasu skwamatowego (masa teoretyczna 390,34082).

Wyniki przeprowadzonych analiz struktury związku Cu\_2 i dane literaturowe [Huneck i Yoshimura 1999] wskazują, że wyizolowany związek to **kwas skwamatowy**.

### **6.5. Analizy ilościowe**

W otrzymanych wyciągach acetonowych i metanolowych otrzymanych z analizowanych gatunków porostów, oceniono zawartość związków o charakterze polifenoli. Celem badania było wytypowanie wyciągów o wyższej zawartości polifenoli, które będą poddane badaniom aktywności antyoksydacyjnej i cytotoksycznej. Dane literaturowe wskazują, że metabolity wtórne porostów należą głównie do polifenoli [Özen i Kinalioglu 2008]. Całkowitą zawartość polifenoli w wyciągach określono wykorzystując metodę z odczynnikiem Folin-Ciocalteu i przeliczono na kwas galusowy (4.3.5.1.). Otrzymane wyniki wskazywały, że w więcej polifenoli zawierały wyciągi acetonowe niż metanolowe, a wspomniana różnica sięgała nawet 21% (tabele 45-49, rozdział 5.5.2.). Okazało się, że aceton jest lepszym ekstrahentem w przypadku, gdy pożądanym składnikiem wyciągów mają być związki polifenolowe występujące w badanych porostach. Stwierdzono, że najwyższą całkowitą zawartością polifenoli wśród wyciągów acetonowych charakteryzował się

ekstrakt z *H. scalaris* (476,94 mg GAE/g wyciągu), następnie wyciągi z *H. physodes* (299,40 mg GAE/g wyciągu) i *P. sulcata* (130,75 mg GAE/g wyciągu), natomiast najmniej związków tego typu zawierał wyciąg z *C. uncialis* (70,36 mg GAE/g wyciągu). Podobnie w przypadku wyciągów metanolowych najwięcej związków polifenolowych zawierał wyciąg z *H. scalaris* (268,31 mg GAE/g wyciągu), więcej z *H. physodes* (197,42 mg GAE/g) i *P. sulcata* (74,87 mg GAE/g) a najmniej z *C. uncialis* (30,67 mg GAE/g wyciągu). Określona zawartość związków polifenolowych w wyciągach z *H. physodes* i *P. sulcata* była porównywalna z wartościami cytowanymi w piśmiennictwie [Mitrović i wsp. 2011]. Wyniki badań całkowitej zawartości sumy polifenoli dla ekstraktów z *H. scalaris* i *C. uncialis* przedstawiano po raz pierwszy.

Oznaczono również (metoda HPLC), zawartość kwasu (-)-usninowego w wyciągach z *C. uncialis* przeznaczonych do badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Otrzymane rezultaty wskazują, że wyciągiem o najwyższej zawartości kwasu usninowego był wyciąg heptanowy (63,25% w wyciągu), natomiast najmniej związku zawierał wyciąg metanolowy (19%). Wyciągi eteru dietylowego i acetonowy zawierały 43,67 i 28,40% kwasu usninowego, odpowiednio (tabela 51, rozdział 5.6.). Ponadto badaniu HPLC został poddany także wyciąg acetonowy przygotowany do badań aktywności antyoksydacyjnej i cytotoksycznej. Uzyskane rezultaty wykazały, że zawierał o 41,76% kwasu (-)-usninowego. Prowadzone badania dowiodły, że wyciągi otrzymane z surowca zebranego z różnych miejsc i w różnym okresie wegetacji (rozdział 4.2.) różniły się zawartością kwasu usninowego. Plecha *C. uncialis* zebrana latem na skraju lasu w Wytomyślu (woj. wielkopolskie), dostarczyła wyciągu acetonowego uboższego w kwas (-)-usninowy (28,40%) w porównaniu z plechą zebraną późną wiosną na terenie Borów Tucholskich (41,76%). O różnicach w ilości i różnorodności związków w plechach jednego gatunku porostu z uwagi na odmienne warunki środowiska donoszą dostępne publikacje [Millot i wsp. 2007, Solhaug i wsp. 2009].

## 6.6. Aktywność biologiczna

### 6.6.1. Właściwości antyoksydacyjne

Właściwości antyoksydacyjne wyciągów acetonowych z porostów omawianych w niniejszej pracy badano dwoma metodami, przy użyciu odczynników: DPPH i FRAP.

Do badań wybrano wyciągi acetonowe, gdyż uzyskane wcześniej wyniki wykazały, że charakteryzują się one wyższą od ekstraktów metanolowych zawartością polifenoli. Według dostępnych w literaturze informacji, zawartość polifenoli w surowcach roślinnych, także w porostach, koreluje z siłą działania antyoksydacyjnego [Behera i wsp. 2005, Gulluce i wsp. 2006, Kosanić i Ranković 2011, Kosanić i wsp. 2012].

Nie ma danych na temat aktywności antyoksydacyjnej wyciągów z *H. scalaris* i *C. uncialis* a wyniki zawarte w niniejszej pracy są prezentowane po raz pierwszy. Właściwości antyoksydacyjne wyciągów z *H. physodes* i *P. sulcata* zostały określone w badaniach prowadzonych równoległe z moją pracą [Stojanović i wsp. 2010, Mitrović i wsp. 2011, Kosanić i wsp. 2012]. Publikowane wyniki dotyczyły jednak aktywności ekstraktów przygotowanych z wykorzystaniem innych niż w pracy metod ekstrakcji oraz odnosiły się do surowców nie pochodzących z terenu Polski, co mogło wpłynąć na skład chemiczny badanych prób. Piśmiennictwo dowodzi, że wytwarzanie metabolitów wtórnych różni się w zależności od środowiska życia porostów a warunki klimatyczne mogą znacząco zmieniać jakościową i ilościową zawartość związków w plesze porostu [Millot i wsp. 2007, Hauck i Hunek 2007, Solhaug 2009], co prawdopodobnie wpływa na posiadane właściwości biologiczne.

Wyniki badań z odczynnikiem DPPH wyrażono za pomocą parametru  $IC_{50}$ , oraz jako równoważnik witaminy C ( $DPPH_{VCE}$ ), czyli jako stężenie witaminy C potrzebne do osiągnięcia takiego poziomu aktywności antyoksydacyjnej co badana substancja. Otrzymane rezultaty wykazały, że badane wyciągi posiadały zróżnicowaną zdolność zmiatania wolnego rodnika DPPH<sup>•</sup>. Najsilniej działał wyciąg acetonowy z *H. physodes* ( $IC_{50} = 21,49 \mu\text{g/ml}$ ), słabiej wyciągi acetonowe z *H. scalaris* i *P. sulcata* ( $IC_{50} = 205,70$  oraz  $664,94 \mu\text{g/ml}$ , odpowiednio), natomiast wyciąg acetonowy z *C. uncialis* wykazywał bardzo niską aktywność antyoksydacyjną ( $IC_{50} > > 200 \mu\text{g/ml}$ ) (tabele 54-57 i ryciny 81-84). Równocześnie badano substancje o uznanej aktywności antyoksydacyjnej: BHA i witaminę C. Z obliczonych na podstawie uzyskanych rezultatów wartości  $IC_{50}$  dla obu substancji referencyjnych wynika, że posiadają one znacznie wyższą niż badane wyciągi z porostów zdolność zmiatania wolnego rodnika DPPH<sup>•</sup> ( $IC_{50} = 4,14$  i  $4,04 \mu\text{g/ml}$ , BHA i witamina C, odpowiednio) (tabela 52, rycina 79 oraz tabela 53, rycina 80). Siła działania wyciągu z *H. physodes* była jednak tylko około pięć razy niższa od aktywności BHA i witaminy C uważanych za silne antyutleniacze. Wynik ten świadczy o istotnej aktywności przeciwutleniającej ekstraktu.

Analiza danych pozwoliła zauważyć, że wyciągi o wyższej zawartości związków polifenolowych działały silniej, od tych które zawierały ich mniej (rycina 87a). Wyjątek stanowił wyciąg z *H. scalaris*, w którym oznaczona zawartość polifenoli była najwyższa, lecz wyciąg działał 8-krotnie słabiej od zawierającego mniej substancji polifenolowych, ekstraktu acetonowego z *H. physodes*. Otrzymany wynik można prawdopodobnie tłumaczyć faktem, że w *H. scalaris* występuje głównie kwas lekanorowy, który wg danych dostępnego piśmiennictwa jest stosunkowo słabym antyoksydantem [Lopes i wsp. 2008]. Wyciąg acetonowy z *P. sulcata* charakteryzował się niższą, w porównaniu z dwoma wymienionymi wyżej ekstraktami zawartością związków o charakterze polifenoli, co wiązało się ze znacznie niższą aktywnością antyoksydacyjną. Wyciąg z *C. uncialis* badano w stężeniu do 200 µg/ml. Było to spowodowane bardzo małymi zmianami aktywności (o około 7%) w zastosowanym przedziale stężeń (0 – 200 µg/ml). Można przypuszczać, że niską aktywność wyciągu z *C. uncialis* uzasadnia występowanie w nim związków o niewielkiej aktywności antyoksydacyjnej. Obecny w wyciągu kwas usninowy wg opublikowanych danych posiadał przeciętną aktywność antyoksydacyjną, a zdolność do zmiatania wolnych rodników przez kwas usninowy określona w badaniach prowadzonych z odczynnikiem DPPH opisywała wartość  $IC_{50} = 130,73 \mu\text{g/ml}$  i  $IC_{50} > 500 \mu\text{g/ml}$  [Ranković i wsp. 2012, Atalay i wsp. 2011]. Kwas skwamatowy nie był jak dotąd przebadany biologicznie, nie są więc znane jego właściwości przeciwutleniające. Jednak z uwagi na budowę chemiczną zbliżoną do słabo aktywnego kwasu lekanorowego, można sądzić, że jego działanie przeciwrodnikowe jest niskie, co dodatkowo uzasadniałoby niewielką aktywność wyciągu z *C. uncialis*. Określono również zależność między aktywnością antyoksydacyjną (DPPH) badanych wyciągów i stężeniem polifenoli w badanych próbach (rycina 87b). Wyniki wykazały, że współczynnik  $R^2$  wynosi 0,4839, co świadczy o stosunkowo wysokiej korelacji pomiędzy analizowanymi parametrami. Fakt ten sugeruje, że na zdolność analizowanych wyciągów do zmiatania wolnych rodników, poza znaczącym wpływem związków o charakterze polifenoli, miała wpływ również zawartość substancji o innym charakterze chemicznym.

Drugą metodą oznaczenia antyoksydacyjnej aktywności badanych gatunków porostów był test określający całkowitą zdolność redukującą z wykorzystaniem tzw. odczynnika FRAP. Metoda ta, chociaż często stosowana do pomiaru aktywności antyoksydacyjnej m.in. materiału roślinnego, została po raz pierwszy wykorzystana do oceny właściwości antyoksydacyjnych porostów. Technika ta, chociaż przez wielu

autorów oceniana jako prosta i skuteczna, nie do końca sprawdziła się w ocenie aktywności antyoksydacyjnej wybranych do badań porostów. W przypadku, gdy próbka zawierała wyciąg acetonowy w stężeniu powyżej 50 µg/ml, po dodaniu odczynnika FRAP w roztworze pojawiał się osad, który uniemożliwiał dokładny pomiar absorbancji. Wydaje się, że było to spowodowane niską rozpuszczalnością metabolitów porostowych w wodzie i przy stosowaniu ich w wyższych stężeniach w wodnym roztworze odczynnika FRAP o kwaśnym odczynie, dochodziło do wytrącania się osadu, co uniemożliwiało wykonanie analizy. Spowodowało to, że do badań wybrano stężenia wyciągów nieprzekraczające 50 µg/ml. Pomimo tych trudności, przeprowadzony eksperyment pozwolił zauważyć widoczne różnice w sile działania wyciągów. W pierwszym etapie testowano wyciągi acetonowe z *H. physodes*, *P. sulcata*, *H. scalaris*, a także substancję referencyjną - witaminę C, dla której zależność aktywności od stężenia miała przebieg liniowy (tabela 58, rycina 85). Wykreślona krzywa kalibracyjna umożliwiła przedstawienie wyników jako równoważnik witaminy C (FRAP<sub>VCE</sub>) (tabela 59 i 60, rycina 86), co pozwoliło na porównanie aktywności antyoksydacyjnej zbadanej z użyciem dwóch różnych metod (DPPH i FRAP). Zdolność redukująca wyciągu z *C. uncialis* nie została oznaczona, gdyż w wybranym do badań stężeniu absorbancja próbki była na tyle niska, iż uniemożliwiało to interpretację otrzymanych wyników. Uzyskane rezultaty pokazały, że zdecydowanie silniej od innych wyciągów działał wyciąg acetonowy z *H. physodes*. Wynik ten potwierdził jego silne właściwości antyoksydacyjne, które stwierdzono w badaniu z odczynnikiem DPPH (rycina 88). Obliczony dla *H. physodes* FRAP<sub>VCE</sub> był 7-10 razy wyższy niż dla *H. scalaris* i *P. sulcata* (FRAP<sub>VCE</sub> = 7,97; 1,17 i 0,75 µg witaminy C/ml, odpowiednio). Tak jak w przypadku oznaczeń z odczynnikiem DPPH, wyciąg z *H. scalaris* działał silniej niż z *P. sulcata*, choć różnica w aktywności pomiędzy nimi była mniejsza. W kolejnym etapie prace rozszerzono o badanie acetonowego wyciągu z *H. physodes* w niższych stężeniach. Otrzymane rezultaty ukazały, że badany wyciąg był aktywny również w stężeniach < 50 µg/ml.

Zestawienie wyników badań aktywności przeciwutleniającej za pomocą metody DPPH i FRAP (rycina 89), pokazało, że pomiędzy otrzymanymi rezultatami istnieje wysoka zależność liniowa ( $R^2 = 0,9987$ ). Takie zjawisko było już opisywane w literaturze [Zhou i wsp. 2011].

### 6.6.2. Właściwości cytotoksyczne

Choroby nowotworowe to ważny problem dla współczesnej medycyny. Według danych Głównego Urzędu Statystycznego, w Polsce w roku 2009 na nowotwory złośliwe zachorowało 135776 osób [Rocznik statystyczny 2012]. Środki jakimi dysponuje medycyna wydają się być ciągle niewystarczające dla podjęcia skutecznego leczenia raka, dlatego też, konieczne jest prowadzenie poszukiwań nowych związków, które mogłyby być stosowane w efektywnym leczeniu nowotworów. Jednym ze źródeł nowych leków przeciwnowotworowych mogą być substancje pochodzenia naturalnego. Wykazano wielokrotnie, że związki naturalne bądź ich półsyntetyczne pochodne posiadają właściwości chroniące przed rozwojem nowotworu lub hamujące jego rozwój [Reddy i wsp. 2003]. W poszukiwaniach nowych leków przeciwnowotworowych warto zwrócić uwagę na metabolity wtórne wytwarzane przez porosty. Pismienictwo dostarcza informacji, które wskazują że metabolity porostów posiadają działanie antynowotworowe [Bezivin i wsp. 2004, Bačkorova i wsp. 2010]. Zachęca to do badań nad biologicznymi właściwościami tej grupy organizmów.

W ramach niniejszej pracy **badano właściwości cytotoksyczne związków i wyciągów** otrzymanych z 4 gatunków grzybów lichenizowanych. Prace prowadzono na różnych liniach komórkowych i za pomocą kilku testów (z odczynnikami: MTT, NRU oraz CV).

W pierwszym etapie badań przeprowadzono skrining aktywności cytotoksycznej (metoda z MTT) wyciągów i wyizolowanych z badanych porostów związków o charakterze depsydów (kwas lekanorowy, kwas skwamatowy), depsydonów (kwas salazynowy, kwas fizodowy). Oprócz samodzielnie wyizolowanych związków przebadano również zakupioną na potrzeby badań atranorynę (depsyd) oraz pochodzący z kolekcji związków Katedry i Zakładu Farmakognozji kwas (+)-usninowy. Testy na prawoskrętnym i lewoskrętnym izomerze kwasu usninowego miały na celu stwierdzenie czy istnieją różnice w aktywności cytotoksycznej obu optycznych odmian.

Badania aktywności związków i wyciągów rozpoczęto od oceny ich wpływu na komórki nowotworowe gruczołu piersiowego, dalej skupiono się na ich działaniu na pozostałe linie komórkowe. Siłę działania przedstawiano podając % żywych komórek po zakończonym eksperymencie (ryciny 90 i 91).

**Atranoryna**, z uwagi na trudności w rozpuszczeniu, była badana tylko w stężeniu 25  $\mu$ M. Uzyskane rezultaty wskazywały na jej umiarkowane działanie wobec komórek nowotworów piersi T47D (60,6%) i bardzo słabą aktywność wobec

dwóch kolejnych typów komórek raka gruczołu piersiowego (MDA-MB-231 oraz MCF-7; 92,7 i 96,9% odpowiednio). Właściwości cytotoksyczne atranoryny wobec komórek MDA-MB-231 określono po raz pierwszy, natomiast już wcześniej testowano działanie tego depsydu na komórki linii MCF-7 i T47D [Kristmundsdóttir i wsp. 2005, Bačkorova i wsp. 2010]. Wyniki badań uzyskanych w ramach niniejszej pracy były zbieżne z publikowanymi wcześniej danymi (MCF-7  $IC_{50} > 200 \mu M$ ; T47D brak aktywności). Aktywność atranoryny na pozostałe testowane w pracy komórki określono po raz pierwszy. Wobec komórek raka prostaty (LnCaP) atranoryna działała najsilniej spośród badanych depsydów (76,0%). Podobny poziom aktywności został odnotowany wobec komórek raka wątroby (HepG2 79,3%). Komórki raka płuc (CaLu-1) przeżywały pod wpływem badanego stężenia atranoryny w 84,7% (rycina 90).

Uzyskane rezultaty pokazały, że **kwask lekanorowy** posiada najniższą cytotoksyczność wśród testowanych związków. Przeżywalność komórek nowotworowych dla kwasu lekanorowego w stężeniu  $100 \mu M$ , wynosiła 82,2%, 92,9% i 95,8%, odpowiednio dla komórek raka piersi T47D, MDA-MB-231 i MCF-7. Aktywność wobec pozostałych linii komórkowych układała się w kolejności: HepG2 > CaLu-1 > LnCaP (86,3 > 90,6 > 96,2%, odpowiednio). Wskazuje to, że związek wyizolowany z *H. scalaris* działał najsilniej na linię komórek raka piersi T47D, natomiast niemal zupełnie nie wpływał na przeżywalność komórek raka płuc. Dane literaturowe wskazują, że kwas lekanorowy był do tej pory badany na jednej (MCF-7;  $IC_{50} > 150 \mu M$ ) z sześciu wybranych do eksperymentu linii komórkowych (rycina 90) [Bogo i wsp. 2010].

Nie ma żadnych danych literaturowych na temat aktywności cytotoksycznej kwasu skwamatowego. Z przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej badań, wynika, że w obranym stężeniu ( $100 \mu M$ ), wyizolowany z *C. uncialis* kwas skwamatowy jest substancją o średniej lub małej cytotoksyczności wobec badanych komórek. Związek działał najsilniej na komórki raka piersi linii T47D (70,7%) oraz nieco słabiej na linię komórkową MDA-MB-231 i MCF-7 (81,2% i 83,4%, odpowiednio). Kwas skwamatowy nie wpływał na wzrost komórek raka prostaty (LnCaP), wątroby (HepG2) i płuc (CaLu-1) (96,2 > 96,6 > 99,0% - odpowiednio).

Wyniki eksperymentu wskazują, że testowane depsydy są w niewielkim stopniu cytotoksyczne wobec wybranych linii komórkowych. Rezultaty te, niekorzystne z punktu widzenia stosowania tych związków w leczeniu chorób nowotworowych, mogą mieć istotne znaczenie dla poszukiwań leków o innym działaniu, gdzie toksyczny



wpływ na komórki nie jest pożądany (np. działanie fotoprotekcyjne lub przeciwzapalne) [Fernández i wsp. 1998, Kumar i Müller 1999a].

W ramach pracy badano również właściwości cytotoksyczne dwóch depsydonów: **kwasu fizodowego** i **kwasu salazynowego**, otrzymanych odpowiednio z: *H. physodes* i *P. sulcata*. Z zebranych informacji wynika, że aktywność tych związków nie była dotąd badana na liniach testowanych w niniejszej pracy.

Rezultaty eksperymentów przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy wskazywały jednoznacznie na bardzo wysoką cytotoksyczność **kwasu fizodowego**. Kwas fizodowy, w stężeniu 100  $\mu\text{M}$  zabijał 100% komórek wszystkich badanych linii nowotworowych (rycina 90). Tak silna aktywność związku skłoniła do poszerzenia zakresu badań. Spośród testowanych komórek nowotworowych do dalszych eksperymentów wybrano linie komórek raka piersi (MDA-MB-231, MCF-7, T47D) oraz dodatkowo linię nienowotworową komórek nabłonka gruczołu piersiowego MCF-10A. Aktywność kwasu fizodowego przebadano tym razem w różnych stężeniach (1,5625 - 100  $\mu\text{M}$ ), stosując 3 różne typy testów (rycina 93 i 94). Uzyskane wyniki potwierdziły cytotoksyczne działanie kwasu fizodowego na komórki tak estrogenozależnych jak i estrogenoniezależnych nowotworów piersi. Okazało się, że depsydon działał nieco silniej na linie komórek estrogenozależnych nowotworów MCF-7 i T47D niż na estrogenoniezależną linię MDA-MB-231. W zależności od typu zastosowanego do badań właściwości cytotoksycznych testu (MTT, NRU, CV) śmierć 50% komórek następowała w stężeniu:  $\text{IC}_{50} = 46,0\text{-}72,4 \mu\text{M}$  (MCF-7);  $\text{IC}_{50} = 49,5\text{-}75,4 \mu\text{M}$  (T47D);  $\text{IC}_{50} = 68,8\text{-}93,9 \mu\text{M}$  (MDA-MB-231). Ponadto w badanym zakresie stężeń kwas fizodowy okazał się nietoksyczny wobec komórek nienowotworowych (MCF-10A,  $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ), co jest pożądaną cechą substancji o działaniu przeciwnowotworowym. Wynik ten był niezależny od zastosowanego do badań testu, co utwierdza w przekonaniu o braku właściwości cytotoksycznych związku na ten typ komórek.

Kolejnym testowanym depsydem był  **kwas salazynowy**, który w stężeniu (100  $\mu\text{M}$ ) wykazywał niewielką aktywność cytotoksyczną na badane komórki. Najsilniej działał na linię komórek raka piersi T47D i umożliwiał ich przeżycie w około 66%. Aktywność na dwie pozostałe linie komórkowe raka sutka była niższa i porównywalna między sobą (84,2 i 88,5% żywych komórek linii MCF-7 oraz MDA-MB-231, odpowiednio). W przypadku komórek raka wątroby (HepG2), prostaty (LnCaP)

i płuc (CaLu-1), kwas salazynowy umożliwił przeżycie 84,7-91,3% komórek, odpowiednio (rycina 90).

Wobec dużego rozpowszechnienia w porostach **kwasu usninowego**, zakres wykonanych dotychczas badań dotyczących jego aktywności jest szerszy niż w przypadku pozostałych omawianych w pracy wtórnych metabolitów porostowych. Większość dostępnych prac ocenia działanie kwasu (+)-usninowego a aktywność lewoskrętnego izomeru opisywana była w nielicznych publikacjach [Bézivin i wsp. 2004, Bazin i wsp. 2008, Einarsdottir i wsp. 2010]. W prezentowanych w piśmiennictwie wynikach nie podawano często informacji na temat skręcalności optycznej badanego związku. W naszym eksperymencie oceniono aktywność **kwasu (-)-usninowego** wyizolowanego z *C. uncialis* i jego izomeru optycznego **kwasu (+)-usninowego**, pochodzącego z kolekcji związków Katedry i Zakładu Farmakognozji. Dane piśmiennictwa wskazują, że kwas (+)-usninowy był już badany na liniach komórek raka piersi MCF-7, T47D i MDA-MB-231 (aktywność kwasu usninowego na komórki MCF-7 i T47D testowano dla obu izomerów), natomiast wg posiadanych informacji badania aktywności cytotoksycznej wykonano po raz pierwszy na komórkach raka prostaty (LnCaP), raka płuc (CaLu-1), raka wątroby (HepG2) oraz, w przypadku kwasu (-)-usninowego, na komórkach nowotworu piersi (MDA-MB-231). Eksperyment przebiegał w dwóch fazach. Najpierw przeprowadzono badanie skryningowe, w którym testowano kwas (+)-usninowy w stężeniu 25  $\mu\text{M}$ . Wyniki pokazały, że kwas (+)-usninowy umożliwił przeżycie 10-50% komórek. Związek ten wpływał najslabiej na komórki nowotworowe linii T47D, gdyż w badanym stężeniu powodował śmierć 50% komórek, natomiast pozostałe komórki były bardziej wrażliwe (rycina 90). Dalsza część eksperymentu miała wykazać ewentualne różnice pomiędzy aktywnością cytotoksyczną obu izomerów kwasu usninowego. W niniejszej pracy przedstawiono rezultaty badań obu izomerów kwasu usninowego prowadzonych na sześciu liniach komórek nowotworowych i jednej linii komórek nienowotworowych (MCF-10A). Otrzymane wyniki wskazywały, że kwas (+)-usninowy jest związkiem o większej toksyczności wobec komórek nowotworowych w porównaniu z izomerem lewoskrętnym (rycina 95). Wszystkie z badanych linii komórek raka piersi były bardziej wrażliwe na działanie kwasu (+)-usninowego, przy czym największa rozbieżność w aktywności została odnotowana w stosunku do komórek raka piersi linii MCF-7 (3,2-krotnie silniej działał izomer prawoskrętny od lewoskrętnego ( $\text{IC}_{50} = 13,1$  i  $42,2 \mu\text{M}$ , odpowiednio). Równocześnie kwas (+)-usninowy wykazywał ponad 3-krotnie słabsze

działanie na nienowotworowe komórki raka piersi MCF-10A. Aktywność kwasu usninowego wobec komórek T47D i MDA-MB-231 była 1,6-1,8 raza wyższa dla izomeru prawoskrętnego. W eksperymencie testowano również wpływ kwasu usninowego na komórki raka prostaty (LnCaP), płuc (CaLu-1) i wątroby (HepG2). Obie odmiany izomeryczne (kwas (+)- i (-)-usninowy) były cytotoksyczne dla komórek raka prostaty ( $IC_{50} = 6,7$  i  $9,4 \mu M$ , odpowiednio), komórek raka płuc ( $IC_{50} = 15,7$  i  $37,3 \mu M$ , odpowiednio) oraz raka wątroby ( $IC_{50} = 64,5$  oraz  $62,7 \mu M$ , odpowiednio). W przypadku komórek HepG2 wyniki badań wstępnych aktywności kwasu (+)-usninowego różniły się od przeprowadzonych w następnej kolejności testów w szerszym zakresie stężeń. Wskazuje to na konieczność przeprowadzenia dodatkowych testów. Porównanie cytotoksycznego działania kwasu (+) i (-)-usninowego zostało przedstawione w tabeli 61 i 62 oraz na rycinie 95.

Opublikowane dotychczas wyniki działania kwasu usninowego na komórki raka piersi MCF-7, T47D i MDA-MB-231 różniły się od prezentowanych w niniejszej pracy. Dla badanego kwasu (+)-usninowego wg danych piśmiennictwa wartość  $IC_{50}$  wahały się od  $18,9 \mu M$  [Mayer i wsp. 2005] przez  $IC_{50} = 75,7 \mu M$  [Brisdelli i wsp. 2012] do  $105,4 \mu M$  [Bazin i wsp. 2008, Bačkorova i wsp. 2010]. Wyniki prezentowane przez Bazin i wsp. zakładają dwukrotnie wyższą aktywność na komórki MCF-7 kwasu (-)-usninowego ( $IC_{50} = 51,7 \mu M$ ) w porównaniu z jego odmianą prawoskrętną. W innych badaniach aktywność obu izomerów kwasu usninowego na komórki T47D testowano w eksperymencie ze znakowaną tymidyną i w przypadku obu typów kwasu usninowego była ona porównywalna ( $IC_{50} \approx 4 \mu g/ml$ ,  $\approx 11 \mu M$ ) [Einarsdóttir i wsp. 2010]. Prezentowane w niniejszej pracy doktorskiej wyniki testu MTT wskazywały na około dwukrotnie wyższą aktywność kwasu (+)-usninowego. Działanie kwasu usninowego (prawdopodobnie odmiany prawoskrętnej) na komórki linii MDA-MB-231 (test MTT) badał Mayer, otrzymując rezultaty wskazujące na bardzo wysoką aktywność kwasu (+)-usninowego, która była równocześnie 2-krotnie wyższa od uzyskanych w badaniach prowadzonych w ramach powyższej pracy [Mayer i wsp. 2005].

**Porównanie** wyników badań właściwości cytotoksycznych **kwasu fizodowego** i **kwasów usninowych**, wobec komórek nowotworów piersi i nienowotworowych komórek nabłonka gruczołu piersiowego, pozwoliło wysunąć wniosek, że kwas usninowy jest związkiem o wyższej od kwasu fizodowego aktywności cytotoksycznej wobec badanych komórek nowotworowych. Znaczna różnica w działaniu

porównywanych związków dotyczyła nienowotworowych komórek MCF-10A. Kwas fizodowy nie wykazywał wobec nienowotworowych komórek MCF-10A właściwości toksycznych w odróżnieniu od kwasów usninowych, których aktywność w tym przypadku można określić jako umiarkowaną (tabela 61).

W prezentowanej pracy testowano również po raz pierwszy cytotoksyczne działanie wyciągów acetonowych z *H. physodes*, *P. sulcata*, *H. scalaris* i *C. uncialis* (stężenie 100 µg/ml; test MTT) na wybrane linie komórek nowotworowych (rycina 91).

Dużą uwagę zwróciło działanie **wyciągu z *Hypogymnia physodes***, który był aktywny wobec wszystkich badanych linii komórkowych. Ekstrakt acetonowy w badanym stężeniu, podany na komórki nowotworów piersi: T47D, MDA-MB-231 i MCF-7, umożliwiał przeżycie odpowiednio: 36,5, 47,6 i 52,7% komórek. Wyciąg działał silnie również na komórki raka prostaty i wątroby (HepG2 i LnCaP) zmniejszając ich żywotność do 17,3 i 36,8%. Komórki raka płuc (CaLu-1) były wrażliwe na działanie badanego wyciągu w niewielkim stopniu (84,0%). Warto zaznaczyć, że wobec komórek raka wątroby (HepG2) i raka piersi (T47D), ekstrakt acetonowy z *H. physodes* działał najsilniej z testowanych w eksperymencie wyciągów. Z uwagi na aktywność przeciwnowotworową wyciągu i interesujące wyniki eksperymentu nad cytotoksycznymi właściwościami izolowanego z *H. physodes* kwasu fizodowego, testowany wyciąg acetonowy poddano dalszym badaniom na komórkach raka piersi. Rozszerzenie zakresu badanych stężeń (1,5625-100 µg/ml), pozwoliło ustalić wartość  $IC_{50}$ , która dla 3 badanych linii komórek nowotworowych (MDA-MB-231, T47D, MCF-7) wynosiła odpowiednio  $IC_{50} = 46,2; 60,0$  oraz 110,4 µg/ml (rycina 92). Porównanie stopnia aktywności cytotoksycznej wyciągu acetonowego z *H. physodes* i wyizolowanego z niego kwasu fizodowego wskazuje, że siła działania ekstraktu kształtuje się: MDA-MB-231 > T47D > MCF7, natomiast na działanie kwasu fizodowego niezależnie od typu zastosowanego testu, najbardziej wrażliwe były komórki MCF7  $\approx$  T47D > MDA-MB-231 (tabela 61). Sugeruje to, że w wyciągu oprócz kwasu fizodowego obecne są jeszcze inne związki czynne, które mają wpływ na aktywność biologiczną. Ponieważ w prowadzonym eksperymencie wykazano, że obecna w wyciągu atranoryna nie wpływała na żywotność komórek MDA-MB-231 i MCF-7, prawdopodobnie nie miała ona znaczenia dla różnic w aktywności wyciągu i kwasu fizodowego. Być może pewną rolę odgrywał kwas fizodalowy, który okazał się związkiem silnie cytotoksycznym dla tymocytów (rozdział

3.1.5.) [Pavlovic i wsp. 2013], a w badanym ekstrakcie znajduje się w dużej ilości (ryciny 17 -19).

Nie ma danych piśmiennictwa dotyczących aktywności biologicznej *H. scalaris*. **Wyciąg acetonowy z *Hypocenomyce scalaris***, testowany w stężeniu 100 µg/ml wykazywał stosunkowo wysoką aktywność wobec wszystkich badanych komórek raka piersi (52,4-56,1% dla T47D > MCF-7 > MDA-MB-231). Działał on jednak widocznie słabiej na pozostałe badane komórki nowotworowe, umożliwiając ich przeżycie w 66,2-85,8% (CaLu > LnCaP > HepG2). Wiadomo, że głównym składnikiem wyciągu acetonowego z *H. scalaris* jest kwas lekanorowy (ryciny 17-18). Ponieważ rezultaty omawianego wcześniej doświadczenia wykazały, że kwas lekanorowy obniżał żywotność komórek w mniejszym stopniu niż zawierający go ekstrakt, wydaje się, że nie jest on związkiem determinującym aktywność badanej próby pomimo, że dominuje w badanym ekstrakcie. W tym przypadku należy przypuszczać, że na właściwości cytotoksyczne wpływają inne, dotąd niezidentyfikowane, lecz zawarte w wyciągu w niewielkiej ilości związki (rycina 17).

**Wyciąg z *Parmelia sulcata*** nie był wcześniej badany na komórkach prezentownych w niniejszej pracy. Wyniki przeprowadzonych badań wyciągu acetonowego w stężeniu 100 µg/ml wykazały, że działał on najsilniej na komórki MDA-MB-231 (26,8%). Aktywność badanego ekstraktu była zdecydowanie niższa wobec pozostałych linii komórkowych raka piersi (67,6 i 90,33% dla MCF-7 i T47D). Wyciąg z *P. sulcata* wykazywał również znaczną toksyczność wobec komórek raka wątroby (HepG2) i w badanym stężeniu zabijał około 50% komórek. Wpływ na komórki raka płuc (CaLu-1) i prostaty (LnCaP) obrazował procent przeżycia komórek, który wynosił odpowiednio: 76,9 i 83,4%. Należy zauważyć, że wyciąg acetonowy działał najsilniej na komórki raka piersi MDA-MB-231 i słabo na komórki T47D, co różniło go od aktywności kwasu salazynowego. Depsydon działał najsilniej na komórki T47D (66,1%) i słabo na MDA-MB-231 (88,5%). Analiza TLC wykazała, że wyciąg acetonowy z *P. sulcata* oprócz kwasu salazynowego zawierał dodatkowe związki (m.in. atranorynę, chloroatranorynę oraz dotąd niezidentyfikowane; ryciny 16-19). Można więc przypuszczać, że w tym przypadku silniejsza aktywność cytotoksyczna wyciągu z *P. sulcata*, wynika z obecności w ekstrakcie dodatkowych, bardziej toksycznych związków lub synergizmu działania między nimi.

**Wyciąg acetonowy z *Cladonia uncialis***, zawierający kwas (-)-usninowy i kwas skwamatowy nie był nigdy wcześniej badany wobec komórek nowotworowych.

Uzyskane wyniki pozwoliły zauważyć, że spośród badanych linii komórkowych raka piersi, badany ekstrakt działał najsilniej na komórki MCF-7 (46,3%), słabiej na komórki T47D (55,8%) i MDA-MB-231 (70,6%). Wyciąg był wysoce aktywny wobec komórek raka prostaty (LnCaP) i raka wątroby (HepG2) powodując w badanym stężeniu przeżycie odpowiednio 24,2% lub 34,3% komórek. Wyciąg z *C. uncialis* wykazywał średni wpływ na żywotność komórek raka płuc (CaLu-1) i umożliwił przeżycie 71,1% z nich. W wyciągu acetonowym z *C. uncialis* oznaczono zawartość kwasu usninowego, która wynosiła 41,76% (417,6 µg/ml) kwasu usninowego. Na podstawie tych badań można stwierdzić, że stężenie kwasu (-)-usninowego w badanym wyciągu było wyższe niż to, na które eksponowano komórki w przypadku czystego związku (100 µM = 34,4 µg/ml kwasu usninowego) (rycina 91, tabela 62). Wynika z tego, że niższa (z wyjątkiem linii MDA-MB-231 i T47D) aktywność acetonowego wyciągu z *C. uncialis* spowodowana była obecnością w wyciągu innych, prawdopodobnie mniej toksycznych od kwasu usninowego związków (m.in. kwasu skwamatowego). Substancje te, w zależności od typu badanych komórek mogły wzajemnie na siebie oddziaływać i zmieniać wrażliwość badanych linii komórkowych. Istnieją prace, które mówią o występowaniu synergizmu w działaniu kwasu usninowego i kwasu gyroforowego (tridepsd) wyrażającego się polepszeniem odbudowy uszkodzonej monowarstwy keratynocytów ludzkich [Burlando i wsp. 2009]. Możliwe jest zatem, że pomiędzy zawartymi w wyciągu kwasem usninowym i skwamatowym również występuje współdziałanie o nieznanych dotąd konsekwencjach, które mogło mieć wpływ na wyniki prowadzonego eksperymentu.

### 6.6.3. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe

Już w latach 50. ubiegłego wieku udowodniono, że związki wytwarzane przez porosty działają na drobnoustroje, zwłaszcza na bakterie Gram-dodatnie. Dostępność antybiotyków syntetycznych spowodowała, że potencjał antybakteryjny metabolitów wtórnych porostów nie został wykorzystany. Obecnie problemem są antybiotykooporne szczepy drobnoustrojów chorobotwórczych, które nierzadko powodują śmierć pacjentów. Pomimo wielu dostępnych antybiotyków, poszukiwania związków o charakterze leków przeciwbakteryjnych stały się więc znów potrzebne.

W pracy określono aktywność przeciwdrobnoustrojową wyciągów heptanowych/heksanowych, eteru dietylowego, acetonowych, metanolowych sporządzonych z badanych gatunków porostów oraz kwasu (-)-usninowego i kwasu

skwamatowego, wyizolowanych z *C. uncialis*. Wiadomo, że kwas usninowy posiada aktywność przeciwdrobnoustrojową i dotychczas jako jedyny otrzymany z porostów związek był stosowany w wielu krajach jako składnik preparatów o działaniu przeciwbakteryjnym [Agboke i wsp. 2011]. W literaturze nie ma danych na temat przeciwdrobnoustrojowego działania kwasu skwamatowego. Ponadto w pracy po raz pierwszy przedstawiono wyniki badań nad przeciwbakteryjnym działaniem wyciągów z *H. scalaris* i *C. uncialis*. Wyciągi z *H. physodes* i *P. sulcata* (otrzymane z gatunków rosnących poza terytorium Polski) były testowane równoległe z moją pracą [Mitrović i wsp. 2011, Kosanić i wsp. 2012, Ari i wsp. 2012].

Do badań wybrano drobnoustroje należące do grupy bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus*), Gram-ujemnych (*E. coli*) oraz komórki drożdżoidalnego grzyba (*C. albicans*). Aktywność badanych substancji wobec *E. coli* i *C. albicans* została określana tylko w przypadku, gdy odnotowano działanie wobec komórek gronkowca złocistego. Ponadto, w przypadku niezwykle silnie działającego wyciągu z *C. uncialis* do badań wykorzystano również kliniczne, metycylinooporne szczepy *S. ureus* (MRSA) (tabela 63 i 64).

Uzyskane w przeprowadzonych eksperymentach rezultaty wykazały, że badane na wzorcowym szczepie *S. aureus* wyciągi działają przeciwdrobnoustrojowo. Silnie działały wszystkie ekstrakty przygotowane z *C. uncialis* (MIC = 0,5 – 10,0 µg/ml). Zastosowaną w badaniach substancją odniesienia był chloramfenikol, który działał w stężeniu MIC = 5 µg/ml. Spośród czterech różnych ekstraktów z tego gatunku porostu, najsilniej działał wyciąg acetonowy, a jego aktywność wobec badanego szczepu gronkowca złocistego była 10-krotnie wyższa niż chloramfenikolu (MIC = 0,5 µg/ml i 5,0 µg/ml, odpowiednio). Aktywność wyciągu acetonowego była także wyższa niż **kwasu (-)-usninowego** (MIC = 2,5 µg/ml). **Kwas skwamatowy** nie posiadał aktywności przeciwbakteryjnej (MIC = 1250,0 µg/ml). Zachęcające wyniki badań na szczepach wzorcowych sprawiły, że wyciąg acetonowy z *C. uncialis* przebadano także na opornych na metycylinę klinicznych szczepach gronkowca złocistego (ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), izolowanego z różnego typu ran. Otrzymane w tym przypadku wartości MIC wyniosły od 2,5 – 7,5 µg/ml, co stanowi wartość około dziesięciokrotnie wyższą niż w przypadku działania na wzorcowy szczep gronkowca złocistego. Okazało się, że nawet silnie aktywne wobec bakterii Gram-dodatnich wyciągi z *C. uncialis* nie działały na *E. coli* (MIC = 1000,0 µg/ml). Aktywność przeciwgrzybicza wyciągów z *C. uncialis* była niska i dla wyciągów

heptanowego, eteru dietylowego i acetonowego wartość MIC = 750,0 µg/ml (amfoterycyna B MIC = 1,0 µg/ml). Najsilniej na komórki grzyba działał wyciąg metanolowy, dla którego wyznaczone najniższe stężenie hamujące wyniosło 250 µg/ml.

Wyniki badań składu chemicznego wyciągów z *C. uncialis* pokazały, że najsilniej działający przeciwbakteryjnie wyciąg acetonowy z *C. uncialis* zawierał głównie kwas usninowy i kwas skwamatowy (TLC). Wyniki analizy metodą HPLC wykazały, że zawartość kwasu usninowego w badanych wyciągach zmniejszała się wraz ze wzrostem polarności wyciągów i była najwyższa w wyciągu heptanowym (63,25%), niższa w wyciągu eteru dietylowego (43,67%) i acetonowym (28,40%), natomiast w wyciągu metanolowym było go zaledwie 19%. Ponadto, wyniki badań TLC dowiodły (ryciny 16-18), że wyciąg heptanowy nie zawierał kwasu skwamatowego, w odróżnieniu od silniej działających wyciągów eteru dietylowego i acetonowego. Pozwala to przypuszczać, że na aktywność przeciwdrobnoustrojową wyciągu acetonowego z *C. uncialis* może mieć wpływ obecność występujących w nim związków czynnych, a w szczególności kwasu usninowego i kwasu skwamatowego, które obecne są w ekstrakcie w przeważającej ilości lub innych dotąd niezidentyfikowanych związków. Należy również wspomnieć, że w badanym przeciwdrobnoustrojowo wyciągu acetonowym z *C. uncialis*, na wykonanym chromatogramie TLC (ryciny 16-18) zaznaczyła się obecność jeszcze jednego związku o wartości współczynnika  $R_f$  mniejszej niż dwa główne związki. Posługując się danymi literaturowymi [Culberson i wsp. 1969, Huneck i Yoshimura 1999], można wnioskować, że substancją tą jest depsyd – kwas tamnolowy, którego obecność być może wpływa na aktywność wyciągu. Ponadto dane piśmiennictwa wskazują, że możliwe jest współdziałanie pomiędzy kwasem usninowym i związkiem o budowie depsydu polegające na zmianie działania biologicznego [Burlando i wsp. 2009]. W przypadku działania przeciwdrobnoustrojowego, stwierdzenie wzajemnego oddziaływania znajdujących się w wyciągu związków, wymaga przeprowadzenia kolejnych badań, jednak wydaje się, że takie zjawisko jest możliwe.

Uzyskane wyniki potwierdziły wysoką skuteczność wyciągu acetonowego z *C. uncialis* wobec szczepów klinicznych *S. aureus*. Wykorzystanie wyciągu zawierającego 28,4% kwasu usninowego, obniża toksyczność kwasu usninowego, którą udowodniono po stosowaniu do wewnątrz dużych dawek preparatów zawierających kwas usninowy. Biorąc pod uwagę silne działanie wyciągu acetonowego z *C. uncialis* mógłby on stanowić materiał do kolejnych testów, m.in. badających możliwość



stosowania, jako składnika preparatów do użytku zewnętrznego w leczeniu zakażeń bakteryjnych.

Słabsza od *C. uncialis* była aktywność **wyciągów z *H. physodes***. W tym przypadku najsilniej na szczepy Gram-dodatnie *S. aureus* działał wyciąg eteru dietylowego (MIC = 100,0 µg/ml). Znaczną aktywnością charakteryzował się również wyciąg acetonowy (MIC = 250,0 µg/ml). Różnica w działaniu wymienionych ekstraktów spowodowana była prawdopodobnie ich różnym składem chemicznym. Z przeprowadzonych analiz wynika, że aktywne wyciągi zawierały znaczne ilości kwasu fizodowego i jego pochodnych. Sugeruje to, istotne działanie przeciwbakteryjne tych depsydonów. W dostępnej literaturze można znaleźć informacje o przeciwdrobnoustrojowym działaniu acetonowych, etanolowych, metanolowych czy wodnych wyciągów z *H. physodes*. W jednym z opisanych przez Ranković eksperymentów wartość MIC dla wyciągu acetonowego i etanolowego wynosiła MIC = 3,12 mg/ml, natomiast wyciąg wodny był nieaktywny [Ranković i wsp. 2009]. Mitrović i wsp. zbadał wyciąg metanolowy z *H. physodes*. Dla szczepów klinicznych *S. aureus* zbadane MIC wynosiło  $3,91 \times 10^{-2}$  mg/ml, natomiast dla szczepów wzorcowych MIC =  $3,13 \times 10^{-1}$  mg/ml [Mitrović i wsp. 2011], co stanowiło wartość zbliżoną do przedstawionych w pracy. Informacje o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych wyciągu heksanowego i eteru dietylowego z *H. physodes* zostały zaprezentowane w pracy po raz pierwszy. Z uwagi na interesującą aktywność przeciwdrobnoustrojową wyciągów z *H. physodes*, każdy z czterech testowanych ekstraktów poddano badaniom na szczepach Gram-ujemnych *E. coli*, wobec których aktywność wyciągów była kilkukrotnie niższa (dla wyciągu eteru dietylowego i wynosiła MIC = 750,0 µg/ml). Na komórki *C. albicans* najsilniej działały wyciągi heksanowy i acetonowy (MIC = 750,0 µg/ml). Aktywność ta była jednak znacznie niższa niż badanej równocześnie amfoterycyny B (MIC = 1 µg/ml).

Aktywność **wyciągów z *P. sulcata*** na *S. aureus* była bardzo zróżnicowana. Najsilniej działał ekstrakt eteru dietylowego (MIC = 250,0 µg/ml), a odnotowane działanie było 5-krotnie niższe od aktywności chloramfenikolu. Inne ekstrakty działały znacznie słabiej (250,0 – 750,0 µg/ml). Niektóre wyciągi otrzymane z *P. sulcata* (eteru dietylowego, chloroformowy, acetonowy i metanolowy), były już oceniane pod kątem ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej metodą dyfuzyjno-krażkową [Candan i wsp. 2007]. Okazało się, że podobnie jak opisano w niniejszej pracy, najsilniej działał wyciąg eteru dietylowego, jednak różnica w sile działania była mniejsza niż

w opisanym wyżej przypadku. Wyciąg metanolowy z *P. sulcata* badał również Mitrović i wsp. Wyniki wskazywały, że wyciąg był aktywny wobec *S. aureus* MIC =  $3,13 \times 10^{-1}$  mg/ml. Wyciąg metanolowy opisywany w doktoracie działał słabiej (MIC = 750,0 µg/ml) niż badany przez Mitrović i wsp. [Mitrović i wsp. 2011]. Nie była dotychczas znana aktywność wyciągu heksanowego i po raz pierwszy została przedstawiona w niniejszej pracy. Dość znaczną aktywność przeciwgrzybiczą wykazywał wyciąg eteru dietylowego z *P. sulcata* (MIC = 500 µg/ml). Wyciąg ten nie działał na testowane szczepy bakterii Gram-ujemnych.

Nie istnieją w literaturze dane na temat działania przeciwbakteryjnego **wyciągów z *H. scalaris***, a otrzymane wyniki świadczą o jego słabym działaniu antybiotycznym na Gram-dodatnie szczepy wzorcowe *S. aureus* (MIC = 750,0-1000,0 µg/ml).

# ***PODSUMOWANIE I WNIOSKI***

## Badania fitochemiczne

Prace fitochemiczne prowadzono w celu pozyskania wyciągów i związków do badań ich aktywności biologicznej.

- Z badanych gatunków porostów wyodrębniono i zidentyfikowano sześć związków oraz dwa kolejne związki w mieszaninie. Wyizolowane metabolity wtórne to: **depsydy** (kwas lekanorowy z *H. scalaris*, kwas skwamatowy z *C. uncialis*), **depsydony** (kwas fizodowy, kwas fizodalowy z *H. physodes* i kwas salazynowy z *P. sulcata*), **pochodna dibenzofuranu** (kwas(-)-usninowy z *C. uncialis*), a także **mieszanina depsydów** (atranoryna i chloroatranoryna z *H. physodes*).
- Analiza całkowitej zawartości związków o charakterze polifenoli w ekstraktach acetonowych i metanolowych wskazywała na zróżnicowaną ich ilość, wyższą w acetonowych.
- Zawartość kwasu (-)-usninowego w wyciągach z *C. uncialis* była zróżnicowana, zależała od polarności użytego do ekstrakcji odczynnika i była najwyższa w wyciągu heptanowym.
- Stwierdzono, że zawartość kwasu (-)-usninowego w wyciągach przygotowanych taką samą metodą, jednak z surowca pochodzącego z różnych miejsc i zebranego w różnym czasie, może znacznie się różnić pomiędzy sobą.

## Badania aktywności biologicznej

### Aktywność antyoksydacyjna

- Acetonowe wyciągi z badanych porostów wykazywały różny poziom aktywności antyoksydacyjnej.
- **Najsilniejsze działanie** antyoksydacyjne charakteryzowało wyciąg **acetonowy z *H. physodes***, średnie z *H. scalaris*, *P. sulcata*, natomiast niską aktywność przeciwutleniającą posiadał wyciąg z *C. uncialis*.
- Przydatność metody z odczynnikiem FRAP, służącej do określenia całkowitej zdolności redukującej badanej próbki jest ograniczona w przypadku zastosowania jej do badań porostów, co wynika z małej rozpuszczalności metabolitów wtórnych wchodzących w skład badanych wyciągów porostowych w środowisku wodnym o lekko kwaśnym odczynie.

### Aktywność cytotoksyczna

- Wyciągi acetonowe z czterech badanych gatunków wykazywały działanie cytotoksyczne, które różniło się w zależności od gatunku badanego porostu.
- Otrzymane rezultaty wskazują, iż **najbardziej wrażliwą** na działanie wyciągów porostowych była linia komórek **raka wątroby HepG2**, a najmniej linia komórek raka płuc CaLu-1. Komórki raka piersi MCF-7, T47D (estrogenozależne) i MDA-MB-231 (estrogenoniezależne), charakteryzowała średnia wrażliwość na działanie testowanych ekstraktów.
- Spośród badanych grup chemicznych wtórnych metabolitów porostów: wysoce cytotoksyczna była pochodna dibenzofuranu, aktywność cytotoksyczna depsydonów była zróżnicowana (kwas fyzodowy silnie, kwas salazynowy słabo cytotoksyczny), Natomiast najsłabsze działanie charakteryzowało związki o charakterze depsydów (atranoryna, kwas lekanorowy, kwas skwamatowy).
- W grupie depsydonów uwagę zwróciła niezwykle **wysoka aktywność kwasu fyzodowego**, który działał silnie na wszystkie badane linie komórek nowotworowych, natomiast w badanych stężeniach **nie był toksyczny wobec linii nienowotworowej MCF-10A**.
- **Aktywność** obu badanych izomerów optycznych **kwasu usninowego** była wysoka, a na pięć z sześciu linii komórek nowotworowych silniej działał izomer prawoskrętny.
- Wydaje się, że potencjalne wykorzystanie kwasu fyzodowego w terapii nowotworów piersi jest możliwe, gdyż przy wysokiej toksyczności na komórki raka nie wpływał na wzrost komórek nienowotworowych linii MCF-10A.
- Przedstawione wyniki aktywności cytotoksycznej kwasu fyzodowego, o którego właściwościach wiadomo niewiele, stanowią podstawę dla kolejnych badań mających na celu wyjaśnienie jego mechanizmu działania.

### Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

- Badane wyciągi z porostów wykazywały zróżnicowaną aktywność przeciwbakteryjną. **Niezwykłe silnie** spośród badanych gatunków porostów działały ekstrakty sporządzone z *C. uncialis*, słabiej z *H. physodes* i *P. sulcata*. Wyciąg z *H. scalaris* posiadał niską aktywność przeciwbakteryjną.
- Badane wyciągi z porostów posiadały niską aktywność przeciwgrzybiczą wobec wzorcowych szczepów *Candida albicans*.

- Bakterie Gram-dodatnie (wzorcowe i metycylinooporne szczepy *Staphylococcus aureus*) odznaczały się bardzo wysoką wrażliwością na **acetonowy wyciąg** z plechy *C. uncialis*.
- Rezultaty wykonanych badań skłaniają do przeprowadzenia kolejnych prac, w celu ustalenia jakie z obecnych w ekstrakcie związków posiadają działanie przeciwbakteryjne.
- Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że acetonowy wyciąg z *C. uncialis* po przeprowadzeniu dodatkowych eksperymentów, mógłby być potencjalnie stosowany w leczeniu miejscowym zakażeń skóry.

# ***STRESZCZENIE***

**Celem niniejszej pracy** były badania fitochemiczne i ocena aktywności biologicznej czterech gatunków porostów, występujących pospolicie na terenie Polski i nie objętych ochroną przyrody. Wybrane gatunki to: *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., *Parmelia sulcata* Taylor, *Hypocenomyce scalaris* (Ach. ex Lilj.) M. Choisy, *Cladonia uncialis* (L.) Weber ex Wigg.

W części **teoretycznej** pracy zamieszczono informacje na temat budowy anatomicznej i morfologicznej porostów. Opisano również biosyntezę metabolitów porostów. Omówiono działanie biologiczne związków oraz różnych wyciągów otrzymanych z porostów, skupiając się głównie na ich działaniu przeciwdrobnoustrojowym, cytotoksycznym i antyoksydacyjnym. Przedstawiono także charakterystykę botaniczną i chemiczną badanych gatunkach porostów oraz opis dotąd wykrytych właściwości biologicznych wyciągów i wyizolowanych metabolitów wtórnych.

W części **doświadczalnej** pracy przedstawiono sposób przygotowania wyciągów z badanych gatunków porostów. Następnie omówiono metodykę prac fitochemicznych, metody oznaczeń zawartości sumy polifenoli oraz zawartości kwasu (-)-usninowego, a także metody badań aktywności biologicznej (działanie antyoksydacyjne, cytotoksyczne i przeciwdrobnoustrojowe).

**W wyniku prac izolacyjnych** z badanych gatunków porostów wyodrębniono i zidentyfikowano na podstawie wyników chromatografii cienkowarstwowej i rezultatów analiz spektralnych (UV, NMR, MS) sześć związków oraz otrzymano dwa związki w postaci mieszaniny. Były to: **kwas fyzodowy** (15,0 mg), **kwas fyzodalowy** (6,0 mg) a także mieszanina **atranoriny** i **chloroatranoriny** (35,0 mg) z *H. physodes*, **kwas salazynowy** (25,6 mg) z *P. sulcata*, **kwas lekanorowy** (32,2 mg) z *H. scalaris* oraz **kwas skwamatowy** (207,5 mg) i **kwas(-)-usninowy** (284,9 mg) z *C. uncialis*. Związki uzyskane w wyniku prac fitochemicznych były wcześniej izolowane z badanych gatunków porostów, jednak sposób ich pozyskania ustalano doświadczalnie w toku prowadzonych badań i nie był on wcześniej opisywany.

W otrzymanych z badanych gatunków porostów wyciągach acetonowych i metanolowych określono **sumę polifenoli** metodą z odczynnikiem Folin-Ciocalteu. Zawartość związków polifenolowych była wyższa w wyciągach acetonowych niż metanolowych. Najwyższą zawartością polifenoli charakteryzował się wyciąg acetonowy z *H. scalaris*, a najniższą wyciąg metanolowy z *C. uncialis* (29,94% i 3,07%, odpowiednio). Zawartość związków polifenolowych określono i opisano po



raz pierwszy dla ekstraktów przygotowanych z gatunków: *H. scalaris* i *C. uncialis*, natomiast dla wyciągów przygotowanych z *H. physodes* i *P. sulcata* badanie to zostało przeprowadzone po raz pierwszy dla wyciągów przygotowanych z plech rosnących na terenie Polski. Metodą HPLC oceniono **zawartość kwasu (-)-usninowego** dla wyciągów badanych pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Otrzymane wyniki wskazywały, że najwięcej pochodnej dibenzofuranu zawierał wyciąg heptanowy (63,25%), następnie wyciąg eteru dietylowego (43,67%) i acetonowy (28,40%), a najmniej wyciąg metanolowy (19,00%). Badaniom poddano również ekstrakt acetonowy otrzymany z surowca zebranego z dwóch stanowisk i w różnej porze roku. Okazało się, że przygotowane w tych samych warunkach wyciągi różnią się zawartością pochodnej dibenzofuranu o 13,36%.

W pracy przedstawiono również badania **aktywności antyoksydacyjnej** otrzymanych z porostów wyciągów acetonowych. Dla wyciągów acetonowych z *H. physodes*, *P. sulcata*, *H. scalaris* i *C. uncialis* określono zdolność zmiatania wolnych rodników (metodą z odczynnikiem DPPH) oraz całkowitą zdolność redukującą (metoda z odczynnikiem FRAP). Otrzymane wyniki pokazały, że najsilniej spośród badanych substancji działał wyciąg z *H. physodes*, a najslabiej wyciąg z *C. uncialis*. Zdolność zmiatania rodnika DPPH<sup>•</sup> wyciągów pozyskanych z *H. scalaris* i *C. uncialis* określono po raz pierwszy. Badanie całkowitej zdolności redukującej wyciągów przygotowanych z porostów nigdy wcześniej nie było wykonywane metodą z odczynnikiem FRAP. Analiza zależności pomiędzy stężeniem polifenoli w badanych wyciągach i ich aktywnością antyoksydacyjną (DPPH) wykazała, że pomiędzy badanymi parametrami istnieje stosunkowo wysoka korelacja. Wyraźna zależność liniowa istniała także między aktywnością antyoksydacyjną oznaczoną przy pomocy obu stosowanych metod.

W pracy przedstawiono również wyniki badań **aktywności cytotoksycznej wyciągów acetonowych** z *H. physodes*, *P. sulcata*, *H. scalaris*, *C. uncialis* i **wybranych metabolitów wtórnych** występujących w wyciągach z badanych porostów (atranoryna, kwas lekanorowy, kwas skwamatowy, kwas fizodowy, kwas salazynowy, kwas (-)-usninowy) oraz dodatkowo kwasu (+)-usninowego. Badania prowadzono na **siedmiu liniach komórek**, w tym liniach nowotworów: piersi (MDA-MB-231, MCF-7, T47D), prostaty (LnCaP), płuc (CaLu-1), wątroby (HepG2) oraz jednej **nienowotworowej** linii komórek gruczołu piersiowego (MCF-10A). Eksperyment prowadzono w dwóch częściach. Najpierw oceniono aktywność badanych

wyciągów i związków w jednym, wybranym stężeniu, następnie najbardziej aktywnych kwasu fizodowego, acetonowego wyciągu z *H. physodes* oraz dla kwasów usninowych zakres badanych stężeń rozszerzono. Otrzymane rezultaty wskazują, że wśród badanych związków najsilniej na testowane linie komórkowe działał kwas (+)- i (-)-usninowy. Izomer prawoskrętny wykazywał wyższą aktywność w porównaniu z drugim enancjomerem. Niezwykle silnie działał także wyizolowany z *H. physodes* kwas fizodowy. Ponadto kwas fizodowy nie był aktywny wobec nienowotworowych komórek raka piersi (MCF-10A) ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ), podczas gdy kwasy usninowe były cytotoksyczne. Znacznie słabiej na badane komórki działały związki o budowie depsydów (atranoryna, kwas lekanorowy, kwas skwamatowy). Aktywność cytotoksyczna kwasu salazynowego była różna w zależności od testowanych komórek w tym najwyższa wobec komórek raka piersi (T47D; umożliwiając przeżycie około 66% komórek). Wśród badanych wyciągów wykazana w badaniach aktywność na komórki nowotworowe była zróżnicowana. Najwyższą aktywność na komórki nowotworowe w testowanym stężeniu, wykazywały wyciągi acetonowe z *H. physodes* i *C. uncialis*. Słabiej działały wyciągi z *P. sulcata* i *H. scalaris*. Aktywność cytotoksyczna na badanych liniach komórek nowotworowych dla wyciągów acetonowych otrzymanych ze analizowanych gatunków porostów (*H. physodes*, *H. scalaris*, *C. uncialis*, *P. sulcata*), a także kwasu skwamatowego, kwasu fizodowego i kwasu salazynowego została oceniona po raz pierwszy. Natomiast, spośród zastosowanych w naszych eksperymentach linii komórkowych, atranoryna była dotąd przebadana na komórkach MCF-7 i T47D, podczas gdy kwas lekanorowy na MCF-7.

Oznaczono także **aktywność przeciwdrobnoustrojową** wyciągów: heptanowego (*C. uncialis*), heksanowych (*H. physodes*, *P. sulcata*), eteru dietylowego (*H. physodes*, *P. sulcata*, *C. uncialis*), acetonowych (*H. physodes*, *P. sulcata*, *H. scalaris*, *C. uncialis*), metanolowych (*H. physodes*, *P. sulcata*, *H. scalaris*, *C. uncialis*) oraz związków: kwasu (-)-usninowego oraz kwasu skwamatowego, wobec szczepów wzorcowych *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Candida albicans*, natomiast w przypadku wyciągów uzyskanych z *C. uncialis* również na kliniczne szczepy *S. aureus*. Otrzymane rezultaty wskazywały na niezwykle wysoką aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich wyciągów z *C. uncialis*. **Wyciąg acetonowy z *C. uncialis*** działał silnie na wzorcowe (MIC = 0,5  $\mu g/ml$ ; chloramfenikol MIC = 5  $\mu g/ml$ ) jak również na metycylinooporne kliniczne szczepy gronkowca złocistego (MIC od 2,5 – 7,5  $\mu g/ml$ ). Pozostałe wyciągi działały słabiej na badane wzorcowe szczepy

drobnoustrojów (MIC od 250 do 1000 µg/ml). Aktywność przeciwdrobnoustrojowa wyciągów z *C. uncialis* zarówno na szczepach wzorcowych jak i klinicznych została przedstawiona po raz pierwszy. Aktywność wyciągów heksanowych i eteru dietylowego z *H. physodes* i *P. sulcata* oraz wszystkich badanych ekstraktów z *H. scalaris* nie była dotąd publikowana.

# ***SUMMARY***

The aim of this study was to investigate the phytochemical composition and biological activities of four lichen species, commonly occurring in Poland. Selected species were *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., *Parmelia sulcata* Taylor, *Hypocenomyce scalaris* (Ach. ex Lilja.) M. Choisy, *Cladonia uncialis* (L.) Weber ex Wigg.

The theoretical part of work contain information about anatomy and morphology of lichens. It also describes the biosynthesis of secondary metabolites, the biological activity of individual chemical compounds as well as various extracts derived from lichens, focusing mainly on their antimicrobial, cytotoxic and antioxidant properties. Moreover, botanical and chemical characteristics of the studied species and description of so far discovered biological activities of lichen extracts or isolated secondary metabolites is presented.

The experimental part of work describes the preparation of extracts from tested lichens. The methodology of phytochemical work as well as methods used for determination of total polyphenol content and (-)-usnic acid content is presented. Furthermore, the methods used to determine the biological activities (antioxidant, cytotoxic and antimicrobial) are described.

Six lichen substances and two compounds in the mixture were isolated as a result of the experimental work. These chemical constituents were identified with the thin layer chromatography and spectral analysis (UV, NMR, MS). Identified compounds were: physodic acid (15.0 mg), physodalic acid (6.0 mg) and the mixture of atranorin and chloroatranorin (35.0 mg) from *H. physodes*, salazinic acid (25.6 mg) from *P. sulcata*, lecanoric acid (32.2 mg) from *H. scalaris*, squamatic acid (207.5 mg) and (-)-usnic acid (284.9 mg) from *C. uncialis*. All of the above mentioned metabolites have already been isolated from lichen species, but the way in which they were obtained was different in comparison with the described method, experimentally determined in the course of this research.

Total phenolic content in the methanolic and acetone extracts of tested lichens were determined according to the method with Folin-Ciocalteu reagent. The content of polyphenolic compounds was higher in acetone than methanol extracts and the highest content of polyphenols characterized the acetone extract of *H. scalaris*, while the lowest content of polyphenols was determined for methanol extract of *C. uncialis* (29.94% and 3.07%, respectively). For the first time the amount of polyphenolic compounds for the *H. scalaris* and *C. uncialis* extracts was examined. Furthermore, the content of

polyphenolic compounds for *H. physodes* and *P. sulcata* extracts prepared from specimens growing in Poland was determined.

The paper presents the results of antioxidant activity tests for lichen extracts derived from acetone. For the acetone extracts of *H. physodes*, *P. sulcata*, *H. scalaris* and *C. uncialis* the ability to scavenge free radicals (with DPPH reagent) and the total reducing capacity (method with FRAP reagent) were determined. The results showed that the most active substance was *H. physodes* extract while extract of *C. uncialis* was the least active. For the first time the ability to scavenge DPPH<sup>•</sup> by acetone extracts obtained from *H. scalaris* and *C. uncialis* was determined. Examination of the total reducing capacity of extracts prepared from the lichen has never been carried out by the method with FRAP reagent. An analysis of the results showed that there is a relatively high linear correlation between the content of polyphenols in the tested extracts and their antioxidant activity (DPPH). A linear correlation is observed for both methods.

The paper presents the results of analysis of the cytotoxic activity of extracts of *H. physodes*, *P. sulcata*, *H. scalaris*, *C. uncialis* and selected secondary metabolites occurring in extracts from examined lichen (atranorin, lecanoric acid, squamatic acid, physodic acid, salazinic acid, (-)-usnic acid) and also (+)-usnic acid). Research was carried out on 7 tumor cell lines including lines of: breast cancer (MDA-MB-231, MCF-7, T47D), prostate cancer (LnCaP), lung cancer (Calu-1), liver cancer (HepG2) and one non-cancerous breast cell line (MCF-10A). The experiment was conducted in two parts. At first the activity of extracts and compounds in one chosen concentration was examined, then the most active - physodic acid, acetone extract of *H. physodes* and usnic acids were examined at extended range of concentrations. Obtained results indicate that the most active compounds were (+)-usnic acid and (-)-usnic acid. Dextrorotatory isomer exhibited higher activity in comparison with the second one enantiomer. Physodic acid isolated from *H. physodes* was also extremely active compound. Furthermore physodic acid was not active against non-malignant breast cancer cells (MCF-10A) (IC<sub>50</sub> > 100 μM), while both usnic acids were cytotoxic.

Much weaker activity against the tested cells exhibited depsides (atranorin, lecanoric acid, squamatic acid (+)-usnic acid). Cytotoxic activity of salazinic acid varied depending on the tested cells, while the highest was against the breast cancer cells (T47D, allowing survival of approximately 66% of the cells). Activity on tumor cells was different for the tested extracts. The highest activity against tumor cells under the tested concentration showed the acetone extracts from *H. physodes* and *C. uncialis*. Less

active were *P. sulcata* and *H. scalaris* extracts. Cytotoxic activity on tumor cell lines for acetone extracts obtained from all examined lichen species (*H. physodes*, *H. scalaris*, *C. uncialis*, *P. sulcata*) as well as for squamatic, physodic and salazinic acids was evaluated for the first time, while atranorin has already been tested on MCF-7 and T47D and lecanoric acid on MCF-7.

The antimicrobial activity was determined for selected extracts : heptan extracts (*C. uncialis*), hexan extracts (*H. physodes*, *P. sulcata*), ether diethyl extracts (*H. physodes*, *P. sulcata*, *C. uncialis*), acetone extracts (*H. physodes*, *P. sulcata*, *H. scalaris*, *C. uncialis*), methanol extracts (*H. physodes*, *P. sulcata*, *H. scalaris*, *C. uncialis*) as well as for the individual compounds: (-)-usnic acid and squamatic acid against standard strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. In addition, for *C. uncialis* extracts antimicrobial tests were conducted on clinical *S. aureus* strains. The results showed an extremely high activity extracts from *C. uncialis* against Gram-positive bacteria. The acetone extract of *C. uncialis* inhibited strongly the growth of standard (MIC = 0.5 mg/ml, chloramphenicol MIC = 5 mg/ml) clinical strains of methicillin-resistant *S. aureus* (MIC of 2.5 - 7.5 mg/ml). Other extracts were less active against the reference strains of tested microorganisms (MIC of 250 to 1000 µg/ml). The antimicrobial activity of *C. uncialis* extracts against both clinical and standard strains is presented for the first time. The activity of hexan and diethyl ether extracts of *H. physodes* and *P. sulcata* extracts as well as for all tested extracts of *H. scalaris* haven't been published so far.

# ***SPIS TABEL I RYCIN***



## Spis tabel

<b>Tabela 1.</b> Przygotowywanie wyciągów do badań fitochemicznych.....	94
<b>Tabela 2.</b> Przygotowywanie wyciągów do badań biologicznych .....	96
<b>Tabela 3.</b> Otrzymywanie metodą chromatografii kolumnowej związku Hp_1 (kwas fizodowy) .....	99
<b>Tabela 4.</b> Otrzymywanie metodą PTLC związku Hp_2 (kwas fizodalowy) .....	100
<b>Tabela 5.</b> Otrzymywanie metodą krystalizacji związku Ps_1 (kwas salazynowy) .....	101
<b>Tabela 6.</b> Otrzymywanie metodą PTLC związku Hs_1 (kwas lekanorowy) .....	102
<b>Tabela 7.</b> Otrzymywanie metodą krystalizacji związku Hs_1 (kwas lekanorowy).....	102
<b>Tabela 8.</b> Stężenia wyciągów i kwasu galusowego przygotowane do oznaczenia zawartości sumy polifenoli metodą z odczynnikiem Folin-Ciocalteu .....	106
<b>Tabela 9.</b> Stężenia wyciągów i substancji wzorcowych przygotowane do badań aktywności antyoksydacyjnej metodą z odczynnikiem DPPH .....	108
<b>Tabela 10.</b> Stężenie wyciągów i witaminy C do badań aktywności antyoksydacyjnej metodą z odczynnikiem FRAP .....	108
<b>Tabela 11.</b> Wyciągi, związki oraz linie komórkowe do badań aktywności cytotoksycznej.....	113
<b>Tabela 12.</b> Wyciągi, związki, substancje wzorcowe i rodzaje drobnoustrojów do badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej.....	117
<b>Tabela 13.</b> Masa uzyskanych wyciągów do badań fitochemicznych i wydajność procesu ekstrakcji ....	119
<b>Tabela 14.</b> Masa uzyskanych wyciągów do badań aktywności biologicznej i wydajność procesu ekstrakcji.....	119
<b>Tabela 15.</b> Masa wyizolowanego związku Hp_1 (kwas fizodowy) i wartość współczynnika $R_f$ .....	122
<b>Tabela 16.</b> Masa wyizolowanego związku Hp_2 (kwas fizodalowy) i wartość współczynnika $R_f$ .....	122
<b>Tabela 17.</b> Masa otrzymanej mieszaniny Hp_3+Hp_4 (atranoryna i chloroatranoryna) i wartość współczynnika $R_f$ .....	123
<b>Tabela 18.</b> Masa wyizolowanego związku Ps_1 (kwas salazynowy) i wartość współczynnika $R_f$ .....	124
<b>Tabela 19.</b> Masa wyizolowanego związku Hs_1 (kwas lekanorowy) metodą PTLC i wartość współczynnika $R_f$ .....	125
<b>Tabela 20.</b> Masa wyizolowanego związku Hs_1 (kwas lekanorowy) metodą krystalizacji i wartość współczynnika $R_f$ .....	125
<b>Tabela 21.</b> Masa wyizolowanego związku Cu_1 (kwas usninowy) i Cu_2 (kwas skwamatowy) metodą krystalizacji i wartość współczynnika $R_f$ .....	126
<b>Tabela 22.</b> $^1\text{H}$ NMR (400 MHz) związku Hp_1 (kwas fizodowy); aceton- $d_6$ .....	127
<b>Tabela 23.</b> $^{13}\text{C}$ NMR (100 MHz) i $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz) związku Hp_1 (kwas fizodowy); aceton- $d_6$ .....	130
<b>Tabela 24.</b> ESI-MS związku Hp_1 (kwas fizodowy).....	134
<b>Tabela 25.</b> $^1\text{H}$ NMR (400 MHz) związku Hp_2 (kwas fizodalowy); DMSO- $d_6$ + aceton- $d_6$ .....	135
<b>Tabela 26.</b> $^{13}\text{C}$ NMR (100 MHz) i $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz) związku Hp_2 (kwas fizodalowy); DMSO- $d_6$ + aceton- $d_6$ .....	136
<b>Tabela 27.</b> ESI-MS związku Hp_2 (kwas fizodalowy).....	138
<b>Tabela 28.</b> $^1\text{H}$ NMR (400 MHz) mieszaniny związków Hp_3 i Hp_4 (atranoryna i chloroatranoryna); chloroform- $d$ .....	139
<b>Tabela 29.</b> $^{13}\text{C}$ NMR (100 MHz) mieszaniny związków Hp_3 i Hp_4 (atranoryna i chloroatranoryna); chloroform- $d$ .....	140
<b>Tabela 30.</b> ESI-MS Hp_3+ Hp_4 (atranoryna i chloroatranoryna).....	141
<b>Tabela 31.</b> $^1\text{H}$ NMR (400 MHz) związku Ps_1 (kwas salazynowy); aceton- $d_6$ .....	142
<b>Tabela 32.</b> $^{13}\text{C}$ NMR (100 MHz) i $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz) związku Ps_1 (kwas salazynowy); aceton- $d_6$ + chloroform- $d$ .....	143
<b>Tabela 33.</b> ESI-MS związku Ps_1 (kwas salazynowy) .....	146
<b>Tabela 34.</b> $^1\text{H}$ NMR (400 MHz) związku Hs_1 (kwas lekanorowy); aceton- $d_6$ .....	147
<b>Tabela 35.</b> $^{13}\text{C}$ NMR (100 MHz) związku Hs_1 (kwas lekanorowy); aceton- $d_6$ .....	149
<b>Tabela 36.</b> ESI-MS związku Hs_1 (kwas lekanorowy) .....	151
<b>Tabela 37.</b> $^1\text{H}$ NMR (400 MHz) związku Cu_1 (kwas (-)-usninowy); chloroform- $d$ .....	152
<b>Tabela 38.</b> $^{13}\text{C}$ NMR (100 MHz) i $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz) związku Cu_1 (kwas (-)-usninowy); chloroform- $d$ .....	154
<b>Tabela 39.</b> ESI-MS związku Cu_1 (kwas (-)-usninowy) .....	157
<b>Tabela 40.</b> Skręcalność optyczna związku Cu_1 (kwas (-)-usninowy).....	157
<b>Tabela 41.</b> $^1\text{H}$ NMR (400 MHz) związku Cu_2 (kwas skwamatowy); DMSO- $d_6$ .....	158
<b>Tabela 42.</b> $^{13}\text{C}$ NMR (100 MHz) i $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz) związku Cu_2 (kwas skwamatowy); DMSO- $d_6$ .....	161

<b>Tabela 43.</b> ESI-MS związku Cu <sub>2</sub> (kwas skwamatowy).....	164
<b>Tabela 44.</b> Wartości absorpcji dla krzywej kalibracyjnej roztworu kwasu galusowego i wyniki analizy statystycznej.....	165
<b>Tabela 45.</b> Zawartość polifenoli [%] w wyciągach acetonowych i metanolowych z badanych porostów .....	166
<b>Tabela 46.</b> Zawartość polifenoli w wyciągach: acetonowym a) i metanolowym b), z <i>H. physodes</i> w przeliczeniu na kwas galusowy [mg GAE/g wyciągu] .....	166
<b>Tabela 47.</b> Zawartość polifenoli w wyciągach: acetonowym a) i metanolowym b), z <i>P. sulcata</i> w przeliczeniu na kwas galusowy [mg GAE/g wyciągu] .....	167
<b>Tabela 48.</b> Zawartość polifenoli w wyciągach: acetonowym a) i metanolowym b), z <i>H. scalaris</i> w przeliczeniu na kwas galusowy [mg GAE/g wyciągu] .....	167
<b>Tabela 49.</b> Zawartość polifenoli w wyciągach: acetonowym a) i metanolowym b), z <i>C. uncialis</i> w przeliczeniu na kwas galusowy [mg GAE/g wyciągu] .....	168
<b>Tabela 50.</b> Wyniki analizy HPLC dla krzywej kalibracyjnej kwasu (-)-usninowego .....	169
<b>Tabela 51.</b> Wyniki analizy zawartości kwasu (-)-usninowego w wyciągach z <i>C. uncialis</i> .....	170
<b>Tabela 52.</b> Aktywność antyoksydacyjna witaminy C (metoda z DPPH) .....	175
<b>Tabela 53.</b> Aktywność antyoksydacyjna BHA (metoda z DPPH) .....	176
<b>Tabela 54.</b> Aktywność antyoksydacyjna wyciągu acetonowego z <i>H. physodes</i> (metoda z DPPH) i stężenie polifenoli w próbie badanej.....	177
<b>Tabela 55.</b> Aktywność antyoksydacyjna wyciągu acetonowego z <i>P. sulcata</i> (metoda z DPPH) i stężenie polifenoli w próbie badanej .....	178
<b>Tabela 56.</b> Aktywność antyoksydacyjna wyciągu acetonowego z <i>H. scalaris</i> (metoda z DPPH) i stężenie polifenoli w próbie badanej .....	179
<b>Tabela 57.</b> Aktywność antyoksydacyjna wyciągu acetonowego z <i>C. uncialis</i> (metoda z DPPH) i stężenie polifenoli w próbie badanej .....	180
<b>Tabela 58.</b> Właściwości redukujące witaminy C (metoda z odczynnikiem FRAP).....	181
<b>Tabela 59.</b> Właściwości redukujące wyciągów acetonowych z porostów (metoda z odczynnikiem FRAP) .....	182
<b>Tabela 60.</b> Właściwości redukujące wyciągu acetonowego z <i>H. physodes</i> (metoda z odczynnikiem FRAP).....	183
<b>Tabela 61.</b> Aktywność cytotoksyczna kwasu (+)- i (-)-usninowego (test MTT) oraz kwasu fizodowego (test MTT, NRU, CV), na komórki nowotworowe raka piersi i linię komórek nienowotworowych nabłonka gruczołu piersiowego (±S) .....	193
<b>Tabela 62.</b> Aktywność cytotoksyczna kwasu (+)- i (-)-usninowego oraz wyciągu acetonowego z <i>C. uncialis</i> z uwzględnieniem zawartości kwasu (-)-usninowego w badanym wyciągu (±S) .....	193
<b>Tabela 63.</b> Minimalne stężenie hamujące (MIC) wyciągów z badanych porostów na szczepy wzorcowe drobnoustrojów .....	194
<b>Tabela 64.</b> Minimalne stężenie hamujące (MIC) wyciągu acetonowego z <i>C. uncialis</i> na metycylinooporne szczepy <i>Staphylococcus aureus</i> .....	195
<b>Tabela 65.</b> Masy otrzymanych związków z badanych gatunków porostów.....	200

## Spis rycin

<b>Rycina 1.</b> Budowa owocnika typu perytecjum i apotecjum [Podbielkowska 1995, Lipnicki i Wójciak 1995].	17
<b>Rycina 2.</b> Przekrój przez plechę z soraliom [Wójciak 2007].	18
<b>Rycina 3.</b> Przekrój przez plechę heteromeryczną z izydiami [Wójciak 2007].	18
<b>Rycina 4.</b> Biosynteza kwasu usninowego [Ingólfssdóttir 2002].	21
<b>Rycina 5.</b> Prawdopodobne drogi biosyntezy prowadzące do powstania większości grup substancji porostowych [Nash 2008].	23
<b>Rycina 6.</b> Plecha <i>Hypogymnia physodes</i> .	49
<b>Rycina 7.</b> Plecha <i>Parmelia sulcata</i> .	51
<b>Rycina 8.</b> Plecha <i>Hypocenomyce scalaris</i> .	52
<b>Rycina 9.</b> Plecha <i>Cladonia uncialis</i> .	53
<b>Rycina 10.</b> Wzory związków wyizolowanych z badanych gatunkach porostów.	54
<b>Rycina 11a.</b> Schemat wykonywanych badań wchodzących w zakres pracy doktorskiej.	87
<b>Rycina 11b.</b> Schemat wykonywanych badań wchodzących w zakres pracy doktorskiej.	88
<b>Rycina 12.</b> Chromatogram frakcji zawierających związek Hp_1 (kwas fizodowy) zebranych w procesie izolacji z kolumny chromatograficznej.	99
<b>Rycina 13.</b> Chromatogram do izolacji metodą PTLC związku Hs_1 (kwas lekanorowy).	102
<b>Rycina 14.</b> Przebieg reakcji DPPH z substancją o charakterze antyoksydanta (RH).	109
<b>Rycina 15.</b> Przebieg reakcji redukcji MTT do formazanu.	114
<b>Rycina 16.</b> Chromatogram (TLC; faza F <sub>1</sub> ) wyciągów z: <i>H. physodes</i> , <i>P. sulcata</i> , <i>H. scalaris</i> , <i>C. uncialis</i> , otrzymanych do badań biologicznych w świetle UV <sub>254</sub> .	120
<b>Rycina 17.</b> Chromatogram (TLC; faza F <sub>3</sub> ) wyciągów z: <i>H. physodes</i> , <i>P. sulcata</i> , <i>H. scalaris</i> , <i>C. uncialis</i> , otrzymanych do badań biologicznych w świetle: a) UV <sub>254</sub> , b) dziennym, po wywołaniu ANS.	120
<b>Rycina 18.</b> Chromatogram (TLC; faza F <sub>2</sub> ) wyciągów z: <i>H. physodes</i> , <i>P. sulcata</i> , <i>H. scalaris</i> , <i>C. uncialis</i> , otrzymanych do badań biologicznych w świetle: a) UV <sub>254</sub> , b) dziennym, po wywołaniu ANS.	121
<b>Rycina 19.</b> Chromatogram (TLC; faza F <sub>4</sub> ) wyciągów z: <i>H. physodes</i> , <i>P. sulcata</i> , <i>H. scalaris</i> , <i>C. uncialis</i> , otrzymanych do badań biologicznych w świetle: a) UV <sub>254</sub> , b) dziennym, po wywołaniu ANS.	121
<b>Rycina 20.</b> Chromatogramy (TLC) mieszaniny atranoryny i chloroatranoryny w świetle: a) UV <sub>254</sub> , b) dziennym, po wywołaniu ANS.	123
<b>Rycina 21.</b> Kwas salazynowy: a) kryształy; b) chromatogram (TLC) po wywołaniu ANS (VIS).	124
<b>Rycina 22.</b> Chromatogram (TLC) kwasu lekanorowego widziany w świetle dziennym	125
<b>Rycina 23.</b> Widmo <sup>1</sup> H NMR związku Hp_1 (kwas fizodowy) [a].	127
<b>Rycina 24.</b> Widmo <sup>1</sup> H NMR związku Hp_1 (kwas fizodowy) [b].	128
<b>Rycina 25.</b> Widmo <sup>1</sup> H NMR związku Hp_1 (kwas fizodowy) [c].	128
<b>Rycina 26.</b> Widmo <sup>1</sup> H NMR związku Hp_1 (kwas fizodowy) [d].	129
<b>Rycina 27.</b> Widmo <sup>13</sup> C NMR związku Hp_1 (kwas fizodowy) [a].	130
<b>Rycina 28.</b> Widmo <sup>13</sup> C NMR związku Hp_1 (kwas fizodowy) [b].	131
<b>Rycina 29.</b> Widmo <sup>13</sup> C NMR związku Hp_1 (kwas fizodowy) [c].	131
<b>Rycina 30.</b> Widmo <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC związku Hp_1 (kwas fizodowy) [a].	132
<b>Rycina 31.</b> Widmo <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC związku Hp_1 (kwas fizodowy) [b].	132
<b>Rycina 32.</b> Widmo w nadfiolecie związku Hp_1 (kwas fizodowy).	133
<b>Rycina 33.</b> Widmo ESI-MS związku Hp_1 (kwas fizodowy).	134
<b>Rycina 34.</b> Widmo <sup>1</sup> H NMR związku Hp_2 (kwas fizodalowy).	135
<b>Rycina 35.</b> Widmo <sup>13</sup> C NMR związku Hp_2 (kwas fizodalowy).	136
<b>Rycina 36.</b> Widmo <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC związku Hp_2 (kwas fizodalowy).	137
<b>Rycina 37.</b> Widmo w nadfiolecie związku Hp_2 (kwas fizodalowy).	137
<b>Rycina 38.</b> Widmo ESI-MS związku Hp_2 (kwas fizodalowy).	138
<b>Rycina 39.</b> Widmo <sup>1</sup> H NMR mieszaniny Hp_3+Hp_4 (atranoryna i chloroatranoryna).	139
<b>Rycina 40.</b> Widmo <sup>13</sup> C NMR mieszaniny związków Hp_3+Hp_4 (atranoryna i chloroatranoryna).	140
<b>Rycina 41.</b> Widmo ESI-MS mieszaniny związków Hp_3+Hp_4 (atranoryna i chloroatranoryna).	141
<b>Rycina 42.</b> Widmo <sup>1</sup> H NMR związku Ps_1 (kwas salazynowy).	142
<b>Rycina 43.</b> Widmo <sup>13</sup> C NMR związku Ps_1 (kwas salazynowy) [a].	143
<b>Rycina 44.</b> Widmo <sup>13</sup> C NMR związku Ps_1 (kwas salazynowy) [b].	144
<b>Rycina 45.</b> Widmo <sup>13</sup> C NMR związku Ps_1 (kwas salazynowy) [c].	144
<b>Rycina 46.</b> Widmo <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC związku Ps_1 (kwas salazynowy).	145
<b>Rycina 47.</b> Widmo w nadfiolecie związku Ps_1 (kwas salazynowy).	145
<b>Rycina 48.</b> Widmo ESI-MS związku Ps_1 (kwas salazynowy).	146
<b>Rycina 49.</b> Widmo <sup>1</sup> H NMR związku Hs_1 (kwas lekanorowy) [a].	147

<b>Rycina 50.</b> Widmo $^1\text{H}$ NMR związku Hs_1 (kwas lekanorowy) [b].....	148
<b>Rycina 51.</b> Widmo $^{13}\text{C}$ NMR związku Hs_1 (kwas lekanorowy).....	149
<b>Rycina 52.</b> Widmo w nadfiolecie związku Hs_1 (kwas lekanorowy).....	150
<b>Rycina 53.</b> Widmo ESI-MS związku Hs_1 (kwas lekanorowy).....	151
<b>Rycina 54.</b> Widmo $^1\text{H}$ NMR związku Cu_1 (kwas (-)-usninowy) [a].....	152
<b>Rycina 55.</b> Widmo $^1\text{H}$ NMR związku Cu_1 (kwas (-)-usninowy) [b].....	153
<b>Rycina 56.</b> Widmo $^{13}\text{C}$ NMR związku Cu_1 (kwas (-)-usninowy).....	154
<b>Rycina 57.</b> Widmo $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC NMR związku Cu_1 (kwas (-)-usninowy) [a].....	155
<b>Rycina 58.</b> Widmo $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC NMR związku Cu_1 (kwas (-)-usninowy) [b].....	155
<b>Rycina 59.</b> Widmo $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC związku Cu_1 (kwas (-)-usninowy) [c].....	156
<b>Rycina 60.</b> Widmo w nadfiolecie związku Cu_1 (kwas (-)-usninowy).....	156
<b>Rycina 61.</b> Widmo ESI-MS związku Cu_1 (kwas (-)-usninowy).....	157
<b>Rycina 62.</b> Widmo $^1\text{H}$ NMR związku Cu_2 (kwas skwamatowy) [a].....	158
<b>Rycina 63.</b> Widmo $^1\text{H}$ NMR związku Cu_2 (kwas skwamatowy) [b].....	159
<b>Rycina 64.</b> Widmo $^1\text{H}$ NMR związku Cu_2 (kwas skwamatowy) [c].....	159
<b>Rycina 65.</b> Widmo $^1\text{H}$ NMR związku Cu_2 (kwas skwamatowy) [d].....	160
<b>Rycina 66.</b> Widmo $^{13}\text{C}$ NMR związku Cu_2 (kwas skwamatowy) [a].....	161
<b>Rycina 67.</b> Widmo $^{13}\text{C}$ NMR związku Cu_2 (kwas skwamatowy) [b].....	162
<b>Rycina 68.</b> Widmo $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC związku Cu_2 (kwas skwamatowy).....	162
<b>Rycina 69.</b> Widmo w nadfiolecie związku Cu_2 (kwas skwamatowy).....	163
<b>Rycina 70.</b> Widmo ESI-MS związku Cu_2 (kwas skwamatowy).....	164
<b>Rycina 71.</b> Krzywa kalibracyjna dla roztworu wzorcowego kwasu galusowego.....	165
<b>Rycina 72.</b> Krzywa kalibracyjna dla roztworu wzorcowego kwasu (-)-usninowego.....	169
<b>Rycina 73.</b> Zawartość kwasu (-)-usninowego w wyciągach z <i>C. uncialis</i> ( $\pm$ S).....	170
<b>Rycina 74.</b> Chromatogram HPLC kwasu (-)-usninowego.....	171
<b>Rycina 75.</b> Chromatogram HPLC wyciągu heptanowego z <i>C. uncialis</i> .....	171
<b>Rycina 76.</b> Chromatogram HPLC wyciągu eteru dietylowego z <i>C. uncialis</i> .....	172
<b>Rycina 77.</b> Chromatogram HPLC wyciągu acetonowego z <i>C. uncialis</i> .....	172
<b>Rycina 78.</b> Chromatogram HPLC wyciągu metanolowego z <i>C. uncialis</i> .....	173
<b>Rycina 79.</b> Aktywność antyoksydacyjna witaminy C.....	175
<b>Rycina 80.</b> Aktywność antyoksydacyjna BHA ( $\pm$ S).....	176
<b>Rycina 81.</b> Aktywność antyoksydacyjna wyciągu acetonowego z <i>H. physodes</i> ( $\pm$ S).....	177
<b>Rycina 82.</b> Aktywność antyoksydacyjna wyciągu acetonowego z <i>P. sulcata</i> ( $\pm$ S).....	178
<b>Rycina 83.</b> Aktywność antyoksydacyjna wyciągu acetonowego z <i>H. scalaris</i> ( $\pm$ S).....	179
<b>Rycina 84.</b> Aktywność antyoksydacyjna wyciągu acetonowego z <i>C. uncialis</i> ( $\pm$ S).....	180
<b>Rycina 85.</b> Właściwości redukujące witaminy C (metoda z odczynnikami FRAP).....	181
<b>Rycina 86.</b> Właściwości redukujące wyciągu acetonowego z <i>H. physodes</i> (FRAP) ( $\pm$ S).....	183
<b>Rycina 87a.</b> Zawartość związków polifenolowych (mg GAE/g wyciągu) w wyciągach acetonowych z badanych gatunków porostów oraz aktywność antyoksydacyjna wyciągów i substancji wzorcowych (IC <sub>50</sub> ) (DPPH).....	184
<b>Rycina 87b.</b> Zależność aktywności przeciwutleniającej (DPPH) wyciągów acetonowych z porostów: <i>H. physodes</i> , <i>P. sulcata</i> , <i>H. scalaris</i> , <i>C. uncialis</i> od stężenia związków polifenolowych w badanych próbach.....	184
<b>Rycina 88.</b> Porównanie aktywności antyoksydacyjnej wyciągów acetonowych z: <i>C. uncialis</i> , <i>P. sulcata</i> , <i>H. scalaris</i> i <i>H. physodes</i> (50 $\mu\text{g/ml}$ ), badanej metodą DPPH i FRAP, wyrażonej jako równoważnik witaminy C (VCE) [ $\mu\text{g/ml}$ ].....	185
<b>Rycina 89.</b> Wykres zależności pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną (DPPH) i zdolnością redukcji jonów $\text{Fe}^{3+}$ (FRAP) dla wyciągów acetonowych (50 $\mu\text{g/ml}$ ) z <i>H. physodes</i> , <i>P. sulcata</i> , <i>H. scalaris</i> , wyrażoną jako równoważnik witaminy C (VCE $\mu\text{g/ml}$ ).....	185
<b>Rycina 90.</b> Wpływ związków (100 $\mu\text{M}$ ; *25 $\mu\text{M}$ ): *atranoryny, kwasu lekanorowego, kwasu skwamatowego, kwasu fyzodowego, kwasu salazynowego, *kwasu (+)-usninowego, na przeżywalność komórek: MDA-MB-231, MCF-7, T47D, LnCaP, CaLu-1, HepG2 (72 godziny inkubacji, test MTT). Wyniki porównywano do próby kontrolnej ( $\pm$ S).....	187
<b>Rycina 91.</b> Wpływ wyciągów acetonowych (100 $\mu\text{g/ml}$ ) z <i>H. physodes</i> , <i>P. sulcata</i> , <i>H. scalaris</i> , <i>C. uncialis</i> na przeżywalność komórek: MDA-MB-231, MCF-7, T47D, LnCaP, CaLu-1 (72 godziny inkubacji, test MTT). Wyniki porównywano do próby kontrolnej ( $\pm$ S).....	188
<b>Rycina 92.</b> Wpływ wyciągów acetonowych z <i>H. physodes</i> na przeżywalność komórek: MCF7, MDA-MB-231, T47D (72 godziny inkubacji, test MTT) ( $\pm$ S).....	189
<b>Rycina 93.</b> Wpływ kwasu fyzodowego na przeżywalność komórek: MDA-MB-231, MCF-7 (72 godziny inkubacji, test MTT, NRU, CV) ( $\pm$ S).....	190

---

<b>Rycina 94.</b> Wpływ kwasu fizodowego na przeżywalność komórek: T47D, MCF-10A (72 godziny inkubacji, test MTT, NRU, CV) ( $\pm$ S) .....	191
<b>Rycina 95.</b> Wpływ kwasów: (+)- usninowego i (-)-usninowego, na przeżywalność komórek: MDA-MB-231, MCF-7, T47D, MCF-10A, LnCaP, CaLu-1, HepG2 (72 godziny inkubacji, test MTT) ( $\pm$ S) .....	192

# *PIŚMIENNICTWO*

1. Ahmadjian VH, Hale ME. The Lichens. New York–San Francisco–London 1977.
2. Ahmadjian V. The Lichen Symbiosis. John Wiley & Sons Inc. New York 1993.
3. Agboke A, Jackson C, Adedokun M, Momoh MA. *In vitro* evaluation of the interaction between methanol extract of lichen (*Ramalina farinacea*) and tetracycline against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. African Journal of Biotechnol. 2011;10 (12):2314-18.
4. Annegowda HV, Anwar LN, Mordi MN, Ramanathan S, Mansor SM. Influence of sonication on the phenolic content and antioxidant activity of *Terminalia catappa* L. leaves. Pharmacognosy Res. 2010;2(6):368-73.
5. Ari F, Celikler S, Oran S, Balıkcı N, Ozturk S, Ozel MZ, Ozyurt D, Ulukaya E. Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. on breast cancer cells. Environ Toxicol. 2012. doi: 10.1002/tox.21809 [Epub ahead of print].
6. Arnous A, Dimitris P, Makrisa, Panagiotis K. Correlation of Pigment and Flavanol Content with Antioxidant Properties in Selected Aged Regional Wines from Greece. J Food Compost Anal. 2002;15:655-65.
7. Asahina Y, Shibata S. Chemistry of lichen substances. Tokyo 1954.
8. Atalay F, Halıcı MB, Mavi A, Çakır A, Odabaşođlu F, Kazaz C, Aslan A, Küfreviođlu Öİ. Antioxidant phenolics from *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. and *Usnea longissima* Ach. lichen species. Turk J Chem. 2011;35:647-61.
9. Bačkorová M, Bačkor M, Mikeš J, Jendželovský R, Fedoročko P. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. Toxicol In Vitro. 2011;25(1):37-44.
10. Bazin MA, Le Lamer AC, Delcros JG, Rouaud I, Uriac P, Boustie J, Corbel JC, Tomasi S. Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives. Bioorg Med Chem. 2008;16(14):6860-6.
11. Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U. Antioxidant and antibacterial activities of lichen *Usnea ghattensis* *in vitro*. Biotechnol Lett. 2005;27(14):991-5.
12. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. Biotechnol Annu Rev. 2005;11:127–52.
13. Bézivin C, Tomasi S, Rouaud I, Delcros JG, Boustie J. Cytotoxic activity of compounds from the lichen: *Cladonia convoluta*. Planta Med. 2004;70(9):874-7.

14. Bézivin C, Tomasi S, Lohézic-Le Dévéhat F, Boustie J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*. 2003;10(6-7):499-503.
15. Białońska D, Dayan FE. Chemistry of the lichen *Hypogymnia physodes* transplanted to an industrial region. *J Chem Ecol*. 2005;31(12):2975-91.
16. Blumenthal M (red.). *Herbal Medicine. Expanded Commission E Monographs. Integrative Medicine Communications*. Newton 2000, 2012-14.
17. Bogo D, de Matos MF, Honda NK, Pontes EC, Oguma PM, da Santos EC, de Carvalho JE, Nomizo A. *In vitro* antitumour activity of orsellinates. *Z Naturforsch [C]*. 2010;65(1-2):43-8.
18. Boustie J, Grube M. Lichens - a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Gen Res*. 2005;3:273-87.
19. Boustie J, Lohézic-Le Dévéhat. *Lichen Extracts and Cancer*. Watson RR, Predy VR (red.). *Botanical Medicine in Clinical Practice*. Wallingford, UK; Cambridge, MA:CABI; 2008.
20. Brisdelli F, Perilli M, Sellitri D, Piovano M, Garbarino JA, Nicoletti M, Bozzi A, Amicosante G, Celenza G. Cytotoxic Activity and Antioxidant Capacity of Purified Lichen Metabolites: An *In Vitro* Study. *Phytother Res*. 2012;doi: 10.1002/ptr.4739 [Epub ahead of print].
21. Bugni TS, Andjelic CD, Pole AR, Rai P, Ireland CM, Barrows LR. Biologically active components of a Papua New Guinea analgesic and anti-inflammatory lichen preparation. *Fitoterapia*. 2009;80(5):270-3.
22. Burlando B, Ranzato E, Volante A, Appendino G, Pollastro F, Verotta L. Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. *Planta Med*. 2009;75(6):607-13.
23. Bustinza F. Antibacterial substances from lichens. *Econ Bot*. 1952;6:402-6.
24. Bylka W, Studzińska E. Aktywność immunostymulująca porostów. W: *Współczesne zagrożenia zdrowotne*. Ewa Skopińska-Różewska, Andrzej K. Siwicki (red.). Edycja Olsztyn 2009, 231-42.
25. Bystrek J. *Podstawy lichenologii*. UMCS Lublin 1997.
26. Candan M, Yilmaz M, Tay T, Erdem M, Türk AO. Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Parmelia sulcata* and its salazinic acid constituent. *Z Naturforsch C*. 2007;62(7-8):619-21.
27. Cardarelli M, Serino G, Campanella L, Ercole P, De Cicco Nardone F, Alesiani O, Rossiello F. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. *Cell Mol Life Sci*. 1997;53(8):667-72.



28. Chiba K, Kawakami K, Tohyama K. Simultaneous Evaluation of Cell Viability by Neutral Red, MTT and Crystal Violet Staining Assays of the Same Cells. *Toxicol in Vitro*. 1998;12: 251-8.
29. Cocchietto M, Skert N, Nimis PL, Sava G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*. 2002;89:137-46.
30. Correché E, Carrasco M, Giannini F, Piovano M, Garbario J, Enriz D. Cytotoxic screening activity of secondary metabolites. *Acta Farm Bonaerense*. 2002;21:273-8.
31. Correché ER, Enriz RD, Piovano M, Garbarino J, Gómez-Lechón MJ. Cytotoxic and apoptotic effects on hepatocytes of secondary metabolites obtained from lichens. *Altern Lab Anim*. 2004;32(6):605-15.
32. Culberson CF. *Chemical and Botanical Guide to Lichen Products*. The University of North Carolina Press 1969. Reprint 1979 by Otto Koeltz Science Publishers, Koenigstein, Germany.
33. Cybul M, Nowak R. Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych. *Herba Polon*. 2008;54(1):68-78.
34. Czarnota P. Symbiozy porostowe w świetle interakcji pomiędzy grzybami i fotobiontami. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*. 2009;58(1-2):229-48.
35. Da Silva Santos NP, Nascimento SC, Wanderley MS, Pontes-Filho NT, da Silva JF, de Castro CM, Pereira EC, da Silva NH, Honda NK, Santos-Magalhães NS. Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006;64(2):154-60.
36. Dailey RN, Montgomery DL, Ingram JT, Siemion R, Vasquez M, Raisbeck MF. Toxicity of the lichen secondary metabolite (+)-usnic acid in domestic sheep. *Vet Pathol*. 2008;45(1):19-25.
37. Dayan FE, Romagni JG. Lichens as a potential source of pesticides. *Pestic. Outlook*. 2001;12(6):229-32.
38. De Carvalho MG, de Carvalho GJA, Braz-Filho R. Chemical constituents from *Ouratea floribunda*: complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments of atranorin and its new acetyl derivative. *J Braz Chem Soc*. 2000;11(2):143-7.
39. De Paz GA, Raggio J, Gómez-Serranillos MP, Palomino OM, González-Burgos E, Carretero ME, Crespo A. HPLC isolation of antioxidant constituents from *Xanthoparmelia* spp. *J Pharm Biomed Anal*. 2010;53(2):165-71.
40. Dóka O, Bicanic D. Determination of total polyphenolic content in red wines by means of the combined He-Ne laser optothermal window and Folin-Ciocalteu colorimetry assay. *Anal Chem*. 2002;74(9):2157-61.

41. Eifler-Lima VL, Sperry A, Sinbandhit S, Boustie J, Tomasi S, Schenkel E. NMR spectral data of salazinic acid isolated from some species of *Parmotrema*. *Magn Reson Chem*. 2000;38: 472–4.
42. Einarsdóttir E, Groeneweg J, Björnsdóttir GG, Harethardottir G, Omarsdóttir S, Ingólfssdóttir K, Ogmundsdóttir HM. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. *Planta Med*. 2010;76(10):969-74.
43. Elix JA, Crook CE. The joint occurrences of chloroxanthones in lichens, and a further thirteen new lichen xanthones. *Bryologist* 1992; 95:52-64.
44. Elo H, Matikainen J, Pelttari E. Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Naturwissenschaften*. 2007;94:465-8.
45. Endo Y, Hayashi H, Sato T, Maruno M, Ohta T, Nozoe S. Confluent acid and 2'-O-methylperlatolic acid, monoamine oxidase B inhibitors in a Brazilian plant, *Himatanthus sukuuba*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1994;42(6):1198-201.
46. Ernst-Russell MA, Elix JA, Chai ChLL, Hockless DCR, Hurne AM, Waring P. Structure Revision and Cytotoxic Activity of the Scabrosin Esters, Epidithiopiperazinediones from the Lichen *Xanthoparmelia scabrosa*. *Aust J Chem*. 1999;52(4):279-83.
47. European Pharmacopoeia VII, vol. 2. Council of Europe Strasbourg 2004. 1787.
48. Farmakopea Polska IX (FP IX). Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne Warszawa 2012.
49. Favreau JT, Ryu ML, Braunstein G, Orshansky G, Park SS, Coody GL, Love LA, Fong TL. Severe hepatotoxicity associated with the dietary supplement LipoKinetix. *Ann Intern Med*. 2002;136:590–5.
50. Fernández E, Reyes A, Hidalgo ME, Quilhot W. Photoprotector capacity of lichen metabolites assessed through the inhibition of the 8-methoxypsoralen photobinding to protein. *J Photochem Photobiol B*. 1998;42(3):195-201.
51. Fotakis G, Timbrell JA. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*. 2006;160:171-7.
52. Fournet A, Ferreira ME, Rojas de Arias A, Torres de Ortiz S, Inchausti A, Yaluff G, Quilhot W, Fernández E, Hidalgo ME. Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 1997;116(1):51-4.
53. Galanty A, Koczurkiewicz P, Burakowska D, Janeczko Z. Aktywność biologiczna i farmakologiczna kwasu usninowego. *Postępy Fitoterapii*. 2012;13(3):162-72.

54. Gollapudi SR, Telikepalli H, Jampani HB, Mirhom YW, Drake SD, Bhattiprolu KR, Vander Velde D, Mitscher LA. Alecosarmentin, a new antimicrobial dibenzofuranoid lactol from the lichen, *Alectoria sarmentosa*. J Nat Prod. 1994;57(7):934-8.
55. Gomes AT, Smania A, Seidle C, Smania EFA, Honda NK, Roeses FM, Muzzi RM. Antibacterial activity of orsellinates. Braz J Microbiol. 2003;34(3):194–6.
56. 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):515-21.
57. Gülçin I, Oktay M, Küfrevioğlu OI, Aslan A. Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. J Ethnopharmacol. 2002;79(3):325-9.
58. Guo L, Shi Q, Fang JL, Mei N, Ali AA, Lewis SM, Leakey JE, Frankos VH. Review of usnic acid and *Usnea barbata* toxicity. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev. 2008;26(4):317-38.
59. Güvenç A, Küpeli Akkol E, Süntar I, Keleş H, Yıldız S, Çalış I. Biological activities of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf extracts and isolation of the active compounds. J Ethnopharmacol. 2012;144(3):726-34.
60. Haluwyn Ch, Lerond M. Guide des lichens. Editions Lechevalier Paris 1993.
61. Hara K, Endo M, Kawakami H, Komine M, Yamamoto Y. Anti-oxidation activity of ethanol extracts from natural thalli of Lichens. Mycosystema. 2011;30(6):950-4.
62. Harada M, Yano S, Watanabe H, Yamazaki M, Miyaki K. Phlogistic Activity of Secalonic Acid A. Chem Pharm Bull. 1974, 22(7):1600-6.
63. Haraldsdóttir S, Guolaugsdóttir E, Ingólfssdóttir K, Ogmundsdóttir HM. Anti-proliferative effects of lichen-derived lipxygenase inhibitors on twelve human cancer cell lines of different tissue origin *in vitro*. Planta Med. 2004;70(11):1098-100.
64. Hauck M, Huneck S. Lichen substances affect metal adsorption in *Hypogymnia physodes*. J Chem Ecol. 2007;33(1):219-23.
65. Hidalgo ME, Fernández E, Quilhot W, Lissi E. Antioxidant activity of depsides and depsidones. Phytochemistry. 1994;37(6):1585-7.
66. Honda NK, Pavan FR, Coelho RG, de Andrade Leite SR, Micheletti AC, Lopes TI, Misutsu MY, Beatriz A, Brum RL, Leite CQ. Antimycobacterial activity of lichen substances. Phytomedicine. 2010;17(5):328-32.

67. Huneck S. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften* 1999; 86:559-70.
68. Huneck S, Yoshimura I. Identification of lichen substances. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg 1999.
69. Ingólfssdóttir K. Usnic acid. *Phytochemistry*. 2002;61:729-36.
70. Ingólfssdóttir K, Chung GAC, Skúlason VG, Gissurarson SR, Vilhelmsdóttir M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites *in vitro*. *Eur J Pharm Sci*. 1998;6:141-4.
71. Ingólfssdóttir K, Gudmundsdóttir GF, Ogmundsdóttir HM, Paulus K, Haraldsdóttir S, Kristinsson H, Bauer R. Effects of tenuiorin and methyl orsellinate from the lichen *Peltigera leucophlebia* on 5-/15-lipoxygenases and proliferation of malignant cell lines *in vitro*. *Phytomedicine*. 2002;9(7):654-8.
72. Ingólfssdóttir K, Hjalmarsson MA, Sigurdsson A, Gudjonsdóttir GA, Brynjólfsson A, Steingrímsson O. *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to protolichesteric acid from the lichen *Cetraria islandica*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(1):215-7.
73. Ivanova V, Backor M, Dahse HM, Graefe U. Molecular structural studies of lichen substances with antimicrobial, antiproliferative, and cytotoxic effects from *Parmelia subrudecta*. *Prep Biochem Biotechnol*. 2010;40(4):377-88.
74. Jayaprakasha GK, Rao LJ. Phenolic constituents from the lichen *Parmotrema stuppeum* (Nyl.) Hale and their antioxidant activity. *Z Naturforsch C*. 2000;55(11-12):1018-22.
75. Karakus B, Odabasoglu F, Cakir A, Halici Z, Bayir Y, Halici M, Aslan A, Suleyman H. The effects of methanol extract of *Lobaria pulmonaria*, a lichen species, on indometacin-induced gastric mucosal damage, oxidative stress and neutrophil infiltration. *Phytother Res*. 2009;23(5):635-9.
76. Kinoshita Y, Yamamoto Y, Yoshimura J, Kurokawa T, Huneck S. Distribution of optical isomers of usnic and isousnic acids analyzed by HPLC. *J Hattori Bot Lab*. 1997;83:173-8.
77. Kohlmünzer S. Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji. PZWL Warszawa 2007.
78. Kosanić M, Ranković B. Lichens as possible sources of antioxidants. *Pak J Pharm Sci*. 2011;24(2):165-70.
79. Kosanić MM, Ranković BR, Stanojković TP. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of three *Parmelia* species. *J Sci Food Agric*. 2012;92(9):1909-16.

80. Kosanić M, Ranković B, Stanojković T. Antioxidant, antimicrobial, and anticancer activity of 3 *Umbilicaria* species. *J Food Sci.* 2012a;77(1):20-5.
81. Kosanić M, Ranković B, Vukojević J. Antioxidant properties of some lichen species. *J Food Sci Technol.* 2011;48(5):584-90.
82. Krishna DR, Venkataramana D. Pharmacokinetics of D-(+)-usnic acid in rabbits after intravenous and oral administration. *Drug Metab Dispos.* 1992;20:909-11.
83. Kristmundsdóttir T, Jónsdóttir E, Ogmundsdóttir HM, Ingólfssdóttir K. Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines. *Eur J Pharm Sci.* 2005;24(5):539-43.
84. Kumar SVP, Kekuda TRP, Vinayaka KS, SudharshanSJ, 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):1207-14.
85. Kumar S, Müller K. Lichen Metabolites. 1. Inhibitory Action Against Leukotriene B<sub>4</sub>. Biosynthesis by a Non-Redox Mechanism. *J Nat Prod.* 1999;62:817-820.
86. Kumar S, Müller K. Lichen Metabolites. 2. Antiproliferative and Cytotoxic Activity of Gyrophoric, Usnic, and Diffractaic Acid on Human Keratinocyte Growth. *J Nat Prod.* 1999a;62:821-3.
87. Kupchan M, Kopperman HL. Usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. *Experientia.* 1975;31(6):625.
88. Kurobane I, Iwahashi S, Fukuda A. Cytostatic activity of naturally isolated isomers of secalonic acids and their chemically rearranged dimers. *Drugs Exp Clin Res.* 1987;13(6):339-44.
89. Kusumaningrum IK, Suwarso WP, Cahyana AH. Screening for Bioactive Compound Group in *Parmotrematinctorum*'s Extract and Bioactivity Test of Dichloromethane Extract as Anti-tuberculosis Against *Mycobacterium tuberculosis* H37RV and Toxicity Against *Artemia salina*. *Sci J UBU.* 2011;2(1):53-9.
90. Lauterwein M, Oethinger M, Belsner K, Peters T, Marre R. *In vitro* of the secondary metabolites: vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (-)-usnic acid against Aerobic and Anaerobic microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:2541-3.
91. Lawrey JD, Torzilli AP, Chandhoke V. Destruction of lichen chemical defenses by a fungal. *Am J Bot.* 1999;86(2):184-9.
92. Legaz ME, de Armas R, Vicente C. Bioproduction of Depsidones for Pharmaceutical Purposes, Drug Development - A Case Study Based Insight into

- Modern Strategies. Chris Rundfeldt (red.). InTech 2011.doi: 10.5772/27051. Available from: <http://www.intechopen.com/books/drug-development-a-case-study-based-insight-into-modern-strategies/bioproduction-of-depsidones-for-pharmaceutical-purposes> (25.08.2012)
93. Lipnicki L, Wójciak H. Porosty. Klucz – Atlas. Wydawnictwa Szkolne i Pedagogiczne 1995.
  94. Lohézic-Le Dévéhat F, Tomasi S, Elix JA, Bernard A, Rouaud I, Uriac P, Boustie J. Stictic acid derivatives from the lichen *Usnea articulata* and their antioxidant activities. J Nat Prod. 2007;70(7):1218-20.
  95. Lopes TI, Coelho RG, Yoshida NC, Honda NK. Radical-scavenging activity of orsellinates. Chem Pharm Bull. 2008;56(11):1551-4.
  96. Luo H, Yamamoto Y, Kim JA, Jung JS, Koh YJ, Hur J-S. Lecanoric acid, a secondary lichen substance with antioxidant properties from *Umbilicaria antarctica* in maritime Antarctica (King George Island). Polar Biology. 2009;32(7):1033-40.
  97. Luo H, Yamamoto Y, Liu Y, Jung JS, Kahng HY, Koh YJ, Hur JS. The *In vitro* antioxidant properties of chinese highland lichens. J Microbiol Biotechnol. 2010;20(11):1524-8.
  98. Maia MBDS, Da Silva NH, Da Silva EF, Catanho MTJ, Schuler ARP, Pereira EC. Antinociceptive activity of crude extracts and atranorin obtained from the lichen *Cladina dendroides* (des Abb.) Ahti. Acta Farm Bonaerense. 2002;21(4):259-64.
  99. Malhotra S., Subban R., Singh A. Lichens- Role in Traditional Medicine and Drug Discovery. The Internet Journal of Alternative Medicine. 2008;5(2). <http://www.ispub.com/journal/the-internet-journal-of-alternative-medicine/volume-5-number-2/lichens-role-in-traditional-medicine-and-drug-discovery.html#sthash.X5nhT4hU.dpbs> (10.11. 2012)
  100. Manojlović NT, Vasiljević P, Jusković M, Najman S, Janković S, Milenković-Andjelković A. HPLC analysis and cytotoxic potential of extracts from the lichen, *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis*. Journal of Medicinal Plants Research. 2010;4(9):818–24.
  101. Manojlović NT, Vasiljevic PJ, PZ Maskovic. Chemical composition and antioxidant activity of lichen *Toninia candida*. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2012;22(2):291-8.
  102. Manojlović N, Solujić S, Sukdolak S. Antimicrobial activity of an extract and antraquinones from *Caloplaca schaeereri*. Lichenologist. 2002;34(1):83-5.
  103. Manojlović NT, Solujić S, Sukdolak S, Krstić Lj. Isolation and antimicrobial activity of antraquinones from some species of the lichen genus *Xanthoria*. J Serb. Chem Soc. 2000;65(8):555-60.

104. Manojlović NT, Vasiljevic PJ, Maskovic PZ, Juskovic M, Bogdanovic-Dusanovic G. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae). Evid Based Complement Alternat Med. 2012; doi: 10.1155/2012/452431. Epub 2011 Sep 7.
105. Marshak A, Kuschner M. The action of streptomycin and usnic acid on the development of tuberculosis in guinea pigs. Public Health Rep. 1950;65(5):131-44.
106. Mayer M, O'Neill MA, Murray KE, Santos-Magalhães NS, Carneiro-Leão AM, Thompson AM, Appleyard VC. Usnic acid: a non-genotoxic compound with anti-cancer properties. Anticancer Drugs. 2005;16(8):805-9.
107. Melo MG, de Souza Araújo AA, Serafini MR, Carvalho LF, Bezerra MS, Ramos CS, Bonjardim LR, Albuquerque RLC Jr, Lima JT, Siqueira RS, Fortes VS, Fonseca MJV, Quintans L Jr. Purification, physicochemical properties, thermal analysis and antinociceptive effect of atranorin extracted from *Cladina kalbii*. Biol Pharm Bull. 2008;31(10):1977-80.
108. Melo MG, de Souza Araújo AA, Serafini MR, Carvalho LF, Bezerra MS, Ramos CS, Bonjardim LR, Albuquerque RLC Jr, Lima JT, Siqueira RS, Fortes VS, Fonseca MJV, Quintans L Jr. Anti-inflammatory and toxicity studies of atranorin extracted from *Cladina kalbii* Ahti in rodents. Braz. J. Pharm. Sci. 2011;47(4):861-72.
109. Mietsch E, Lumbsch HT, Elix JA. Wintabolites (Mactabolites for Windows) Users Manual. 2<sup>nd</sup> Edn. Essen: Universität Essen.
110. Millot M, Tomasi S, Articus K, Rouaud I, Bernard A, Boustie J. Metabolites from the Lichen *Ochrolechia parella* growing under two different heliotropic conditions. J Nat Prod. 2007;70(2):316-8.
111. Millot M, Tomasi S, Studzinska E, Rouaud I, Boustie J. Cytotoxic Constituents of the Lichen *Diploicia canescens*. J Nat Prod. 2009;72:2177-80.
112. Mišić M, Ranković B, Sukdolak S. Antimicrobial activity of fumarprotocetraric acid, lecanoric acid, protocetraric acid and stictic acid isolated from different species of lichen. Planta Med. 2008;74:228.
113. Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Tošić S, Stanković M, Radojević I, Stefanović O, Comić L, Dačić D, Curčić M, Marković S. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. Int J Mol Sci. 2011;12(8):5428-48.
114. Molnár K, Farkas E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. Z Naturforsch [C]. 2010;65(3-4):157-73.

115. Molyneux Ph. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* 2004;26(2):211-19.
116. Müller K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001;56:9-16.
117. Nash TH III (red.). *Lichen Biology.* Cambridge University Press. New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo 2008; 105-133, 336-9.
118. Neeraj V, Behera BC, Parizadeh H, Sharma BO. Bactericidal Activity of Some Lichen Secondary Compounds of *Cladonia ochrochlora*, *Parmotrema nilgherrensis* & *Parmotrema sancti-angelii*. *Int J of Drug Dev & Res.* 2011;3(3):222-32.
119. Neamati N, Hong H, Mazumder A, Wang S, Sunder S, Nicklaus, MC, Milne GWA, ProksaB, Pommier Y. Depsides and Depsidones as Inhibitors of HIV-1 Integrase: Discovery of Novel Inhibitors through 3D Database Searching. *Journal of Medicinal Chemistry.* 1997;40:942-951.
120. Nicolaou KC, Chen JS, Zhang H, Montero A. Asymmetric synthesis and biological properties of uncialamycin and 26-epi-uncialamycin. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2008;47(1):185-9.
121. Nóbrega NA, Ribeiro SM, Pereira EC, Marcelli M, Cristina M, Martins B, da Silva, Falcão EP, de Gusmão NB, da Silva NH. Produção de compostos fenólicos a partir de células imobilizadas do líquen *Parmotrema andinum* (Müll. Arg.) Hale e avaliação de atividade antimicrobiana. *Acta Bot Bras.* 2012; 26(1): 101-7.
122. Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Kazaz C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol.* 2006;103:59-65.
123. Ogmundsdóttir HM, Zoëga GM, Gissurarson SR, Ingólfssdóttir K. Anti-proliferative effects of lichen-derived inhibitors of 5-lipoxygenase on malignant cell-lines and mitogen-stimulated lymphocytes. *J Pharm Pharmacol.* 1998;50(1):107-15.
124. Oksanen I. Ecological and biotechnological aspects of lichens. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;73(4):723-34.
125. Okuyama E, Umeyama K, Yamazaki M. Usnic acid and diffractic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Med.* 1995;61:113-5.
126. O'Neill MA, Mayer M, Murray KE, Rolim-Santos HM, Santos-Magalhães NS, Thompson AM, Appleyard VC. Does usnic acid affect microtubules in human cancer cells? *Braz J Biol.* 2010;70(3):659-64.



127. Orange A, James PW, White FJ. Microchemical methods for the identification of lichens. British Lichen Society London 2001.
128. Osawa T, Kumon H, Reece CA, Shibamoto T. Inhibitory effect of lichen constituents on mutagenicity induced by heterocyclic amines. *Environ Mol Mutagen.* 1991;18(1):35-40.
129. Oświecimska M, Janeczko Z, Sendra J, Hładoń B. Antimiototic activity of some native *Cladonia* species in Poland. Part II. *Herba Polon.* 1983;29:271-9.
130. Özen T, Kinalioğlu K. Determination of antioxidant activity of various extracts of *Parmelia saxatilis*. *Biologia.* 2008;63(2):211-16.
131. Paudel B, Bhattarai HD, Lee JS, Hong SG, Shin HW, Yim JH. Antioxidant activity of polar lichens from King George Island (Antarctica). *Polar Biol.* 2008; 31(5):605-8.
132. Pavlovic V, Stojanovic I, Jadranin M, Vajs V, Djordjević I, Smelcerovic A, Stojanovic G. Effect of four lichen acids isolated from *Hypogymnia physodes* on viability of rat thymocytes. *Food Chem Toxicol.* 2013;51:160-4.
133. Pengsuparp T, Cai L, Constant H, Fong HH, Lin LZ, Kinghorn AD, Pezzuto JM, Cordell GA, Ingolfssdóttir K, Wagner H, Hughes SH. Mechanistic evaluation of new plant-derived compounds that inhibit HIV-1 reverse transcriptase. *J Nat Prod.* 1995;58(7):1024-31.
134. Perry NB, Benn MH, Brennan NJ, Burgess EJ, Ellis G, Galloway DJ, Lorimer SD, TangneyRS. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens. *Lichenologist.* 1999;31(6):627-36.
135. Pettit GR, Meng Y, Herald DL, Graham KA, Pettit RK, Doubek DL. Isolation and structure of ruprechstyryl from *Ruprechtia tangarana*. *J Nat Prod.* 2003;66(8):1065-9.
136. Podbielkowska M, Podbielkowski Z. *Biologia z higieną i ochroną środowiska.* Wydawnictwo Szkolne i Pedagogiczne Warszawa 1995.
137. Podbielkowski Z, Rejment-Grochowska I, Skirgiełło A. *Rośliny zarodnikowe.* PWN Warszawa 1986.
138. Pramyothin P, Janthasoot W, Pongnimitprasert N, Phrukudom S, Ruangrunsi N. Hepatotoxic effect of (+)-usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. *J Ethnopharmacol.* 2004;90:381-7.
139. Proksa B, Adamcová J, Sturdíková M, Fuska J. Metabolites of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. and their inhibition potential of proteolytic enzymes. *Pharmazie.* 1994;49(4):282-3.

140. Purvis OW, Coppins BJ, Hawksworth DL, James PW, Moore DM (red.). The lichen flora of Great Britain and Ireland. Natural History Publications London 1992.
141. Purvis W. Lichens. The Natural History Museum. London 2000.
142. Rancan F, Rosan S, Boehm K, Fernández E, Hidalgo M. E, Quihot W, Rubio C, Boehm F, Piazena H, Oltmanns U. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. J Photochem Photobiol: B. 2002;68:133-9.
143. Ranković B, Mišić M. The Antimicrobial Activity of the Lichen Substances of the Lichens *Cladonia furcata*, *Ochrolechia androgyna*, *Parmelia caperata* and *Parmelia conspresa*. Biotechnol. & Biotechnol. 2008;22(4):1013-16.
144. Rankovic B, Mišic M, Sukdolak S. Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. Biologia. Section Botany. 2009;64(1):53-8.
145. Rancović B, Mišić M, Sukdolak S. The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipola*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*. World J Microbiol Biotechnol. 2008; 24:1239-42.
146. Ranković B, Ranković D, Marić D. Antioxidant and antimicrobial activity of some lichen species. Mikrobiologija. 2010;79(6):812-8.
147. Reddy L, Odhav B, Bhoola KD. Natural products for cancer prevention: a global perspective. Pharmacol Ther. 2003;99(1):1-13.
148. Ren MR, Hur JS, Kim JY, Park KW, Park SC, Seong CN, Jeong IY, Byun MW, Lee MK, Seo KI. Anti-proliferative effects of *Lethariella zahlbruckneri* extracts in human HT-29 human colon cancer cells. Food Chem Toxicol. 2009;47(9):2157-62.
149. Ribeiro-Costa RM, Alves AJ, Santos NP, Nascimento SC, Gonçalves EC, Silva NH, Honda NK, Santos-Magalhães NS. *In vitro* and *in vivo* properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. J Microencapsul. 2004;21(4):371-84.
150. Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej 2012. Zakład Wydawnictw Statystycznych. Warszawa 2012.
151. Russo A, Piovano M, Lombardo L, Garbarino J, Cardile V. Lichen metabolites prevent UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells. Life Sci. 2008;83(13-14):468-74.
152. Sahu SC, Amankwa-Sakyi M, O'Donnell MW Jr, Sprando RL. Effects of usnic acid exposure on human hepatoblastoma HepG2 cells in culture. J Appl Toxicol. 2012;32(9):722-30.

153. Sanchez W, Maple JT, Burgart LJ, Kamath PS. Severe hepatotoxicity associated with use of a dietary supplement containing usnic acid. *Mayo Clin Proc.* 2006;81(4):541-4.
154. Seo C, Choi YH, Ahn JS, Yim JH, Lee HK, Oh H. PTP1B inhibitory effects of tridepside and related metabolites isolated from the Antarctic lichen *Umbilicaria antarctica*. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2009;24(5):1133-7.
155. Shibamoto T, Wei CI. Mutagenicity of lichen constituents. *Environ Mutagen.* 1984;6(5):757-62.
156. Solhaug KA, Lind M, Nybakken L, Gauslaa Y. Possible functional roles of cortical depsides and medullary depsidones in the foliose lichen *Hypogymnia physodes*. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants.* 2009;204(1):40-8.
157. Sonko BJ, Schmitt TC, Guo L, Shi Q, Boros LG, Leakey JE, Beger RD. Assessment of usnic acid toxicity in rat primary hepatocytes using <sup>13</sup>C isotopomer distribution analysis of lactate, glutamate and glucose. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(11):2968-74.
158. Studzińska-Sroka E. Historia badań nad porostami. *Now Lek.* 2008;77(5):367-72.
159. Studzińska-Sroka E, Bylka W. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa metabolitów wtórnych porostów. *Postępy Fitoterapii.* 2010;11(1):23-9.
160. Studzińska-Sroka E, Bylka W. Porost islandzki - związki czynne, aktywność biologiczna. *Farm Prz Nauk.* 2010;11 (7) 23-27.
161. Studzińska E, Witkowska-Banaszczak E, Bylka W. Związki biologicznie aktywne porostów. *Herba Pol.* 2008;54:80-8.
162. Stanly C, Ali DMH, Keng CL, Boey PL, Bhatt A. Comparative evaluation of antioxidant activity and total phenolic content of selected lichen species from Malaysia. *J Pharm Res.* 2011;4:2824-7.
163. Stojanović G, Stojanović I, Stankov-Jovanović V, Mitić V, Kostić D. Reducing power and radical scavenging activity of four Parmeliaceae species. *Cent Eur J Biol.* 2010;5(6):808-13.
164. Tan GT, Lee S, Lee IS, Chen J, Leitner P, Besterman JM, Kinghorn AD, Pezzuto JM. Natural-product inhibitors of human DNA ligase I. *Biochem J.* 1996;314(3):993-1000.
165. Tay T, Türk AO, Yilmaz M, Türk H, Kivanç M. Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen *Ramalina farinacea* and its (+)-usnic acid, norstictic acid, and protocetraric acid constituents. *Z Naturforsch [C].* 2004;59c:384-8.

166. Thadhani VM, Choudhary MI, Ali S, Omar I, Siddique H, Karunaratne V. Antioxidant activity of some lichen metabolites. *Nat Prod Res.* 2011;25(19):1827-37.
167. Toledo Marante FJ, García Castellano A, Estévez Rosas F, Quintana Aguiar J, Bermejo Barrera J. Identification and quantitation of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis*: phytotoxicity and antioxidative activity. *J Chem Ecol.* 2003;29(9):2049-71.
168. Türk H, Yilmaz M, Tay T, Türk AO, Kivanç M. Antimicrobial activity of extracts of chemical races of the lichen *Pseudevernia furfuracea* and their physodic acid, chloroatranorin, atranorin and olivetoric acid constituents. *Z Naturfosch [C].* 2006;61c:499-507.
169. Türk AO, Yilmaz M, Kivanç M, Türk H. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cetraria aculeata* and its protolichesterinic acid constituent. *Z Naturforsch C* 2003; 58c:850-4.
170. 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.* 2012;11(3):889-96
171. Umezawa H, Shibamoto N, Naganawa H, Ayukawa S, Matsuzaki M, Takeuchi T, Kono K, Sakamoto T. Isolation of lecanoric acid, an inhibitor of histidine decarboxylase from a fungus. *J Antibiot.* 1974;27(8):587-96.
172. Verma N, Behera BC, Sharma BO. Glucosidase Inhibitory and Radical Scavenging Properties of Lichen Metabolites Salazinic Acid, Sekikaic Acid and Usnic Acid. *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 2012;40(1):7–21.
173. Vila J, Mollinedo P, Sterner O. Spectroscopic studies of lichen depsides and depsidones. *Rev Bol Quim.* 2011;28(1):28-34.
174. Yamamoto Y, Miura Y, Kinoshita Y, Higuchi M, Yamada Y, Murakami A, Ohigashi H, Koshimizu K. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1995;43(8):1388-90.
175. Yilmaz M, Tay T, Kivanç M, Türk H, Türk AO. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Hypogymnia tubulosa* and its 3-hydroxyphysodic acid constituent. *Z Naturforsch [C].* 2005;60(1-2):35-8.
176. Yilmaz M, Türk AO, Tay T, Kivanç M. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (-)-usnic acid, atranorin, and fumarprotocetraric acid constituents. *Z Naturfosch [C].* 2004;59c:249-54.

177. Wei AH, Zhou DN, Ruan JL, Cai YL, Xiong CM, Li MX. Characterisation of phenols and antioxidant and hypolipidaemic activities of *Lethariella cladonioides*. J Sci Food Agric. 2012;30;92(2):373-9.
178. Wójciak H. Porosty, mszaki, paprotniki. Flora polski. Multico Warszawa 2007.
179. Wu J, Zhang M, Ding D, Tan T, Yan B. Effect of *Cladonia alpestris* on *Trichomonas vaginalis* *in vitro*. Chinese J Parasit Parasit Dis. 1995;13:126–9.
180. Zeytinoglu H, Incesu Z, Tuylu BA, Turk AO, Barutca B. Determination of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic potential of the extract from lichen *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. *in vitro*. Phytother Res. 2008;22(1):118-23.
181. Zhou C, Sun C, Chen K, Li X. Flavonoids, Phenolics, and Antioxidant Capacity in the Flower of *Eriobotrya japonica* Lindl. Int J Mol Sci. 2011;12(5):2935-45.

### Strony www

182. [http://www.lichens.lastdragon.org/Cladonia\\_uncialis\\_uncialis.html](http://www.lichens.lastdragon.org/Cladonia_uncialis_uncialis.html) (9.11.2012)
183. [http://www.lichens.lastdragon.org/Hypocenomyce\\_scalaris.html](http://www.lichens.lastdragon.org/Hypocenomyce_scalaris.html) (9.11.2012)
184. [http://www.lichens.lastdragon.org/Parmelia\\_sulcata.html](http://www.lichens.lastdragon.org/Parmelia_sulcata.html) (9.11.2012)
185. [http://www.nagrzyby.pl/index.php?artname=gatunek&id=2955&page=1&atlas=atlas\\_lacinski](http://www.nagrzyby.pl/index.php?artname=gatunek&id=2955&page=1&atlas=atlas_lacinski) (9.11.2012)
186. <http://www.nagrzyby.pl/index.php?artname=stories&artmid=content&id=3943> (9.11.2012)

## OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy **doktorskiej** p.t.:

„Porosty jako źródło związków aktywnych biologicznie”

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną, nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem stopnia **naukowego: doktor nauk farmaceutycznych**, a złożona przeze mnie dyskietka/płyta CD zawiera elektroniczny zapis przedstawionej przeze mnie pracy.

Jednocześnie oświadczam, że nieodpłatnie udzielam Uniwersytetowi Medycznemu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu licencji do korzystania z wyżej wymienionej pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych w zakresie obrotu nośnikami, na których pracę utrwalono przez: wprowadzanie do obrotu, użyczenie lub najem egzemplarzy w postaci elektronicznej a nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

Imię i nazwisko:

Elżbieta Studzińska-Sroka

Data, podpis

Poznań, dnia 13.02.2013

## OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej rozprawy doktorskiej w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im. K.Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w formie elektronicznej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej ([www.wbc.poznan.pl](http://www.wbc.poznan.pl)).

Poznań, dnia 13.02.2013

Elżbieta Studzińska-Sroka  
(podpis)