

Analiza fitochemiczna oraz aktywność cytotoksyczna wybranych metabolitów wtórnych w porostach rodzaju *Cladonia*

ROZPRAWA DOKTORSKA

Agnieszka Galanty

Kraków 2011

SPIS TREŚCI

I. Część teoretyczna	6
1. Wprowadzenie	7
2. Porosty	8
2.1. Definicja i pochodzenie nazwy	8
2.2. Budowa	8
2.3. Rozmnażanie	9
2.4. Rozpowszechnienie	9
2.5. Identyfikacja gatunków - reakcje mikrochemiczne	10
2.6. Znaczenie i zastosowanie pozalecznicze	11
2.6.1. Wykorzystanie spożywcze	11
2.6.2. Wykorzystanie w przemyśle kosmetycznym i farbiarskim	11
2.6.3. Lichenoindykacja	12
2.7. Zastosowanie lecznicze	12
2.8. Działania niekorzystne	13
2.8.1. Wywoływanie alergii	13
2.8.2. Uszkadzanie budynków	13
2.9. Metabolity porostowe	14
2.9.1. Podział substancji porostowych	15
2.9.2. Znaczenie metabolitów dla porostów	19
3. Charakterystyka rodzaju <i>Cladonia</i>	20
3.1. Rozpowszechnienie	20
3.2. Budowa plechy	20
3.3. Ochrona gatunkowa	20
3.4. Badania aktywności biologicznej i farmakologicznej	21
4. Charakterystyka gatunków badanych w pracy	22
4.1. Systematyka	23
4.2. <i>Cladonia arbuscula</i>	23
4.2.1. Opis botaniczny	23
4.2.2. Występowanie i identyfikacja mikrochemiczna	24
4.2.3. Skład chemiczny	24
4.2.4. Aktywność	24
4.3. <i>Cladonia gracilis</i>	26
4.3.1. Opis botaniczny	26
4.3.2. Występowanie i identyfikacja mikrochemiczna	26
4.3.3. Skład chemiczny	26
4.3.4. Aktywność	27
4.4. <i>Cladonia furcata</i>	28
4.4.1. Opis botaniczny	28
4.4.2. Występowanie i identyfikacja mikrochemiczna	28
4.4.3. Skład chemiczny	28
4.4.4. Aktywność	29
4.5. <i>Cladonia macilenta ssp. floerkeana</i>	31
4.5.1. Opis botaniczny	31
4.5.2. Występowanie i identyfikacja mikrochemiczna	31
4.5.3. Skład chemiczny	31

4.5.4. Aktywność	31
4.6. <i>Cladonia subulata</i>	32
4.6.1. Opis botaniczny	32
4.6.2. Występowanie i identyfikacja mikrochemiczna	32
4.6.3. Skład chemiczny	32
4.6.4. Aktywność	32
4.7. <i>Cladonia uncialis</i>	33
4.7.1. Opis botaniczny	33
4.7.2. Występowanie i identyfikacja mikrochemiczna	33
4.7.3. Skład chemiczny	33
4.7.4. Aktywność	34
5. Charakterystyka metabolitów badanych w pracy	35
5.1. Kwas usninowy	35
5.1.1. Własności fizykochemiczne	35
5.1.2. Biogeneza	37
5.1.3. Synteza i pochodne	37
5.1.4. Rozpowszechnienie w porostach	38
5.1.5. Metody ekstrakcji, izolacji i identyfikacji	41
5.1.6. Badania ilościowe	45
5.1.7. Wpływ czynników na zawartość kwasu usninowego w porostach	48
5.1.8. Aktywność biologiczna i farmakologiczna	51
5.1.8.1. Aktywność przeciwbakteryjna	51
5.1.8.2. Aktywność przeciwgrzybicza	54
5.1.8.3. Aktywność przeciwwirusowa	56
5.1.8.4. Aktywność przeciwprzeczerniakowa	56
5.1.8.5. Aktywność przeciw larwom i owadom	57
5.1.8.6. Aktywność fitotoksyczna	58
5.1.8.7. Działanie jako deterent pokarmowy	59
5.1.8.8. Aktywność antyoksydacyjna	59
5.1.8.9. Działanie fotoprotekcyjne	60
5.1.8.10. Aktywność immunomodulująca	61
5.1.8.11. Aktywność przeciwzapalna i przeciwbólowa	61
5.1.8.12. Wpływ na mięśnie gładkie	63
5.1.9. Aktywność cytotoksyczna i przeciwnowotworowa	63
5.1.9.1. Aktywność cytotoksyczna	63
5.1.9.2. Określenie mechanizmu działania cytotoksycznego	66
5.1.9.3. Aktywność antymitotyczna	69
5.1.9.4. Aktywność przeciwnowotworowa	69
5.1.10. Farmakokinetyka i metabolizm	71
5.1.11. Toksyczność	72
5.1.12. Działanie hepatotoksyczne	73
5.1.13. Wywoływanie alergii kontaktowej	76
5.2. Atranoryna	77
5.2.1. Własności fizykochemiczne	77
5.2.2. Biogeneza	77
5.2.3. Rozpowszechnienie w roślinach	78
5.2.4. Warunki ekstrakcji, izolacji i identyfikacji	80
5.2.5. Badania ilościowe	84
5.2.6. Wpływ czynników na zawartość atranoryny w porostach	86
5.2.7. Aktywność biologiczna i farmakologiczna	88

5.2.7.1. Aktywność przeciwbakteryjna	88
5.2.7.2. Aktywność przeciwgrzybicza	89
5.2.7.3. Aktywność przeciwwirusowa	90
5.2.7.4. Aktywność fitotoksyczna	90
5.2.7.5. Działanie jako deterent pokarmowy	90
5.2.7.6. Aktywność antyoksydacyjna	91
5.2.7.7. Aktywność immunomodulująca	91
5.2.7.8. Aktywność fotohemolityczna i fotoprotekcyjna	91
5.2.7.9. Aktywność przeciwzapalna i przeciwbólowa	92
5.2.7.10. Wpływ na mięśnie gładkie	92
5.2.8. Aktywność cytotoksyczna	93
5.2.9. Wywoływanie alergii kontaktowej	94
5.3. Kwas fumaroprotocetrarowy	95
5.3.1. Własności fizykochemiczne	95
5.3.2. Rozpowszechnienie w porostach	96
5.3.3. Warunki ekstrakcji, izolacji i identyfikacji	96
5.3.4. Badania ilościowe	99
5.3.5. Wpływ czynników na zawartość kwasu fumaroprotocetrarowego w porostach	101
5.3.6. Aktywność biologiczna i farmakologiczna	102
5.3.6.1. Aktywność przeciwbakteryjna	102
5.3.6.2. Aktywność przeciwgrzybicza	103
5.3.6.3. Działanie jako deterent pokarmowy	104
5.3.6.4. Aktywność antyoksydacyjna	104
5.3.6.5. Aktywność immunomodulująca	105
5.3.6.6. Aktywność przeciwzapalna i przeciwbólowa	105
5.3.7. Aktywność cytotoksyczna	105
6. Cel i założenia pracy	107
II. Część eksperymentalna	108
7. Materiał i metody	109
7.1. Stosowane materiały, odczynniki i aparatura	109
7.2. Surowiec do badań	112
7.3. Analiza jakościowa	112
7.3.1. Ekstrakcja surowca	112
7.3.2. Analiza jakościowa z zastosowaniem TLC	113
7.3.3. Analiza jakościowa z zastosowaniem HPLC	114
7.4. Analiza ilościowa z zastosowaniem HPLC	117
7.4.1. Krzywa wzorcowa	117
7.4.2. Optymalizacja procesu ekstrakcji	119
7.4.3. Analiza ilościowa wybranych metabolitów porostowych	123
7.5. Izolacja wybranych metabolitów porostowych	124
7.5.1. Izolacja kwasu usninowego	124
7.5.1.1. Analiza spektralna kwasu usninowego	125
7.5.2. Izolacja atranoryny	132
7.5.3. Izolacja kwasu fumaroprotocetrarowego	132
7.5.3.1. Analiza spektralna kwasu fumaroprotocetrarowego	133
7.6. Aktywność biologiczna wybranych metabolitów porostowych	136
7.6.1. Przygotowanie hodowli komórkowych do badań	136
7.6.2. Przygotowanie roztworów do badań	136

7.6.3. Wpływ badanych związków na żywotność komórek	136
7.6.4. Wpływ badanych związków na proliferację komórek	141
7.6.5. Wpływ badanych związków na morfologię komórek	148
7.6.6. Wpływ badanych związków na cytoszkielet aktynowy komórek	148
7.6.7. Wpływ badanych związków na aktywność migracyjną komórek	153
7.6.8. Wpływ badanych związków na morfologię jąder komórkowych	156
7.6.9. Wpływ badanych związków na indukcję procesu apoptozy w komórkach ...	159
7.7. Opracowanie wyników i analiza statystyczna	161
8. Omówienie i dyskusja wyników	162
8.1. Wprowadzenie	162
8.2. Uzasadnienie celu i założeń pracy	163
8.3. Analiza jakościowa	164
8.4. Analiza ilościowa	167
8.4.1. Optymalizacja warunków ekstrakcji	167
8.4.2. Analiza ilościowa badanych metabolitów	169
8.4.3. Porównawcza analiza ilościowa metabolitów porostowych w gatunkach polskich i islandzkich	171
8.5. Izolacja wybranych metabolitów	172
8.6. Wpływ badanych związków na komórki	174
8.6.1. Wpływ badanych związków na żywotność komórek	174
8.6.2. Wpływ badanych związków na proliferację komórek	176
8.6.3. Wpływ badanych związków na morfologię komórek	177
8.6.4. Wpływ badanych związków na cytoszkielet aktynowy komórek	178
8.6.5. Wpływ badanych związków na aktywność migracyjną	179
8.6.6. Wpływ badanych związków na morfologię jąder komórkowych	180
8.6.7. Wpływ badanych związków na indukcję procesu apoptozy w komórkach ...	181
9. Podsumowanie	183
Piśmiennictwo	187
Spis tabel	200
Spis rycin	202

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Wprowadzenie

Porosty są grupą niezwykle ciekawych i mało zbadanych organizmów. Zarówno ich wyjątkowa budowa, jak i zdolność do zasiedlania środowisk o trudnych warunkach glebowo-klimatycznych sprawia, że wytwarzają one szereg charakterystycznych, często niespotykanych u innych roślin, metabolitów wtórnych. Z tego też powodu zarówno porosty, jak i ich składniki chemiczne stanowią od ponad stu lat przedmiot zainteresowania naukowców, badających skład chemiczny oraz ich aktywność biologiczną i farmakologiczną. Ilość publikowanych prac dotyczących tej tematyki stale rośnie, pojawiają się też artykuły przeglądowe, obejmujące różne aspekty aktywności metabolitów porostowych. Napisano również kilka książek, porządkujących wiedzę na temat chemizmu i chemicznych metod badań tych wyjątkowych związków, wśród których najważniejsze wyszły spod pióra Williama i Chicity Culbersonów czy Sigfrieda Hunecka.

W Polsce temat ten nie jest zbyt popularny, wystarczy stwierdzić, że badaniami porostów zajmują się jedynie dwa ośrodki - poznański oraz krakowski. Warto tu wspomnieć o pionierskich pracach prof. dr hab. Henryka Gertiga z Katedry Farmakognozji UM w Poznaniu oraz dr hab. Marii Oświecimskiej z Katedry Farmakognozji ówczesnej Akademii Medycznej w Krakowie, obecnie UJ CM, którzy w latach 60 i 80 ubiegłego wieku zainicjowali badania nad składem i aktywnością polskich przedstawicieli rodzaju *Cladonia*. Ich badania, po wieloletniej przerwie, są obecnie kontynuowane w obydwu wspomnianych jednostkach, stanowiąc inspirację i podstawę do ich poszerzenia. Nie można nie wspomnieć również o działalności naukowej prof. dr hab. Marii Olech i jej zespołu badawczego z Instytutu Botaniki UJ, zajmujących się biogeografią, taksonomią i ekologią porostów, zwłaszcza obszarów polarnych. Nieliczne opracowania książkowe, opublikowane dotychczas w Polsce - Hanny Wójciak czy Zbigniewa Tobolewskiego - obejmują przede wszystkim kwestie botaniczno-ekologiczne: występowania, rozmieszczenia czy ochrony krajowych gatunków porostowych.

Jak już wspomniano, badania nad gatunkami porostów występujących w Polsce są bardzo nieliczne, a skład chemiczny tych organizmów może ulegać zasadniczym zmianom w zależności od warunków glebowo-klimatycznych. Obecna praca stanowi próbę zapoczątkowania badań jakościowych i ilościowych krajowych gatunków z rodzaju *Cladonia* i obejmuje porównawczą analizę trzech metabolitów wtórnych: kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotetrarowego. Warto natomiast w przyszłości poszerzyć ten zakres o inne związki, co dałoby pełniejszy obraz składu chemicznego. Analizowane metabolity były również badane w kierunku potencjalnej aktywności cytotoksycznej, co wpisuje się w ogólnoświatowe poszukiwania substancji pochodzenia naturalnego o spodziewanej aktywności przeciwnowotworowej.

2. Porosty

2.1. Definicja i pochodzenie nazwy

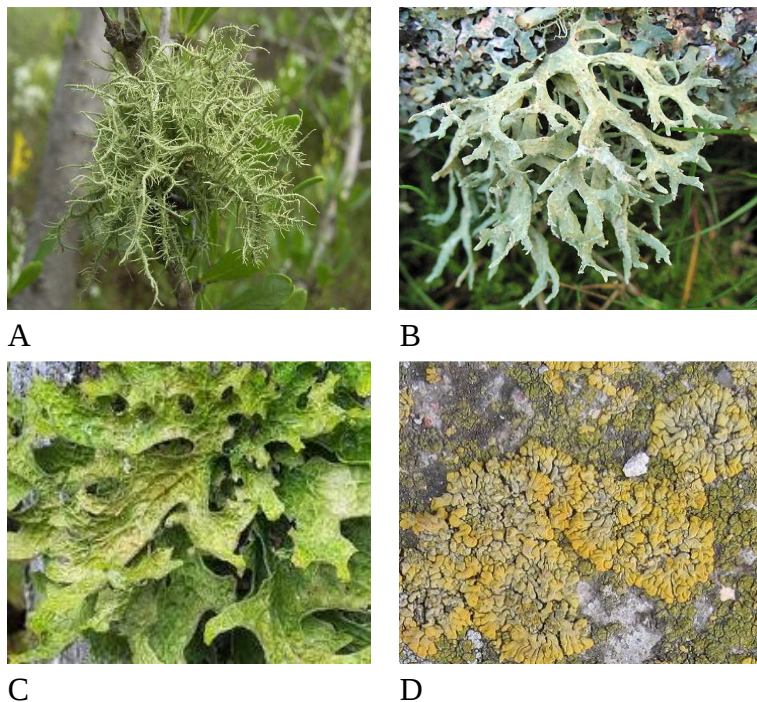
Porosty (*Lichenes*) czyli grzyby lichenizowane (*Fungi lichenisati*, *Lichenomycota*) są organizmami roślinnymi, zbudowanymi z dwóch komponentów: cudzożywnego grzyba, określanego jako mykobiont, oraz samożywnego glonu – fotobionta, pozostających wobec siebie w zależności symbiotycznej. Terminu *lichenes* (gr. *leichen* - porosty) użył po raz pierwszy Teofrast w IV w p.n.e. [Studzińska 2008]. Definicja, zaproponowana w 1988 r. przez Hawkswortha i aktualnie obowiązująca, opisuje porosty jako stabilną, samowystarczalną asocjację mikobionta i fotobionta, w której mikobiont jest partnerem zewnętrznym [Hawksworth 1988].

2.2. Budowa porostów

Ponad 98% grzybów, tworzących porosty, należy do workowców (*Ascomycota*), pozostałe 2 % to przedstawiciele podstawczaków (*Basidiomycota*) i grzybów niedoskonałych (*Deuteromycota*). Z kolei fotobionty, wchodzące w skład porostów, to albo organizmy prokariotyczne (sinice), albo eukariotyczne (glony). Spośród sinic w tworzeniu porostów biorą udział przedstawiciele 8 rodzajów: *Nostoc*, *Gleocapsa*, *Scytonema*, *Stigonema*, *Chroococcus*, *Hyella*, *Calothrix* i *Dichotrix*, natomiast glony należą do trzech gromad: zielenic (*Chlorophyta*), brunatnic (*Phaeophyta*) i różnowiciowców (*Xanthophyta*). W ponad połowie porostów fotobiontem jest przedstawiciel zielenic – *Trebouxia* [Podterob 2008].

Ciało porostu, noszące nazwę plechy, może mieć budowę homomeryczną (warstwową) lub heteromeryczną (niewarstwową). W plechach homeomerycznych elementy grzybowe, jak i te pochodzące od glonu, są rozmieszczone równomiernie, natomiast w plechach heteromerycznych tworzą wyraźne warstwy, tworząc korę górną (zwarte strzępki grzyba), warstwę glonową (glony pomiędzy strzępkami grzyba), warstwę miąższową (luźne strzępki grzyba) oraz korę dolną [Wójciak 2007].

Plecha porostów może przybierać różne formy: nitkowate, krzaczkowate, listkowate i skorupiaste (Ryc. 1). Plecha porostów nitkowatych (*Alectoria*, *Usnea*), przypomina swoim wyglądem proste lub rozgałęzione nitki, mogące osiągać od kilku cm do nawet 3 m długości. Porosty krzaczkowate (*Pseudevernia*, *Cetraria*) przypominają swoim wyglądem małe krzewinki, tworząc plechę o budowie obłych lub płaskich odcinków („gałązek”), odstającą od podłoża. Plecha porostów listkowatych (*Lobaria*, *Peltigera*) jest spłaszczona i przypomina drobne listki, których dolna strona przyczepiona jest luźno do podłoża za pomocą chwytników. Porosty skorupiaste natomiast (*Xanthoria*, *Rhizocarpon*), o powierzchni gładkiej lub spękanej, przyczepione są ściśle do podłoża lub nawet w nie wrastają [Wójciak 2007]. U niektórych gatunków (*Cladonia*, *Stereocaulon*) wykształciły się plechy dwupostaciowe: początkowo rozwijająca się plecha skorupiasta lub listkowata, z której wyrasta plecha wtórna w postaci podecjów [Wójciak 2007].



Rycina 1. Różne formy plechy porostów: A - nitkowata, B - krzaczkowata, C - listkowata, D - skorupiasta (fot. własna)

2.3. Rozmnażanie porostów

Porosty mogą rozmnażać się wegetatywnie lub generatywnie. Rozmnażanie wegetatywne odbywa się przez fragmentację plechy: wyrostki i urwistki. Wyrostki (izydia) to drobne, cienkie wypustki na powierzchni plechy, które łatwo się odłamują od plechy macierzystej i w ten sposób mogą tworzyć nowy organizm. Urwistki (soredia) to drobne elementy, zbudowane z jednej lub kilku komórek glonu, oplecionych strzępkami grzyba, przypominające proszek. Powstają one w tzw. soraliach – pęknięciach plechy, przez które wydostają się na zewnątrz. Fragmentacja plechy może być również przypadkowa [Szwejkowska 1993]. Rozmnażanie generatywne dotyczy jedynie komponentu grzybowego, który tworzy różne rodzaje owocników. Jeśli grzyb, tworzący porost, należy do workowców, wówczas jako owocniki tworzą się otocznie (perytecja) lub miseczki (apotecja), w których powstają zarodniki [Wójciak 2007].

2.4. Rozpowszechnienie porostów

Porosty są organizmami bardzo rozpowszechnionymi na kuli ziemskiej, występującymi na każdym kontynencie i w większości formacji roślinnych. Ich pionierski charakter, małe wymagania środowiskowe oraz samożywność pozwoliły na kolonizowanie obszarów trudno dostępnych dla roślin wyższych – terenów wysokogórskich (aż do wysokości 7400 m npm), polarnych, czy tundry.

Znanych jest około 18 500 gatunków porostów [Boustie 2005], z czego około 1600 występuje w Polsce [Fałtynowicz 2003]. Porosty mogą występować na skałach (epility), glebie (epigeity), korze drzew (epifity), liściach roślin (epifility), mszakach (epibryofity) czy drewnie (epiksylity) [Wójciak 2007]. Czasami można zaobserwować porosty rosnące na skorodowa-

nym metalu, dachówkach czy betonie. Ciekawym zjawiskiem jest występowanie porostów na czaszkach ludzkich, określanych jako *Usnea humana*, *Usnea Cranii Humanii*, *Muscus ex cranio humano* czy „mch na czaszce zmarłego” (ang. moss of a dead man’s skull) [Modenesi 2009].

Istnieją jednak rejony, określane mianem pustyni porostowych, gdzie porosty praktycznie nie występują, prawdopodobnie ze względu na zanieczyszczenie powietrza – duże miasta, centra przemysłowe. Trudno znaleźć porosty także na polach uprawnych, mokrych łąkach (trzciniowiska, turzycowiska), czy miejscach stale zalewanych słoną lub słodką wodą [Matwiejuk 2008].

2.5. Identyfikacja gatunków – reakcje mikrochemiczne

W celu wstępnej identyfikacji poszczególnych gatunków porostów stosuje się prosty system mikrochemicznych reakcji barwnych. Kilka kropli odczynnika, nałożonych na fragment plechy, daje kolorową reakcję, według której można zorientować się nie tylko co do rodzaju czy gatunku, ale też wstępnie określić obecność niektórych metabolitów porostowych. Testy te można wykorzystywać nawet w terenie, podczas zbioru surowca.

Odczynniki używane najczęściej do oznaczania porostów oraz przykładowe reakcje barwne zebrano w Tabeli 1.

Tabela 1. Odczynniki wykorzystywane do reakcji mikrochemicznych [wg. Orange 2001, Martin 1971]

SYMBOL	NAZWA CHEMICZNA	PRZYKŁADOWE REAKCJE BARWNE - METABOLITY	PRZYKŁADOWE REAKCJE BARWNE - GATUNKI
K	10% wodny roztwór wodorotlenku potasu	K+ żółty: atranoryna, kwas tamno- liowy K+ krwistoczerwony: kwas salazynowy, kwas norstiktowy	K+ cytrynowożółty: <i>Pertusaria corallina</i> K+ żółty: <i>Cladonia polydactyla</i> K+ purpurowy: <i>Xanthoria parietina</i>
C	nasycony wodny roztwór podchlorynu wapnia, stosowany po reakcji z K (oznaczenie KC)	KC+ żółty: kwas usninowy KC+ czerwony: kwas gyroforowy, kwas lekanorowy	KC+ czerwony: <i>Cladonia merochlorophea</i> KC+ różowy: <i>Ochrolechia androgyna</i>
P lub Pd	10% etanolowy roztwór parafenylenodwuaminy przygotowany <i>ex tempore</i>	P+ ciemnożółty: kwas norstiktowy, kwas salazynowy P+ ciemnoczerwony: kwas fumaroprotocetrarowy	P+ pomarańczowy: <i>Parmelia sulcata</i> , <i>Hypogymnia physodes</i> P+ pomarańczowo- czerwony: <i>Cladonia pyxidata</i>

+ reakcja pozytywna

2.6. Znaczenie i zastosowanie pozalecznicze porostów

Dzięki swej wyjątkowej budowie i wynikającej z niej niezależności w opanowywaniu różnych środowisk, oraz ciekawemu składowi chemicznemu, porosty mają duże znaczenie zarówno w swoim środowisku naturalnym, jak i dla człowieka. W przyrodzie porosty są ważnym elementem glebotwórczym, odpowiadają również za gromadzenie wody, przez co zapewniają odpowiednie funkcjonowanie zbiorowisk leśnych, w których występują. Mogą ponadto stanowić schronienie i źródło pożywienia dla niektórych zwierząt, zwłaszcza bezkręgowców, ale i reniferów. Swoją obecnością wskazują także na stopień zanieczyszczenia środowiska. Człowiek wykorzystywał porosty od stuleci, w celach zarówno pozamedycznych, jak i leczniczych. Porosty stanowiły źródło pożywienia, były także wykorzystywane jako środki barwiące czy utrwalače zapachu w przemyśle perfumeryjnym.

2.6.1. Wykorzystanie spożywcze

Porosty były używane jako źródło pożywienia w czasach głodu, mimo swojej stosunkowo niskiej wartości odżywczej. W Japonii spożywano plechy kruszownicy jadalnej (*Umbilicaria esculenta*), na Islandii i w Laponii sproszkowane plechy płucnicy islandzkiej (*Cetraria islandica*) i mąkli tarniowej (*Evernia prunastri*) dodawano do wypieku chleba [Matwiejuk 2008]. Na pustynnych terenach Azji i Afryki do dziś spożywa się plechy misecznicy jadalnej (*Lecanora esculenta*), która uważana jest za biblijną mannę [Bystrek 1987].

2.6.2. Wykorzystanie w przemyśle kosmetycznym i farbiarskim

Porosty znalazły również szerokie zastosowanie w przemyśle kosmetycznym, a zwłaszcza perfumeryjnym. Są one dodawane do past do zębów jako środek zapobiegający namnażaniu bakterii [Ghione 1988], do antyperspirantów jako środki przeciwpotne i zapachowe [Bystrek 1987], do preparatów chroniących przed nadmiernym promieniowaniem UV [Fernandez 1996]. W przemyśle perfumeryjnym, głównie we Francji, wykorzystuje się dwa gatunki, mąklika otrębiastego (*Pseudevernia furfuracea*), określanego jako mech drzewny (ang. tree moss) i mąklę tarniową (*Evernia prunastri*), zwaną mchem dębowym (ang. oak moss). Zużycie tych gatunków liczy się w tysiącach ton rocznie, a służą one jako tzw. utrwalače zapachów oraz źródło zapachu leśno-morskiego [Joulain 2009].

Porosty były wykorzystywane również jako źródła barwników. Z plech rodzaju *Rocella* i *Ochrolechia* otrzymywano barwniki koloru niebieskiego, czerwonego czy purpurowego, z rodzaju *Parmelia* brązowego, a z rodzaju *Usnea* i *Alectoria* odpowiednio pomarańczowego i żółtego [Studzińska 2008]. Również lakmus, niebieski barwnik wykorzystywany do określania odczynu pH, produkowano poprzez fermentację wyciągów z porostów rodzaju *Rocella* [Müller 2001].

2.6.3. Lichenoindykacja

Większość porostów jest wrażliwa na zanieczyszczenia środowiska, zatem mogą one być używane jako tzw. bioindykatory, wskazujące na stopień skażenia środowiska dwutlenkiem siarki, metalami ciężkimi czy pierwiastkami radioaktywnymi. Największą wrażliwością charakteryzują się porosty o budowie nitkowatej i krzaczkowatej, zwłaszcza gatunki z rodzaju brodaczka (*Usnea*), mające dużą powierzchnię chłonną. Trochę bardziej odporne na zanieczyszczenia są gatunki o budowie listkowatej, natomiast wysoką odpornością cechują się porosty skorupiaste. Na podstawie obserwacji obecności gatunków porostowych na danym obszarze na przestrzeni lat tworzy się tzw. mapy lichenoindykacyjne [Wójciak 2007, Studzińska 2008]. Można również stosować tzw. metodę transplantacji plech z terenów czystych do miejsc, których stopień skażenia chce się określić. Wykorzystuje się tu przede wszystkim plechy pustułki pęcherzykowatej (*Hypogymnia physodes*), oceniając ich żywotność po pewnym czasie od transplantacji, co wskazuje na stopień zanieczyszczenia środowiska [Białońska 2005]. Wyjątek stanowi misecznica proszkowata (*Lecanora conizaeoides*), porost o budowie skorupiastej, całkowicie odporny na skażenia dwutlenkiem siarki i innymi czynnikami, a wręcz wymagający do swojego wzrostu obecności zanieczyszczeń [Huneck 1999].

2.7. Zastosowanie lecznicze porostów

Znaczenie lecznicze porostów w chwili obecnej ogranicza się do ich zastosowania w schorzeniach dróg oddechowych, jednak w minionych wiekach były one wykorzystywane niemal jako panaceum. Porosty wykorzystywano do celów leczniczych od bardzo dawna. W starożytnych Chinach stosowano nalewki wykrztuśne na bazie wyciągów z brodaczek (*Usnea*), a sproszkowane plechy gatunków z tego rodzaju zalecano jako puder na zmiany skórne i owrzodzenia [Bystrek 1987]. W starożytnym Egipcie porosty wykorzystywano do balsamowania zwłok, a Hipokrates zalecał preparaty z brodaczek w schorzeniach kobiecych [Matwiejuk 2008].

Lecznicze wykorzystanie porostów w średniowieczu i późniejszych wiekach wynikało przede wszystkim z teorii sygnatur, kojarzącej choroby z wyglądem plech porostów. I tak, porosty o budowie nitkowatej (*Usnea*, *Bryoria*) stosowano w problemach z porostem włosów, listkowate plechy granicznika płucnika (*Lobaria pulmonaria*), o specyficznej budowie przypominającej płuca, zalecano w schorzeniach dróg oddechowych, natomiast złotorost ścienny (*Xanthoria parietina*) ze względu na swoje zabarwienie był wskazany w leczeniu schorzeń wątroby i dróg żółciowych [Matwiejuk 2008]. Wspomniane wcześniej porosty rosnące na czaszkach (głównie *Evernia* sp. i *Pseudevernia* sp.) stanowiły w średniowieczu niezwykle cenny surowiec leczniczy, stosowany w leczeniu krwawień, biegunek, bólów głowy czy epilepsji. Wchodziły także w skład maści *Unguentum Armarium*, której lecznicze działanie objawiało się po nałożeniu jej na broń, którą zadano ranę lub, rzadziej, na samą ranę [Modenesi 2009].

W wieku XIX i w pierwszej połowie XX wieku na Wyspach Szetlandzkich oraz w Meksyku i Arizonie porosty z rodzaju *Parmelia*, *Xanthoparmelia* czy *Ramalina* były mieszane z tytoniem i palone w charakterze papierosów, o rzekomo stymulującym i halucynogennym działaniu. Efekt ten nie został ostatecznie udowodniony, nie znaleziono również substancji

występującej we wszystkich tych gatunkach, która mogłaby być odpowiedzialna za takie działanie [Hawksworth 2004].

Jednym z cenniejszych gatunków leczniczych, stanowiącym podstawę wymiany handlowej już od XV w., jest płucnica islandzka (*Cetraria islandica*). Wbrew nazwie nie występuje ona wyłącznie na Islandii, lecz właśnie kraje skandynawskie są jej głównym eksporterem. Surowiec leczniczy stanowią wysuszone plechy tego gatunku, określane jako porost islandzki (*Lichen islandicus*). Jest to surowiec farmakopealny, obecny w Farmakopei Polskiej VIII, Farmakopei Europejskiej oraz farmakopeach wielu krajów. Wykorzystywany był od dawna w leczeniu schorzeń układu oddechowego, zwłaszcza gruźlicy – leczony tym surowcem był m.in. Fryderyk Chopin [Bystrek 1987]. Ze względu na obecność polisacharydów zaleca się stosowanie tego surowca w schorzeniach dróg oddechowych, jako lek osłaniający i łagodnie wykrztuśny, a także w schorzeniach przewodu pokarmowego – niedokwaśności, zaburzeniach trawienych – ze względu na obecność gorzkich kwasów porostowych [Kohlmünzer 1998, Matławska 2008]. Obecnie na rynku dostępnych jest kilka preparatów, zawierających wyciągi z porostu islandzkiego, m.in. płyn wykrztuśny Pectosol (Herbapol Pruszków), pastylki do ssania Isla (Engelhard Arzneimittel) i Dolo-Angin (Divapharma-Knufinke). W ostatnim czasie pojawiły się także dwa suplementy diety, Erotic dla kobiet i Erotic dla mężczyzn (Gorvita), określane jako „afrodyzjaki”, zawierające między innymi porost islandzki, jednak jego obecność w tych preparatach jest trudna do uzasadnienia. Ponadto, wyciąg z porostu islandzkiego można znaleźć w wybielającej paście do zębów BlanX (Coswell).

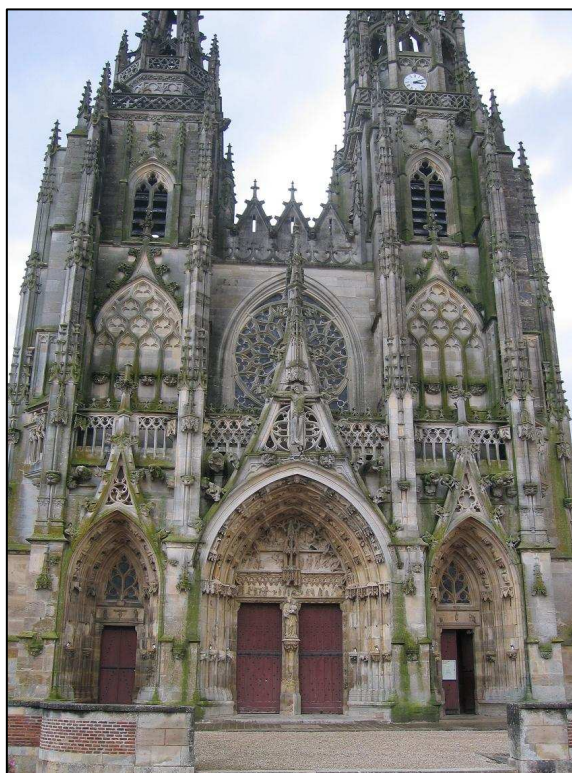
2.8. Działania niekorzystne

2.8.1 Wywoływanie alergii

Jednym z najpoważniejszych efektów ubocznych stosowania kosmetyków zawierających wyciągi z porostów jest alergia kontaktowa. Zjawisko to jest udokumentowane w kilku przypadkach, zwłaszcza dotyczących stosowania perfum opartych na tzw. absolucie mchu dębowego [Hiserodt 2000, Stinchi 1997, Sheu 2006].

2.8.2. Uszkodzanie budynków

Porosty o charakterze epilitów mogą stanowić czynnik uszkadzający zabytkowe budowle czy pomniki. Kolonizując kamienne powierzchnie mogą powodować ich uszkodzenie przy pomocy swoich wtórnych metabolitów, zwłaszcza kwasów porostowych. Najbardziej znanym przykładem takiej działalności jest katedra we włoskim mieście Orvieto, której tympanon głównej fasady jest intensywnie skolonizowany przez porosty z gatunku *Haematomma ochroleucum* i *Lecanora atra*, a marmurowy portal przez *Dirina massiliensis*. Powoduje to nie tylko zmiany wyglądu ale i drobne uszkodzenia powierzchni katedry. Obecność innych gatunków z rodzaju *Lecanora* została stwierdzona na wielu pomnikach z okresu starożytnego Rzymu. Na różnych zabytkach znaleziono również gatunki z rodzaju *Candelariella*, *Caloplaca* czy *Bagliettoa* [Lisci 2003]. Ściany katedry Notre Dame w l'Epine (Francja) pokryte są zielonymi porostami (Ryc.2) *Caloplaca citrina* i *Pheophyscia orbicularis* [Deruelle 1979].



Rycina. 2. Przykład niszczycielskiej działalności porostów - Katedra Notre Dame w l'Epine (fot. własna)

2.9. Metabolity porostowe

Pod koniec XIX i na początku XX w., wraz z rozwojem metod chemii analitycznej oraz farmakologii, zaczęto badać zarówno skład, jak i aktywność farmakologiczną i biologiczną porostów, co doprowadziło do izolacji i określenia struktury wielu metabolitów porostowych, oraz udokumentowania dotychczasowych kierunków działania i zastosowania porostów [Hunneck 1999]. Podstawy chemicznej identyfikacji porostów stworzył pod koniec XIX w. Wilhelm Zopf, niemiecki chemik, ale prawdziwym przełomem był cykl badań prowadzonych w latach 1920-1958 przez japońskich badaczy Yasuhiko Asahina i Shōji Shibata, opisujących kolejne struktury metabolitów wyizolowanych z różnych gatunków porostów. W latach 60 i 70 XX w. ukazały się kompilacje dotyczące metod badań oraz składu porostów autorstwa amerykańskiego małżeństwa badaczy Williama i Chicity Culbersonów, natomiast na przełomie XX i XXI w. podobne kompilacje, uzupełnione o najnowsze informacje, opublikował Siegfried Hunneck, określając ilość znanych obecnie struktur metabolitów porostowych na ponad 800 [Hunneck 1999].

2.9.1. Podział substancji porostowych

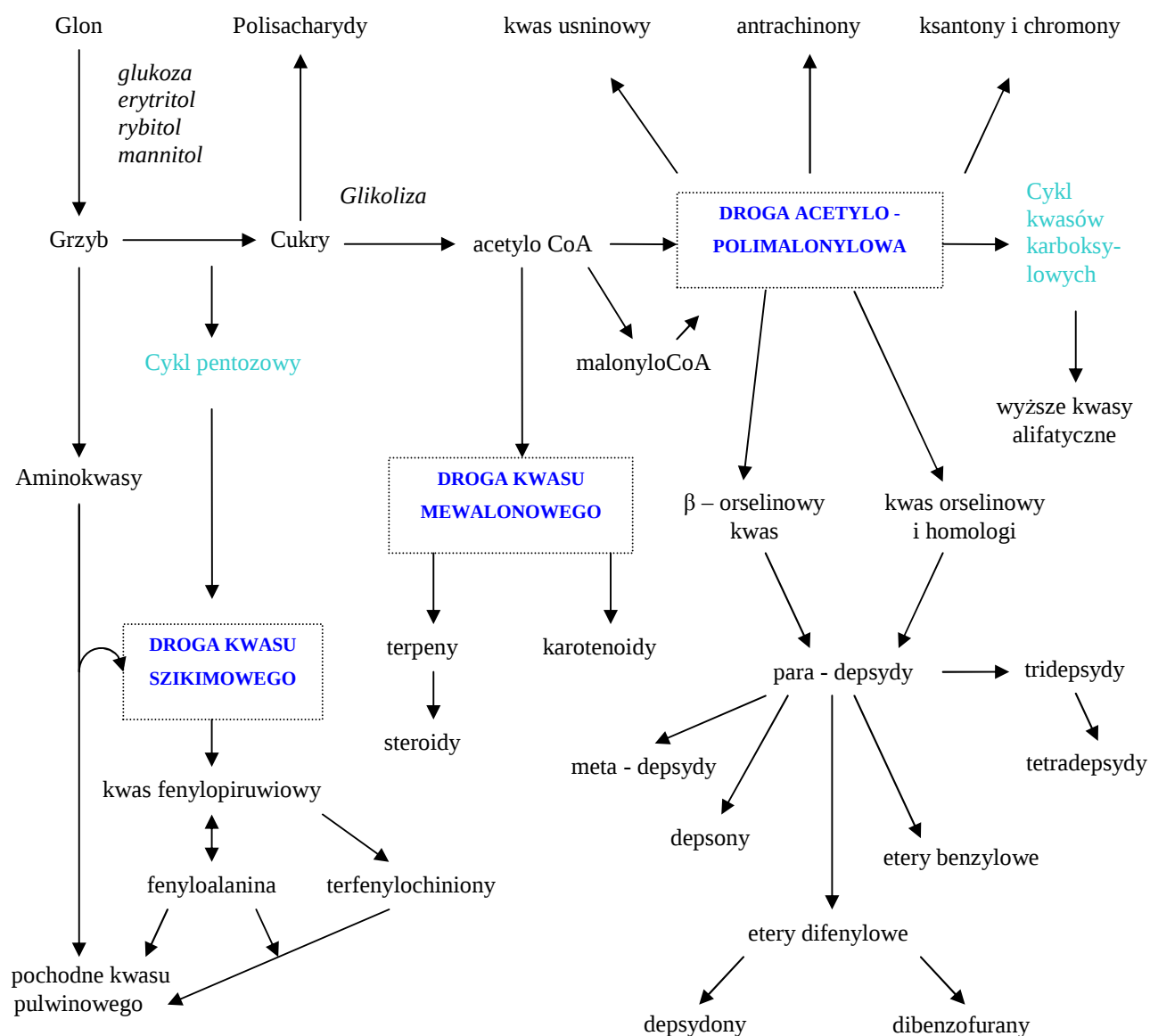
Różni autorzy podchodzą do zagadnienia klasyfikacji metabolitów porostowych w odmienny sposób, co wprowadza swego rodzaju zamieszanie. Spośród kilku opracowań przeglądowych, dotyczących podziału substancji występujących w porostach [Culberson 1979,

Podterob 2008, Boustie 2005, Huneck 1999, Muller 2001], niektórzy autorzy potraktowali temat wybiórczo, przedstawiając jedynie tę część związków, która wykazuje ciekawą aktywność biologiczną czy farmakologiczną [Podterob 2008, Boustie 2005]. Dużo bardziej przejrzysty podział substancji porostowych, opierający się na biogenezie tych związków zastosowali Culberson 1979 oraz Huneck [Culberson 1979, Huneck 1999]. Warto zwrócić uwagę także na pracę Edwardsa, która nie jest opracowaniem przeglądowym, a jednak zawiera niezwykle ciekawy schemat (Ryc. 3), przedstawiający nie tylko klasyfikację metabolitów porostowych, ale i ich wzajemne relacje biochemiczne [Edwards 2003].

W niniejszej pracy przyjęto podział metabolitów porostowych według ich biogenezy, w większości opierając się na opracowaniach Culbersona i Hunecka, a także na schemacie podawanym przez Edwardsa, z niewielkimi modyfikacjami. Podział ten przedstawiono w Tabeli 2.

Większość substancji określanych jako metabolity porostowe lub kwasy porostowe została wyprodukowana przez komponentę grzybową, wskazują na to doświadczenia przeprowadzone na hodowlach *in vitro* rozdzielonych mykobiontów i fotobiontów. Wyjątki stanowią gatunki, w których fotobiontem są sinice, zdolne produkować specyficzne nostoklidy (butyrolaktony z podstawnikiem chlorowcowym), oligopeptydy czy pochodne aminokwasów [Boustie 2005].

Substancje występujące w porostach można ogólnie podzielić na metabolity pierwotne i wtórne. Metabolity pierwotne spotykane w porostach - cukrowce, związki azotowe, kwasy karboksylowe czy witaminy - są również rozpowszechnione wśród innych roślin. Warto zwrócić uwagę na specyficzne porostowe polisacharydy - licheninę i izolicheninę czy związek ze wspomnianej już grupy oligopeptydów - pikrorocelinę, gdyż są to struktury specyficzne dla porostów.



Rycina 3. Schemat biogenetycznych i biochemicznych powiązań między metabolitami porostowymi [wg. Edwards 2003]

Tabela 2. Podział metabolitów porostowych ze względu na ich biogenezę

METABOLITY PIERWOTNE	
nazwa grupy	przykłady związków
1. produkty fotosyntezy:	
- poliole/alkohole cukrowe	rybitol, arabitol, glicerol, mannitol
- monosacharydy	arabinoza, fruktoza, glukoza, galaktoza
- oligosacharydy	trehaloza, sacharoza, peltigerozyd, umbicylina
- polisacharydy	lichenina, izolichenina, pustulan
2. kwasy karboksylowe	kwasy: cytrynowy, szczawiowy, bursztynowy
3. związki azotowe:	
- aminy	cholina, etanolamina, trimetyloamina
- aminokwasy	alanina, glutamina, leucyna, tryptofan
- oligopeptydy	pikrorocelina
- enzymy	amylaza, katalaza, lichenaza, inwertaza
4. witaminy	biotyna, witamina C, kwas foliowy, witamina B ₁
METABOLITY WTÓRNE	
SZLAK ACETYLO-POLIMALONYLOWY	
nazwa grupy	przykłady związków
1. wyższe kwasy alifatyczne	kwasy: linolowy, protolichesterynowy, rangiformowy, rocellowy, tetrahydroksyheneikozanowy
2. fenolowe pochodne kwasu karboksylowego:	
A. pochodne monocykliczne	orcynol, montagnetol
B. estry di- i triarylowe pochodne orcynolu:	
- para- i tridepsydy	kwasy: ewerniowy, lekanorowy, oliwetorowy
- metadepsydy	kwasy: homosekikowy, ramalinowy, boninowy
- depsydony	kwasy: lobarowy, alektoronowy, fyzodowy
- depsony	kwas pikrolichenowy
C. estry diarylowe pochodne β- orcynolu:	

- paradepsydy	atranoryna, chloroatranoryna, kwasy: skwamatowy, barbatowy, difraktowy
- metadepsydy	kwasy: tamnoliowy, hypotamnoliowy
- depsydony	kwasy: fumaroprocettrawowy, norstiktowy, stiktowy, psoromowy, salazynowy,
- estry benzylowe	kwasy barbatolowe
D. dibenzofurany	kwasy: didymowy, porfiryliowy, pannarowy
3. kwasy usninowe	kwasy: (+) i (-)-usninowy, (+) i (-)-izousninowy
4. chromony	kwasy leprariowe, sordidon
5. ksantony	artotelina, licheksanton, kwas tiofanowy
6. antrachinony	chryzofanol, emodyna, endokrocyna, fragilina, nefromina, parietyna, kwas rodokladoniowy
7. naftochinony	naftazaryna, euplektyna
SZLAK KWASU MEWALONOWEGO	
1. karotenoidy	karoteny (α , β , γ), wiolaksantyna, ksantofil
2. sterole	ergosterol, β -sitosterol, fungisterol
3. terpenoidy:	
A. diterpeny	nefryna, (-)-16 α -hydroksykauren
B. triterpeny	kwasy ursolowe, zeoryna, kwas pyksinowy, frydelina, 7 β -acetoksy-22-hydroksyhopan
SZLAK KWASU SZIKIMOWEGO	
1. terfenylochinony	kwasy: poliporowe, teleforowe
2. pochodne kwasu pulwinowego	kalicyna, epanoryna, kwasy: wulpinowe, pulwinowe, rizo-karpowe

Większość wtórnych metabolitów porostowych powstało biogenetycznie na drodze acetylo-polimalonylowej i są to zazwyczaj struktury typowe dla porostów (tzw. kwasy porostowe), podobnie jak związki pochodzące ze szlaku kwasu szikimowego (pochodne kwasu pulwinowego), podczas gdy produkty przemian szlaku kwasu mewalonowego (karotenoidy, sterole, terpeny) to związki spotykane również w roślinach wyższych. Wyjątek wśród grupy szlaku acetylo-polimalonylowego stanowią antrachinony i naftochinony, struktury spotykane także wśród innych roślin. Ciekawym przykładem jest też atranoryna, będąca przedmiotem badań w tej pracy, której występowanie, poza porostami, opisano również u niektórych mchów [Wang

2005] czy przedstawicieli roślin wyższych z rodzin *Dipterocarpaceae* [Nasser 2009], *Ochnaceae* [De Carvalho 2000, De Carvalho 2000a] czy *Fabaceae* [Mutai 2007].

2.9.2. Znaczenie metabolitów dla porostów

Produkcja tak specyficznych związków przez porosty może być tłumaczona w różny sposób. Substancje te mogą być wykorzystywane przez porosty jako swoista obrona przeciwko różnym czynnikom, zagrażającym ich wzrostowi: drobnoustrojom patogennym, promieniowaniu czy zwierzętom roślinożernym [Huneck 1999]. Obrona przeciwko drobnoustrojom patogennym jest konieczna w przypadku porostów jako organizmów rosnących wolno, i wynika z przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej aktywności metabolitów porostowych [Ingolfssdottir 1985]. Niektórym z substancji porostowych udowodniono działanie absorbujące promieniowanie UV, przez co porost jest chroniony przed skutkami nadmiernego promieniowania [Fernandez 1995, 1998, Rancan 2002, Kohlhardt-Floehr 2010]. Wtórne metabolity porostowe, takie jak kwas usninowy, norstiktowy czy psoromowy, tworzą kompleksy z metalami (K, Cu, Fe) i w ten sposób zapewniają stałą obecność tych elementów w podłożu, co jest korzystne do rozwoju porostu [Huneck 1999, Hauck 2009]. Kwasy porostowe są również toksyczne dla niektórych zwierząt - owadów, ślimaków, gryzoni – i w ten sposób, działając jako deterenty pokarmowe, ochraniają porost przed zniszczeniem [Nybakken 2006, Nybakken 2010, Pöykkö 2005].

3. Charakterystyka rodzaju *Cladonia*

3.1. Rozpowszechnienie

Jednym z ważniejszych rodzajów porostów występujących w Polsce jest rodzaj chrobotek (*Cladonia*), obejmujący kilkadziesiąt gatunków. Porosty z tego rodzaju występują przede wszystkim w suchych lasach sosnowych, tworząc charakterystyczne zbiorowiska leśne noszące nazwę borów chrobotkowych (*Cladonio-Pinetum*), gdzie wraz z mchami stanowią elementy runa leśnego (*C. rangiferina*, *C. arbuscula*, *C. tenuis*, *C. impexa*, *C. gracilis*, *C. furcata* i in.). W młodych zagajnikach sosnowych przeważają nieco inne gatunki *Cladonia*, np. *C. minor*, *C. pyxidata*, *C. macilenta* czy *C. chlorophea*. Chrobotki wchodzi także w skład zbiorowisk określanych jako murawy szczytlichowe (*Corynephoretum canescentis*), ponadto występują w miejscach otwartych, silnie nasłonecznionych, na wrzosowiskach a także wydmach szarych (*C. mitis*, *C. uncialis*, *C. foliacea*, *C. floerkeana*, *C. subulata* i in.). Na torfowiskach wysokich można spotkać *Cladonia impexa*, *C. alpestris* czy *C. squamosa* [Tobolewski 1972].

3.2. Budowa plechy

Chrobotki mają zazwyczaj plechę dwupostaciową – pierwotną i wtórną [Wójciak 2007]. Plecha pierwotna jest zwykle skorupiasta, łusczkowata lub listkowata, trwała lub wcześniej zanikająca, o budowie homeomerycznej, po górnej stronie okorowana. Podecja zwykle są wzniesione, mogą rosnąć pojedynczo lub w murawkowatych skupieniach (murawkach), są zakończone szydłowato, różowato, tępo lub kieliszkowato. Mogą być pojedyncze lub rozgałęzione, piętorkowo, widełkowato lub nieregularnie. Powierzchnia podecjów jest zwykle gładka, pilśniowata lub pokryta sorediami. Na szczytach podecjów występują owocniki oraz brunatne lub czerwone pyknidia. W skład plechy wchodzi najczęściej glony z rodzaju *Cystococcus* [Tobolewski 1972].

3.3. Ochrona gatunkowa

Spośród kilkudziesięciu gatunków chrobotków występujących w Polsce, dwa gatunki są pod ochroną ścisłą (*Cladonia stellaris*, *C. stygia*), a cztery pod ochroną częściową (*Cladonia arbuscula*, *C. ciliata*, *C. portentosa*, *C. rangiferina*) [Dziennik Ustaw 2004]. Według czerwonej listy gatunków polskich, dwa gatunki chrobotków uznano za regionalnie wymarłe, osiem gatunków uzyskało status krytycznie zagrożonych, siedem gatunków określono jako wymierające, jeden gatunek jest narażony i jeden bliski zagrożenia [Mirek 2006]. Zestawienie gatunków wciągniętych na czerwoną listę przedstawia Tabela 3.

Tabela 3. Gatunki chrobotków zagrożone na terenie Polski [wg. Mirek 2006]

RODZAJ ZAGROŻENIA	GATUNEK
Bliski zagrożenia NT	<i>Cladonia sulphurina</i>
Narażony VU	<i>Cladonia macrocreas</i>
Wymierający E	<i>Cladonia bellidiflora</i> <i>Cladonia botrytes</i> <i>Cladonia caespiticia</i> <i>Cladonia incrassata</i> <i>Cladonia parasitica</i> <i>Cladonia stellaris</i> <i>Cladonia turgida</i>
Krytycznie zagrożony CR	<i>Cladonia acuminata</i> <i>Cladonia amaurocrea</i> <i>Cladonia brevis</i> <i>Cladonia carneola</i> <i>Cladonia macrophylla</i> <i>Cladonia peziziformis</i> <i>Cladonia strepsilis</i> <i>Cladonia subcervicornis</i>
Regionalnie wymarły RE	<i>Cladonia cyanipes</i> <i>Cladonia decorticata</i>

NT (nearly threatened) – gatunek bliski zagrożenia

VU (vulnerable) – gatunek narażony

E (extinct) – gatunek wymierający

CR (critically endangered) – gatunek krytycznie zagrożony

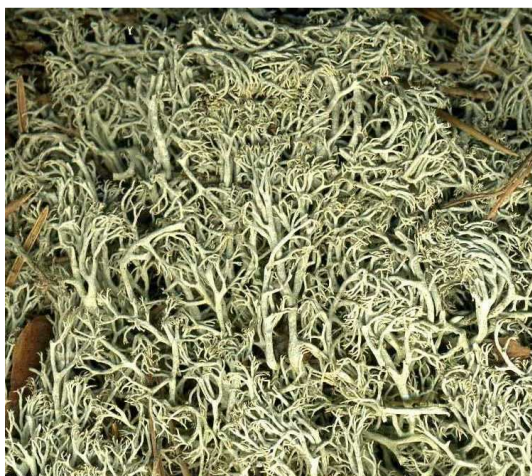
RE (regionally extinct) – gatunek regionalnie wymarły

3.4. Badania aktywności biologicznej i farmakologicznej

Gatunki rodzaju *Cladonia* były badane pod kątem różnych aktywności. Wyciągi chloroformowe, acetonowe, metanolowe, etanolowe i wodne z tych gatunków charakteryzowały się aktywnością przeciwdrobnoustrojową [Aslan 2006, Ingolfssdottir 1985, Saenz 2006, Yilmaz 2004, Perry 1999, Halama 2004], cytotoksyczną [Ingolfssdottir 2000, Bezivin 2003, Perry 1999], antymitotyczną [Oświecimska 1979], antyoksydacyjną i chemoprewencyjną [Ingolfssdottir 2000, Aslan 2006], przeciwzapalną i przeciwbólową [Ingolfssdottir 2000, Süleyman 2002, Maia 2002, da Costa Silva 2010], określano także ich działanie wobec innych roślin [Ramaut 1976], owadów [Bomfim 2009] czy ślimaków [Clark 1999].

Aktywność gatunków z rodzaju *Cladonia*, które są przedmiotem niniejszej pracy, zostanie opisana przy omówieniu tych gatunków.

4. Charakterystyka gatunków badanych w pracy



Cladonia arbuscula



Cladonia gracilis



Cladonia furcata



Cladonia macilenta ssp. *floerkeana*



Cladonia subulata



Cladonia uncialis

Rycina 4. Zdjęcia opisywanych gatunków (fot. własna)

4.1. Systematyka [Bystrek 1997]

Królestwo: Grzyby (*Fungi*)

Gromada: Porosty (*Lichenes*)

Klasa: Porosty workowe (*Ascolichenes*)

Rząd: chrobotkowce (*Cladoniales*)

Rodzina: chrobotkowate (*Cladoniaceae*)

Rodzaj: chrobotek (*Cladonia*)

Gatunek: chrobotek leśny (*Cladonia arbuscula*)

chrobotek wysmukły (*Cladonia gracilis*)

chrobotek widlasty (*Cladonia furcata*)

chrobotek Floerkego (*Cladonia macilenta* ssp. *floerkeana*)

chrobotek rogokształtny (*Cladonia subulata*)

chrobotek gwiazdkowaty (*Cladonia uncialis*)

4.2. *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flotow [syn. *C. sylvatica* auct.] – chrobotek leśny



4.2.1. Opis botaniczny

Plecha pierwotna skorupiasta, bardzo wczesnie zanikająca. Podecja puste w środku, wysokości 2-10 cm, grubości 0.7-2 mm, rozgałęzione 3-4 dzielnie lub widelkowato, na zakończeniach po 2-4 gałązki, łukowato zgięte w jedną stronę. W miejscach rozgałęzień otworek. Podecja nie pokryte korą, o powierzchni pilśniowatej, koloru żółtozielonego lub szarzielonego, gorzkie w smaku. Na szczycie podecjów brązowe pyknidia. Na szczytach gałązek, w górnej części podecjów bardzo rzadko występują apotecja lecideowe (brązowe), średnicy 0.5-0.8 mm [Wójciak 2007, Tobolewski 1972].

4.2.2. Występowanie i identyfikacja mikrochemiczna

Gatunek pospolicie rosnący w suchych borach sosnowych i lasach mieszanych, na niżu i w górach aż po piętro hal [Wójciak 2007, Tobolewski 1972]. Gatunek pod częściową ochroną [Dziennik Ustaw 2004]. Pd+ czerwone; K-

4.2.3. Skład chemiczny

metabolity porostowe:

- kwas usninowy [Gertig 1961, Oświecimska 1987, Piercey-Normore 2007, Ingolfssdottir 1998, Nybakken 2010], (+)-usninowy, [Culberson 1979, Kinoshita 1997, Einarsdottir 2010, Bucar 2004]
- kwas fumaroprotocetrarowy [Culberson 1979, Piercey-Normore 2007, Nybakken 2010]

pozostałe metabolity:

- kwas ursolowy [Culberson 1979]
- β -karoten [Barbosa-Filho 2007]
- polisacharydy typu laminaranu, β -D-glukany, Man:Gal:Glu 57:40:3 [Carbonero 2002]
- aminokwasy, enzymy [Culberson 1979]
- kwas askorbowy, kwas foliowy [Culberson 1979]
- Cu, Fe, Mn, Zn, Pb, Po, Ra [Culberson 1979]

4.2.4. Aktywność

Plechy *Cladonia sylvatica* gotowano przez 20 minut w wodzie wodociągowej. Uzyskany ekstrakt zagęszczono i badano pod kątem aktywności hamującej wzrost korzeni w teście *Allium*. Wyciąg z *Cladonia sylvatica* silnie hamował wzrost korzeni cebuli, powodując zahamowanie w 98 % po 24 godzinach inkubacji w stężeniu 0.10 g surowca/100 cm³ wody. Ponadto porównano aktywność w teście *Allium* wyciągów z plech *Cladonia sylvatica*, zebranych w różnych lokalizacjach na terenie Polski (Orzysz, Okręglík) w latach 1973-1977 oraz w Finlandii w roku 1977. Nie zaobserwowano istotnych różnic w hamowaniu wzrostu korzeni pomiędzy wyciągami z plech różnych lokalizacji i zebranych w różnym czasie, wartości zahamowania mieściły się w przedziale 89.2-98%. Dodatkowo wyciąg wodny z *Cladonia sylvatica* został przebadany pod kątem aktywności antymitotycznej w teście *Allium*. Badany wyciąg charakteryzował się wysoką aktywnością, powodując zahamowanie mitozy w 90% już po 4 h inkubacji, oraz 100% zahamowanie po 24 h, podczas gdy substancja referencyjna (Proresid) po 24 h hamowała mitozę w 75% [Oświecimska 1979].

W kolejnym eksperymencie ta sama grupa autorów określała wpływ przechowywania wyciągów wodnych i etanolowych z *Cladonia sylvatica* w różnych warunkach na ich aktywność biologiczną. Wyciągi wodne były przechowywane w temperaturze pokojowej (w ciemności oraz na świetle dziennym) oraz w lodówce przez 31, 40, 72, 78, 92, 116, 152, 365 i 426 dni, natomiast wyciągi etanolowe przechowywano w temperaturze pokojowej przez 6 tygodni i 12 miesięcy. Obydwa rodzaje wyciągów przechowywano również w postaci wyciągów suchych przez 1, 4 i 6 (wodne) lub 1 i 2 (etanolowe) lata. Aktywność biologiczną określano testem *Al-*

lium. Wykazano, że aktywność hamująca wzrost korzeni *Allium* malała wraz z przechowywaniem obu rodzajów wyciągów, niezależnie od warunków przechowywania. Natomiast dużo większą stabilnością odznaczały się wyciągi suche, które przechowywane nawet przez kilka lat nie zmieniały w istotny sposób swojej aktywności. Dodatkowo zbadano aktywność cytotoksyczną suchego wyciągu etanolowego na ludzkich liniach nowotworowych nabłonka jamy ustnej KB oraz macicy HeLa. Wyciąg ten charakteryzował się umiarkowaną aktywnością wobec linii HeLa oraz wysoką aktywnością wobec linii KB, wartości ED₅₀ wynosiły odpowiednio 121-240 i 6.0 µg/ml [Oświecimska 1983].

Plechy *Cladonia arbuscula* ekstrahowano kolejno benzyną lekką, chloroformem, acetonem, etanolem, metanolem i wodą. Uzyskane wyciągi zagęszczono i badano ich aktywność przeciw szczepom 4 bakterii (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*) oraz 1 szczepu drożdży (*Candida albicans*). Żaden z badanych wyciągów nie wykazał aktywności wobec *E. coli* i *P. aeruginosa*. Wyciągi benzynowe i chloroformowe były aktywne wobec *S. aureus*, *B. subtilis* oraz *C. albicans*, wyciąg acetonowy jedynie w przypadku *C. albicans*, natomiast wyciągi etanolowe, metanolowe i wodne nie wykazały aktywności wobec żadnego z badanych szczepów [Ingolfssdottir 1985].

Plechy *Cladonia arbuscula* ekstrahowano w aparacie Soxhleta kolejno heksanem, octanem etylu oraz metanolem. Zagęszczone wyciągi badano pod kątem aktywności wobec *Mycobacterium aurum* oraz *M. tuberculosis*. W przypadku pierwszego szczepu wyciąg heksanowy oraz octanowy wykazały silną aktywność, wartości MIC wynosiły 4 µg/ml i były porównywalne z substancją referencyjną (rifampicyna, MIC 1 µg/ml), natomiast wyciąg metanolowy był bardzo słabo aktywny (MIC 32 µg/ml). Wobec *Mycobacterium tuberculosis* wyciągi heksanowy i octanowy również wykazały aktywność przeciwbakteryjną porównywalną z substancją referencyjną, powodując odpowiednio 96 i 99% zahamowania wzrostu przy stężeniu 100 µg/ml, natomiast wyciąg metanolowy w tym stężeniu hamował wzrost bakterii o 59% [Gordien 2010].

4.3. *Cladonia gracilis* (L.) Willd. – chrobotek wysmukły



4.3.1. Opis botaniczny

Łuski plechy pierwotnej drobne, wcinane lub wrębne, trwałe lub zanikające. Podecja wysokości 1-6 cm, grubości 0.5-5 mm, rosnące w murawkach (ustawione względem siebie równolegle), wałeczkowate, rożkowate, szydełkowate, mogą mieć zakończenia o kształcie wąskiego kieliszka, pojedyncze lub skąpo rozgałęzione. Podecja o budowie pięterkowej (1-5), najniższe pięterko wydłużone, wyższe pięterka wyrastają z niższych, bez otworków i sorediów, z łuskami lub bez. Podecja pokryte ciągłą lub popękaną korą koloru szarego, szarzielonego, oliwkowego lub brunatnego, na szczytach brązowe pyknidia. Często obecne brązowe apotecja, średnicy 1-4 mm [Wójciak 2007, Tobolewski 1972].

4.3.2. Występowanie i identyfikacja mikrochemiczna

Gatunek pospolicie występujący w lasach szpilkowych i mieszanych, na glebie piaszczystej i próchnicznej, a także w miejscach otwartych bardzo suchych oraz wilgotnych, na skałach i wydmach [Wójciak 2007, Tobolewski 1972]. Pd+ czerwone; K-

4.3.3. Skład chemiczny

metabolity porostowe:

- kwas fumaroprotocetrarowy [Piercey-Normore 2007, Culberson 1979]
- atranoryna [Culberson 1979]

pozostałe metabolity:

- β -karoten [Barbosa-Filho 2007]
- polisacharydy typu laminaranu, β -D-glukany, Man:Gal:Glu 38:23:45 [Carbonero 2001]

4.3.4. Aktywność

Z plech *Cladonia gracilis* przygotowano wyciąg metanolowy, który po zagęszczeniu eluowano trzykrotnie wodą a następnie chloroformem. Uzyskany eluat chloroformowy badano pod kątem aktywności chemoprewencyjnej (indukcja reduktazy chinonowej, hamowanie dekarboksylazy ornitynowej stymulowanej estrami forbolu), antyoksydacyjnej (DPPH), przeciwzapalnej (hamowanie COX-1), antyproliferacyjnej (linia nowotworu jelita grubego Col-2), cytotoksycznej (linie zwierzęce: glioma ASK, nowotwór jajnika zależny od taksolu Tax2-4; linie ludzkie: nowotwór piersi BC 1, nowotwór jelita grubego Col-2, nowotwór nabłonka jamy ustnej KB i jego dwie odmiany odporne i nieoporne na winblastynę, nowotwór prostaty hormonozależny LNCaP, nowotwór płuc LU 1, neuroblastoma SKNSH, adenocarcinoma jajnika SW 626, glioblastoma U373), stymulującej różnicowanie komórek białaczki HL-60, aktywności estrogennej i antyestrogennej a także aktywności hamującej aromatazę i sulfatazę. Badany eluat nie wykazał aktywności chemoprewencyjnej w zakresie stężeń do 10 i 4 µg/ml odpowiednio w teście reduktazy chinonowej i dekarboksylazy ornitynowej stymulowanej estrami forbolu. Podobnie negatywne wyniki zaobserwowano w badaniu aktywności antyoksydacyjnej ($IC_{50} > 200 \mu g/ml$), przeciwzapalnej ($IC_{50} > 25 \mu g/ml$), estrogennej i antyestrogennej, antyproliferacyjnej, cytotoksycznej oraz stymulującej różnicowanie komórek HL-60. Badany eluat chloroformowy nie hamował aktywności aromatazy, natomiast hamował aktywność sulfatazy o ponad 80% [Ingolfssdottir 2000].

Plech *Cladonia gracilis* ekstrahowano kolejno benzyną lekką, chloroformem, acetonem, etanolem, metanolem i wodą. Uzyskane wyciągi zagęszczono i badano ich aktywność przeciw szczepom 4 bakterii (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*) oraz 1 szczepu drożdży (*Candida albicans*). Badane wyciągi nie wykazały aktywności wobec żadnego ze szczepów [Ingolfssdottir 1985].

Perry i wsp. określali aktywność przeciwdrobnoustrojową (*Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*), przeciwwirusową (HSV) i cytotoksyczną (P388, BSC) wyciągu etanolowego z *Cladonia gracilis*. Badany wyciąg wykazał słabą aktywność wobec badanych szczepów bakterii i grzybów oraz wirusa HSV, jak również słabą aktywność cytotoksyczną [Perry 1999].

Wyciąg z *Cladonia gracilis* w badaniach in vitro nie hamował kiełkowania nasion oraz wzrostu siewek *Pinus sylvestris* [Ramaut 1975].

4.4. *Cladonia furcata* (Huds.) Schrader – chrobotek widlasty



4.4.1. Opis botaniczny

Łuski plechy pierwotnej drobne, wczesnie zanikające. Podecja wysokości 2-5 cm, grubości 0.7-2 mm, wałeczkowate, miejscami rozdęte, kilkakrotnie rozgałęzione w sposób widelkowaty lub nieregularny drzewkowaty, zwykle z otworkiem w kątach rozgałęzień. Wzdłuż grubszych gałązek długie szczeliny. Brak sorediów oraz łusek (u większości). Podecja pokryte ciągłą, popękaną lub brodawkowatą korą, koloru szarego, szarzielonego, oliwkowego lub brunatnego. Na szczytach podecjów brązowe pyknidia. Apotecja często obecne, brązowe, średnicy 0.3-1 mm, na szczytach gałązek [Wójciak 2007, Tobolewski 1972].

4.4.2. Występowanie i identyfikacja mikrochemiczna

Gatunek pospolicie występujący, głównie na glebach piaszczystych i próchnicznych w lasach szpilkowych oraz mieszanych, także w miejscach otwartych suchych i wilgotnych [Wójciak 2007, Tobolewski 1972]. Pd+ czerwone; K-

4.4.3. Skład chemiczny

metabolity porostowe:

- kwas fumaroprotocetrarowy [Huneck 2004, Ranković 2008, Culberson 1979]
- atranoryna [Huneck 2004, Culberson 1979]
- kwas protocetrarowy; kwas rangiformowy; kwas norrangiformowy [Huneck 2004]

pozostałe metabolity:

- polisacharydy typu licheniny, CFP1 i 2 [Lin03, Lin01]; polisacharydy, α -D-glukany [Woronowicz-Barreira 1999]; polisacharydy typu laminaranu, β -D-glukany, Man:Gal:Glu 25:29:46 [Carbonero 2001]
- ramnoza, arabinoza, ksyloza, mannoza, galaktoza, glukoza [Sasaki 2001]

- β -karoten [Barbosa-Filho 2007]
- kwasy tłuszczowe typu 12:0,14:0, 16:0, 17:0, 18:0, 18:1, 20:0, 23:0, 24:0; triglicerydy; kwas undekaniowy, 3-hydroxy-dekanowy i 9-oxo-dekanowy; glicerol [Sasaki 2001]; 1-metyloester kwasu dikarboksyheksadekanowego [Huneck 2004]
- kwas askorbowy, cynk [Culberson 1979]

4.4.4. Aktywność

Z plech *Cladonia furcata* przygotowano kolejno wyciągi acetonowe, metanolowe i wodne, które następnie były badane pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej (*Bacillus mycoides*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) i przeciwgrzybiczej (*Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Botrytis cinerea*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor mucedo*, *Paecilomyces variotti*, *Penicilium purpureascens*, *P. verrucosum*, *Trichoderma harsianum*). Wyciąg wodny nie wykazał aktywności wobec żadnego z badanych szczepów. Wyciąg acetonowy był bardziej aktywny od wyciągu metanolowego w przypadku badanych szczepów bakterii oraz *Staphylococcus aureus*, natomiast w pozostałych szczepach grzybów aktywność ta była wyrównana. Wartość MIC w przypadku bakterii dla wyciągu acetonowego i metanolowego wynosiła odpowiednio 0.78-1.56 mg/ml i 3.12-6.25 mg/ml (kontrola: streptomycyna, MIC=1.95-31.25 μ g/ml), natomiast w przypadku grzybów 6.25-25 mg/ml dla obu wyciągów (kontrola: ketokonazol, MIC=1.95-31.25 μ g/ml) [Ranković 2007].

Z plech *Cladonia furcata* przygotowano wyciąg metanolowy, który po zagęszczeniu eluowano trzykrotnie wodą a następnie chloroformem. Uzyskany eluat chloroformowy badano pod kątem aktywności chemoprewencyjnej (indukcja reduktazy chinonowej, hamowanie dekarboksylazy ornitynowej stymulowanej estrami forbolu), antyoksydacyjnej (DPPH), przeciwzapalnej (hamowanie COX-1), antyproliferacyjnej (linia nowotworu jelita grubego Col-2), cytotoksycznej (linie zwierzęce: glioma ASK, nowotwór jajnika zależny od taksolu Tax2-4; linie ludzkie: nowotwór piersi BC 1, nowotwór jelita grubego Col-2, nowotwór nabłonka jamy ustnej KB i jego dwie odmiany odporne i nieoporne na winblastynę, nowotwór prostaty hormonozależny LNCaP, nowotwór płuc LU 1, neuroblastoma SKNSH, adenocarcinoma jajnika SW 626, glioblastoma U373), stymulującej różnicowanie komórek białaczki HL-60, aktywności estrogennej i antyestrogennej a także aktywności hamującej aromatazę i sulfatazę. Badany eluat nie wykazał aktywności chemoprewencyjnej w zakresie stężeń do 10 i 4 μ g/ml odpowiednio w teście reduktazy chinonowej i dekarboksylazy ornitynowej stymulowanej estrami forbolu. Podobnie negatywne wyniki zaobserwowano w badaniu aktywności antyoksydacyjnej ($IC_{50}>200\mu$ g/ml), przeciwzapalnej ($IC_{50}>25\mu$ g/ml), estrogennej i antyestrogennej, antyproliferacyjnej, cytotoksycznej oraz stymulującej różnicowanie komórek HL-60. Badany eluat chloroformowy nie hamował również aktywności aromatazy oraz sulfatazy [Ingolfssdottir 2000].

Plech *Cladonia furcata* gotowano przez 20 minut w wodzie wodociągowej. Uzyskany ekstrakt zagęszczono i badano pod kątem aktywności hamującej wzrost korzeni w teście *Alium*. Badany wyciąg w stężeniu 0.10 g surowca/100 cm³ wody charakteryzował się umiarkowaną aktywnością, powodując 40% zahamowanie wzrostu po 24 h inkubacji [Oświecimska 1979].

Lin i wsp. wyizolowali z *Cladonia furcata* polisacharyd CFP-2, zbudowany z glukozy, galaktozy i mannozy w stosunku molarnym 8:1:1. Związek ten został następnie przebadany pod kątem wpływu na komórki białaczki linii HL-60 oraz K562. Polisacharyd CFP-2 hamował żywotność komórek obu linii, w sposób zależny od dawki (50-800 mg/L) i czasu inkubacji (4-6 dni), powodując obniżenie żywotności komórek do około 40% w najwyższym badanym stężeniu po 6 dniach. Następnie komórki poddane działaniu CFP-2 w dawce 300 mg/L przez 5 dni były obserwowane pod mikroskopem elektronowym. Zaobserwowano obkurczenie komórek, kondensację chromatyny oraz powstawanie ciałek apoptotycznych w obrębie jądra komórkowego, co sugerowało powstawanie procesu apoptozy. W kolejnym zatem etapie zbadano fragmentację DNA metodą elektroforezy na żelu agarozowym w komórkach poddanych działaniu CFP-2 o stężeniu 100-300 mg/L. Analiza wskazała na postępujące powstawanie tzw. drabinki apoptotycznej, fragmentów DNA wielkości 180-200 par zasad. Dalsze badania obejmowały ponadto analizę ilości komórek apoptotycznych przy pomocy cytometru przepływowego, analizę Western blot pod kątem obecności białek wskazujących na apoptozę (Bcl-2, Bax, Fas i FasL) oraz zbadanie aktywności telomerazy. Zaobserwowano wzrost ilości komórek apoptotycznych w zależności od stosowanego stężenia CFP-2, a także zwiększoną ekspresję białek Bax, Fas i FasL, podczas gdy poziom białka Bcl-2 pozostał niezmienny. Świadczy to o wywoływaniu apoptozy przez CFP-2 poprzez modulację wzajemnego stosunku białek Bcl-2 i Bax oraz stymulację ścieżki przekazywania sygnałów związanej z Fas/FasL. Dodatkowo polisacharyd CFP-2 stymulował zmniejszenie aktywności telomerazy, która jest nadaktywna w komórkach nowotworowych [Lin2003]. Ta sama grupa autorów przebadła inny polisacharyd z tego gatunku, CFP-1, pod kątem wpływu na żywotność, morfologię oraz stymulację procesu apoptozy w komórkach białaczki K562. Żywotność określano metodą MTT, morfologię obserwowano pod mikroskopem fluorescencyjnym oraz elektronowym, natomiast proces apoptozy badano metodą elektroforezy na żelu agarozowym oraz z wykorzystaniem cytometru przepływowego. CFP-1 hamował żywotność komórek w sposób zależny od dawki (50-800 mg/L) i czasu inkubacji (4-6 dni), zaobserwowano również zmiany w morfologii komórek – zmniejszenie i zaokrąglenie komórek, pojawienie się ciałek apoptotycznych – wskazujące na proces apoptozy. Apoptozę potwierdziło pojawienie się drabinki apoptotycznej w badaniu elektroforetycznym oraz wyniki analizy cyklu komórkowego w badaniu na cytometrze przepływowym [Lin 2001].

4.5. *Cladonia macilenta* ssp. *floerkeana* Fr. [syn. *C. floerkeana* (Fr.) Somm.] – chrobotek Floerkego



4.5.1. Opis botaniczny

Łuski plechy pierwotnej drobne, wcinane lub karbowane, trwałe lub zanikające, wcinane skupione lub rozproszone. Podecja wysokości 0.5-3 cm, grubości 0.5-1.5 mm, o budowie wałeczkowatej, czasem w górnej części zgrubiałe, pojedyncze lub skąpo rozgałęzione. Podecja pokryte gładką, brodawkowatą lub popękaną korą, koloru szarooliwkowego lub białawego, bez sorediów albo z izydiowymi sorediami, zlokalizowanymi w górnej części. Pyknidia czerwone, częste apotecja lecideowe na końcach podecjów, pojedyncze lub skupione, o średnicy 0.5-2 mm [Wójciak 2007, Tobolewski 1972].

4.5.2. Występowanie i identyfikacja mikrochemiczna

Gatunek występujący pospolicie na glebach próchnicznych i piaszczystych, na drewnie i u podstawy pni drzew, głównie w lasach szpilkowych, przy drogach leśnych, na torfowiskach i wrzosowiskach, na niżu i w niższych piętrach gór [Wójciak 2007, Tobolewski 1972]. Pd-; K-

4.5.3. Skład chemiczny

metabolity porostowe:

- kwas barbatowy [Culberson 1979]
- kwas usninowy [Culberson 1979]
- kwas rodokladoniowy [Culberson 1979]
- kwas didymowy [Culberson 1979]

pozostałe metabolity:

brak danych

4.5.4. Aktywność

brak danych

4.6. *Cladonia subulata* (L.) Weber in Wigg. [syn. *C. cornutoradiata* (Coem.) Zopf] – chrobotek rogokształtny



4.6.1. Opis botaniczny

Łuski plechy pierwotnej drobne, głęboko podzielone lub karbowane, trwałe. Podecja wysokości 2-7 cm, grubości 1-2 mm, o budowie wałeczkowej, na szczytach sztyłkowate lub wąsko kieliszkowe, często z sztyłkowatymi odgałęzieniami, proste lub lekko pogięte, bez otworków. Podecja pokryte korą tylko u podstawy, koloru białawego, szarego lub brunatnego, z łuskami lub bez, czasem pokryte w całości mączystymi solediami. Na szczytach podecjów brązowe soledia, bardzo rzadko obecne apotecja (brązowe), o średnicy 0.4-0.8 mm [Wójciak 2007, Tobolewski 1972].

4.6.2. Występowanie i identyfikacja mikrochemiczna

Gatunek pospolicie występujący, zwłaszcza na niżu, na glebach próchnicznych i piaszczystych, rzadko na murszejącym drewnie i mchach, w lasach szpilkowych, zwłaszcza na brzegach zagajników, oraz w miejscach otwartych, suchych i wilgotnych (torfowiska wysokie) [Wójciak 2007, Tobolewski 1972]. Pd+ czerwone; K-

4.6.3. Skład chemiczny

metabolity porostowe:

- kwas fumaroprotocetrarowy [Culberson 1979, Piercey-Normore 2007, Spier 2007]
- kwas homosekikaowy [Spier 2007]

pozostałe metabolity

- Zn [Culberson 1979]

4.6.4. Aktywność:

brak danych

4.7. *Cladonia uncialis* (L.) Wigg. – chrobotek gwiazdkowaty



4.7.1. Opis botaniczny

Łuski plechy pierwotnej bardzo wczesnie zanikające. Podecja wysokości 1.5-5 cm, grubości 1-3 mm, pionowe lub pokładające się, rosnące w murawkach, wałeczkowate, rozgałęziające się widełkowato lub 3-5-dzielnie. Rozgałęzienia ostro zakończone, w kątach z otworem. Podecja bez łusek i sorediów, pokryte korą ciągłą lub popękaną, koloru słomkowożółtego, żółtego lub szarozielonkawego. Na szczytach podecjów brązowe pyknidia, zawierające czerwoną galaretkę. Bardzo rzadko występują brązowe apotecja (na szczytach podecjów), średnicy 0.3-0.8 mm. W stanie suchym bardzo łatwe do skruszenia [Wójciak 2007, Tobolewski 1972].

4.7.2. Występowanie i identyfikacja mikrochemiczna

Gatunek pospolicie występujący w lasach szpilkowych, na glebach próchnicznych i piaszczystych, także na wydmach, wrzosowiskach, przydrożach, żwirowiskach, na niżu i w wyższych partiach gór [Wójciak 2007, Tobolewski 1972]. Pd-; K-

4.7.3. Skład chemiczny

metabolity porostowe:

- kwas usninowy [Gertig 1961, Piercey-Normore 2007], (-)-usninowy [Culberson 1979, Kinoshita 1997]
- kwas skwamatowy [Culberson 1979]
- kwas tamnoliowy [Culberson 1979]

pozostałe metabolity:

- polisacharydy typu laminaranu, β -D-glukany, Man:Gal:Glu 38:27:35 [Carbonero 2001]
- kwas askorbowy [Culberson 1979]
- Mn, Fe, Zn [Culberson 1979]

4.7.4. Aktywność

Plechy *Cladonia uncialis* gotowano przez 20 minut w wodzie wodociągowej. Uzyskany ekstrakt zagęszczono i badano pod kątem aktywności hamującej wzrost korzeni w teście *Al-lum*. Wyciąg z *Cladonia uncialis* silnie wpływał na wzrost korzeni cebuli, powodując zahamowanie w odpowiednio 94% po 24 godzinach inkubacji w stężeniu 0.10 g surowca/100 cm³ wody [Oświecimska 1979].

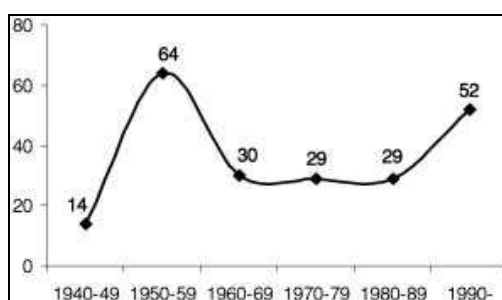
Plechy *Cladonia uncialis* ekstrahowano kolejno benzyną lekką, chloroformem, acetonem, etanolem, metanolem i wodą. Uzyskane wyciągi zagęszczono i badano ich aktywność przeciw szczepom 4 bakterii (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*) oraz 1 szczepu drożdży (*Candida albicans*). Żaden z badanych wyciągów nie wykazał aktywności wobec *E. coli* i *P. aeruginosa*. Wyciągi benzynowe, chloroformowe i metanolowe były aktywne wobec *S. aureus*, wyciągi benzynowe i chloroformowe wobec *B. subtilis*, natomiast wszystkie wyciągi poza wodnym wobec *C. albicans* [Ingolfssdottir 1985].

Z powierzchni plech *Cladonia uncialis* zebrano gatunek grzyba z rodzaju *Streptomyces*, który następnie hodowano w warunkach laboratoryjnych. Uzyskane hodowle ekstrahowano octanem etylu, a zagęszczony wyciąg eluowano octanem etylu i wodą. Frakcję octanową oczyszczano metodą preparatywnej chromatografii HPLC, uzyskując unciamycynę, nowy antybiotyk enodiyowy. Związek ten wykazał aktywność przeciwbakteryjną wobec *Staphylococcus aureus* (MIC 0.0000064 µg/ml), *Escherichia coli* (MIC 0.002 µg/ml) i *Burkholderia cepacia* (MIC 0.001 µg/ml) [Davies 2005].

5. Charakterystyka metabolitów porostowych badanych w pracy.

5.1. Kwas usninowy

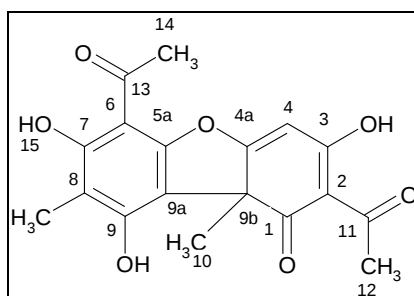
Pierwsze doniesienia o kwasie usninowym datują się na rok 1844, kiedy to Knop opisał izolację tego związku i jego podstawowe własności fizykochemiczne [Ingolfssdottir 2002]. Wyraźny wzrost zainteresowania tym związkiem widać w latach 50-70 ubiegłego wieku (Ryc. 5). Po tym okresie następuje zmniejszenie zainteresowania kwasem usninowym, aż do początku lat 90, kiedy to kwas usninowy ponownie znajduje się w centrum zainteresowania naukowców [Cocchietto 2002]. W 2002 roku w czasopismach Phytochemisty i Naturwissenschaften pojawiły się dwa opracowania przeglądowe dotyczące kwasu usninowego [Cocchietto 2002, Ingolfssdottir 2002].



Rycina 5. Ilość prac poświęconych kwasowi usninowemu w latach 1940-1990 [wg. Cocchietto]

5.1.1. Własności fizykochemiczne

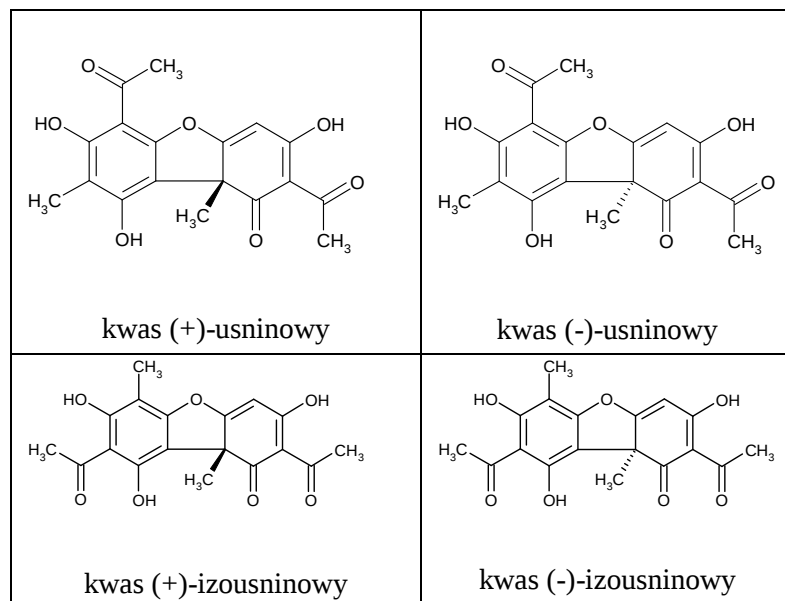
Kwas usninowy jest pochodną dibenzofuranu: 2,6-diacetylo-7,9-dihydroksy-8,9b-dimetylo-1,3(2*H*,9*bH*)-dibenzo-furandion, o wzorze sumarycznym $C_{18}H_{16}O_7$. Krystaliczna, żółta substancja, optycznie czynna, o temperaturze topnienia 203-204°C [Culberson 1979].



Rycina 6. Wzór strukturalny kwasu usninowego

Kwas usninowy występuje w formie dwóch enancjomerów, różniących się położeniem grupy metylowej w pozycji 9b (Ryc. 7) [Cocchietto 2002]. Absolutną konfigurację kwasu (+)-usninowego w pozycji 9b określono jako R przy pomocy analizy rentgenograficznej [Ingolfssdottir 2002].

dottir 2002]. Poza enancjomerami kwasu usninowego, w porostach występują również inne izomery: kwas (+)- i (-)-izousninowy (Ryc. 7).



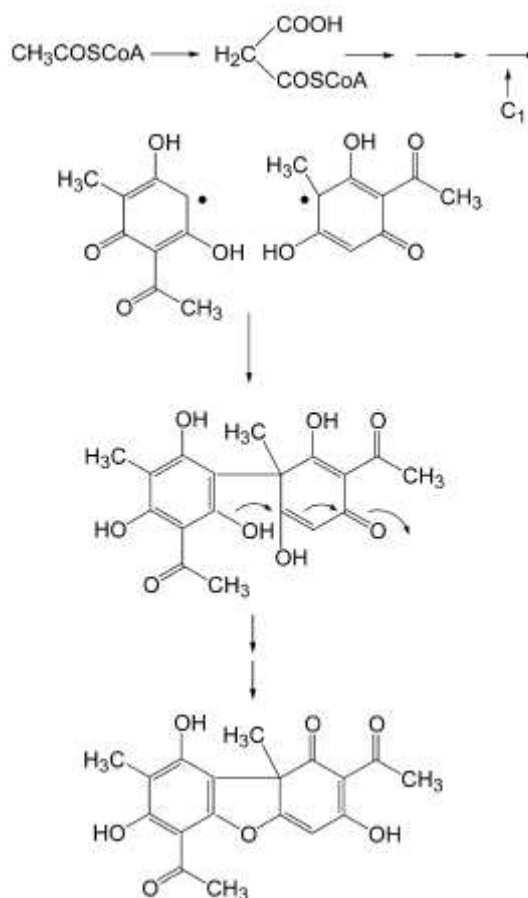
Rycina. 7. Enancjomery kwasu usninowego i izousninowego

Kwas usninowy rozpuszcza się dobrze w benzenie, chloroformie, alkoholu amyłowym i lodowatym kwasie octowym, jest słabo rozpuszczalny w etanolu, eterze naftowym i eterze dietylowym, natomiast nierozpuszczalny w wodzie [Podterob2008]. Stark i wsp. porównywali rozpuszczalność kwasu usninowego w różnych rozpuszczalnikach (aceton, octan etylu, etanol, glikol metylenowy, glikol etylenowy, furfural, alkohol furfurylowy oraz woda). Najwyższą rozpuszczalność kwasu usninowego zaobserwowano dla furfuralu i alkoholu furfurylowego w 25°C (odpowiednio 7.32 g i 1.21 g/100 ml), dobry wynik otrzymano również dla octanu etylu, uzyskując rozpuszczalność 0.88, 1.29 i 2.41 g/100 ml odpowiednio w temperaturze 25, 40 i 60°C oraz dla acetonu 0.77 i 1.19 g/100 ml w temperaturze 25 i 40°C. Najgorszą rozpuszczalność kwas usninowy miał w wodzie (<0.01 g/100 ml w 25°C) [Stark 1950]. Do celów badania aktywności biologicznej i farmakologicznej in vitro niektórzy autorzy wskazują na 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstrynę jako optymalny rozpuszczalnik [Kristmundsdottir 2005].

Charakterystycznymi pasmami dla kwasu usninowego w widmie w podczerwieni są pasma 3280, 1730, 1680, 1525, 960, 818 i 720 cm^{-1} [Rashid1999]. W obrazie widma $^1\text{H-NMR}$ widoczne są charakterystyczne sygnały dla protonów grup hydroksylowych w pozycji 3, 7 i 9 przy δ_{H} odpowiednio 18.84, 13.31 i 11.02 ppm [König 1999] oraz dla protonów grup metylowych w pozycjach 10, 12, 14 i 15 przy δ_{H} odpowiednio 1.35, 2.07, 21.11 i 1.35 ppm [Campanella 2002], jak również wyraźny sygnał dla protonu aromatycznego w pozycji 4 przy δ_{H} 4.56 ppm [Rashid1999]. W obrazie widma $^{13}\text{C-NMR}$ sygnały dla grup metylowych w pozycjach 10, 12, 14 i 15 przy δ odpowiednio 32.11, 27.88, 31.27 i 7.54 ppm [Rashid1999].

5.1.2. Biogeneza

Biogenetycznie kwas usninowy wywodzi się ze szlaku acetylo-polimalynolowego (patrz Tabela 2.). Biosynteza tego związku została opisana po raz pierwszy w roku 1966 przez badaczy japońskich [Ingolfstodt 2002]. Prekursor kwasu usninowego, metylofluoroacetofenon, powstaje poprzez kondensację jednej cząsteczki octanu i trzech cząsteczek malonianu w procesie C-metylacji a następnie cyklizacji. Kolejne kroki obejmują stereospecyficzne oksydacyjne sprzężanie dwóch jednostek metylofluoroacetofenonu, dające w efekcie uwodniony kwas usninowy. W ostatnim etapie tworzy się wiązanie eterowe poprzez proces dehydratacji [Ingolfstodt 2002, Culberson 1979]. Schemat biosyntezy kwasu usninowego przedstawia Ryc. 8.



Rycina 8. Schemat biosyntezy kwasu usninowego [wg. Ingolfstodt 2002]

5.1.3. Synteza i pochodne

Syntezy kwasu usninowego dokonał w 1956 roku Barton i wsp., poprzez oksydacyjne sprzężenie metylofluoroacetofenonu z żelazocyjankiem potasu. Uzyskany w ten sposób dimer acetylowano do postaci dioctanu kwasu usninowego, który po hydrolizie dał kwas usninowy. Proces ten opisano dla obu enancjomerów [Barton 1956]. Hawranik i wsp. opisali chemoenzymatyczną, dwuetapową syntezę kwasu usninowego poprzez metylację fluoroacetofenonu, a następnie utlenienie otrzymanego produktu za pomocą peroksydazy chrzanowej [Hawranik

2009]. Udowodniono również, że kwas usninowy jest produkowany w warunkach in vitro przez kultury tkankowe *Cladonia substellata* [Pereira 1995].

Liczne prace opisują również syntezę pochodnych kwasu usninowego, takich jak pochodne aminowe [Tazetdinova 2009, Bazin 2008, Tomasi 2006], oksazolowe [Luzina 2009], estrowe [Erba 1998], polifluoroalkenylowe [Furin 2007] czy octanowe [Correche 1998]. W kilku przypadkach oceniano aktywność biologiczną pochodnych w porównaniu do związku wyjściowego. Niektóre pochodne aminowe i octanowe miały nieznacznie wyższą aktywność hamującą wzrost patogennych bakterii in vitro [Tomasi 2006, Correche 1998]. Aktywność cytotoksyczna niektórych pochodnych aminowych przekraczała znacznie aktywność kwasu usninowego [Bazin 2008]. Zostanie to szczegółowo przedstawione w rozdziale 5.1.9.

5.1.4. Rozpowszechnienie w porostach

Kwas usninowy jest związkiem zidentyfikowanym jak dotąd wyłącznie w porostach. W grzybach znaleziono związki o strukturze zbliżonej do kwasu usninowego: toksyczną myko-usninę w gatunku *Mycosphaerella nawae* [Sassa1990] oraz cerkosporamid i amid kwasu usninowego w gatunku *Cercosporidium henningsii* [Conover1992]. Kwas usninowy występuje w wielu rodzinach i rodzajach porostów, w różnych ilościach. Najczęściej rozpowszechniony jest w porostach z rodzaju *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina*, *Evernia*, *Parmelia* i *Alectoria* [Ingolfssdottir 2002]. Komercyjnie dostępny kwas (+)-usninowy jest izolowany z *Usnea dasypoga*.

Zestawienie występowania kwasu usninowego w porostach przedstawia Tabela 4.

Tabela 4. Rozpowszechnienie kwasu usninowego w porostach

RODZINA	RODZAJ	ENANCJOMER	cytowanie
<i>Acarosporaceae</i>	<i>Acarospora</i>	<i>bd</i>	Culberson 1979
<i>Arthoniaceae</i>	<i>Arthonia</i>	<i>bd</i>	Culberson 1979
<i>Cladoniaceae</i>	<i>Cladia</i>	<i>bd</i>	Perry 1999
	<i>Cladonia</i>	(+), (-)	Culberson 1979
		(+), (-)	Kinoshita 1997
		(+)	Einarsdottir 2010
		<i>bd</i>	Yilmaz 2004
		<i>bd</i>	Ingolfssdottir 1998
		<i>bd</i>	Honda 2010
		<i>bd</i>	Falk 2008
		<i>bd</i>	Gertig 1960
		<i>bd</i>	DeCarvalho 2005
		<i>bd</i>	Kristmundsdottir 2005
		<i>bd</i>	Bucar 2004
		<i>bd</i>	Nybakken 2010
		<i>bd</i>	Oświecimska 1987
		<i>bd</i>	Ribeiro-Costa 2004
		<i>bd</i>	Piercey-Normore 2007
	<i>Heterodea</i>	<i>bd</i>	Shukla 2010
<i>Lecanoraceae</i>	<i>Haematomma</i>	(+), (-)	Culberson 1979
	<i>Lecanora</i>	(+), (-)	Culberson 1979
		<i>bd</i>	König 1999
	<i>Ophioparma</i>	(+)	Kinoshita 1997
	<i>Squamarina</i>	<i>bd</i>	Bjerke 2002
		(-)	Culberson 1979-
<i>Lecideaceae</i>	<i>Catillaria</i>	(-)	Culberson 1979
	<i>Megalospora</i>	<i>bd</i>	Culberson 1979
<i>Parmeliaceae</i>	<i>Alectoria</i>	(+), (-)	Lauterwein 1995
	<i>Asahinea</i>	<i>bd</i>	Culberson 1979
		<i>bd</i>	Krivoshchekova 1983
	<i>Cetraria</i>	(+), (-)	Culberson 1979
		(-)	Kinoshita 1997
	<i>Flavocetraria</i>	(+), (-)	Kinoshita 1997
		<i>bd</i>	Falk 2008
		<i>bd</i>	Bjerke 2002
	<i>Flavoparmelia</i>	(+)	Kinoshita 1997
	<i>Hendrickxia</i>	<i>bd</i>	Culberson 1979
	<i>Hypogymnia</i>	<i>bd</i>	Culberson 1979
		(+)	Kinoshita 1997
	<i>Nephromopsis</i>	(-)	Kinoshita 1997
	<i>Parmelia</i>	<i>bd</i>	Culberson 1979
		<i>bd</i>	Krivoshchekova 1983
		(+)	Kinoshita 1997
		<i>bd</i>	Caviglia 2001
		<i>bd</i>	Kumar 1999-2
	<i>Parmeliopsis</i>	<i>bd</i>	Garcia Rowe 1999
		<i>bd</i>	Culberson 1979
		(-)	Kinoshita 1997
	<i>Parmotrema</i>	<i>bd</i>	Santos 2004
	<i>Vulpicidia</i>	(-)	Kinoshita 1997
	<i>Xanthoparmelia</i>	(+)	Kinoshita 1997
		<i>bd</i>	Burlando 2009

		(+) <i>bd</i> <i>bd</i> <i>bd</i> <i>bd</i>	Dailey 2008 Amo de Paz 2010 Rancan 2002 Roach 2006 Kohlhardt-Floehr 2010
<i>Peltigeraceae</i>	<i>Nephroma</i>	(+) (+) <i>bd</i>	Culberson 1979 Kinoshita 1997 Garcia Rowe 1999
<i>Physciaceae</i>	<i>Buellia</i> <i>Rinodina</i>	<i>bd</i> (+)	Culberson 1979 Culberson 1979
<i>Rocellaceae</i>	<i>Rocella</i>	<i>bd</i>	Vijayakumar 2000
<i>Spaerophoraceae</i>	<i>Acrocypus</i>	<i>bd</i>	Culberson 1979
<i>Stereocaulaceae</i>	<i>Stereocaulon</i>	<i>bd</i> <i>bd</i>	Culberson 1979 Falk 2008
<i>Stictaceae</i>	<i>Lobaria</i> <i>Pseudocyphellaria</i>	(+), (-) <i>bd</i>	Culberson 1979 Perry 1999
<i>Usneaceae</i>	<i>Alectoria</i> <i>Dactylina</i> <i>Evernia</i> <i>Everniopsis</i> <i>Himantormia</i> <i>Neuropogon</i> <i>Ramalina</i> <i>Usnea</i>	(-) (-) (-) (-) <i>bd</i> (+) (+) <i>bd</i> <i>bd</i> <i>bd</i> <i>bd</i> <i>bd</i> (+) (+) (+) <i>bd</i> <i>bd</i> <i>bd</i> (+) <i>bd</i> <i>bd</i> <i>bd</i> <i>bd</i> <i>bd</i> <i>bd</i> (+) <i>bd</i> (+) <i>bd</i> <i>bd</i>	Culberson 1979 Kinoshita 1997 Einarsdottir 2010 Romagni 2000 Culberson 1979 Culberson 1979 Kinoshita 1997 Nybakken 2010 Culberson 1979 Culberson 1979 Culberson 1979 Culberson 1979 Culberson 1979 Kinoshita 1997 Tay 2004 Stark 1950 Cansaran 2007 Grzycka 1979 Culberson 1979 Lohezic 2007 Kinoshita 1997 Marcano 1999 Correche 1998 Jin 2008 Odabasoglu 2006 Kreft 2001 Lisickov 2002 Safak 2009 Najdenova 2001 Pramyothin 2004 Garcia Rowe 1999

(+) – kwas (+)-usninowy; (-) - kwas (-)-usninowy; *bd* – brak danych

Według Culbersona, kwas izousinowy znaleziony został jedynie w rodzaju *Cladonia* [Culberson 1979]. Jednak późniejsze doniesienia wskazują na obecność tego związku także w rodzaju *Alectoria*, *Bunodophoron*, *Cladina*, *Cladonia*, *Ophioparma* [Kinoshita 1997].

5.1.5. Metody ekstrakcji, izolacji i identyfikacji

W celu uzyskania kwasu usninowego wykorzystywano jako źródła porosty z różnych gatunków, w postaci sproszkowanej [Lohezic Le Devehat 2007, Yilmaz 2004, Marcano 1999, Burlando 2009, Correche 1998, Einarsdottir 2010, Cetin 2008, Bezivin 2004, Gertig 1960] lub tylko rozdrobnionej [Honda 2010, Santos 2004, Perry 1999, König 1999, Kinoshita 1997, Tay 2004, Stark 1950, Jin 2008, Odabasoglu 2006, Dailey 2008, Bomfim 2009, Pereira 1994]. Materiał roślinny ekstrahowano najczęściej w aparacie Soxhleta [Honda 2010, Lohezic Le Devehat 2007, Perry 1999, Santos 2004, Bomfim 2009, Bezivin 2004, Jin 2008, Odabasoglu 2006, Correche 1998, Marcano 1999, Einarsdottir 2010, Krivoshchekova 1983], stosowano również ekstrakcję w temperaturze pokojowej, z jednoczesnym użyciem ultradźwięków w początkowej fazie ekstrakcji [Yilmaz 2004, Kinoshita 1997, Burlando 2009, Tay 2004, Stark 1950, Dailey 2008, Cetin 2008], kilka doniesień opisuje ekstrakcję klasyczną, w kolbie pod chłodnicą zwrotną [König 1999, Correche 1998, Oświecimska 1987, Pereira 1994, Gertig 1960]. Jako rozpuszczalniki wykorzystywano najczęściej heksan, chloroform, aceton, eter dietylowy, eter naftowy, benzynę lekką, rzadko etanol czy metanol. W kilku przypadkach wykorzystano ekstrakcję rozpuszczalnikami następującymi po sobie: chloroform → aceton, etanol → heksan, benzen → eter naftowy, eter dietylowy → aceton → metanol [Honda 2010, Santos 2004, Correche 1998, Oświecimska 1987, Pereira 1994].

Izolacja kwasu usninowego była prowadzona z zastosowaniem chromatografii kolumnowej lub cienkowarstwowej chromatografii preparatywnej, na żelu krzemionkowym standardowym lub, rzadziej, z dodatkiem znacznika fluorescencyjnego, w fazach ruchomych zestawionych w Tabeli 6. W pojedynczych przypadkach wykorzystano chromatografię próżniowo-cieczową VLC [König 1999] oraz preparatywną wysokosprawną chromatografię cieczową HPLC [Pereira 1994]. Opisano również izolację kwasu usninowego z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii bibułowej [Gertig 1960]. Często kwas usninowy wypadł jako osad podczas ochładzania wyciągów, był wówczas poddawany kilkukrotnej rekrytalizacji w celu oczyszczenia [Lohezic Le Devehat 2007, Ingolfssdottir 1998, Krivoshchekova 1983, Marcano 1999, Correche 1998, Einarsdottir 2010, Stark 1950, Jin 2008 i in.].

Uzyskany związek identyfikowano metodami chromatograficznymi, najczęściej TLC poprzez kochromatografię z substancją referencyjną, rzadziej HPLC, a także pomiarem temperatury topnienia, skręcalności optycznej, czy metodami spektralnymi: IR, UV, ^1H -, ^{13}C -NMR, MS.

Zestawienie warunków ekstrakcji, izolacji i identyfikacji kwasu usninowego przedstawione jest w Tabeli 5, natomiast zestawienie wykorzystywanych faz ruchomych przedstawia Tabela 6.

Tabela 5. Warunki ekstrakcji, izolacji i identyfikacji kwasu usninowego

MATERIAŁ ROŚLINNY	EKSTRAKCCJA, ROZPU SZ-CZALNIK	IZOLACJA	IDENTYFIKACJA	CYTOWANIE
<i>Usnea subcavata</i> , <i>Ramalina sp.</i> , rozdrobniony	aparatus Soxhle ta, chloroform →aceton	CC (SP: żel krzemionkowy, MP: gradient heksan-aceton, heksan-chloroform, o wzrastającej polarno ści)	TLC, HPLC, UV, IR, MS, NMR	Santos 2004, Honda 2010
<i>Usnea articulata</i> , sproszkowany	aparatus Soxhle ta, heksan	osad wypadający podczas ochładzania wyciągu	¹ H-, ¹³ C-NMR, LSIMS, HRLSIMS	Lohezic Le Devehat2007
<i>Cladonia foliacea</i> , sproszkowany	aceton, temperatura pokojowa, ultradźwięki	pTLC (SP: żel krzemionkowy 60 F ₂₅₄ , MP: toluen-lodowaty kwas octowy 20:3, toluen-dioksan-lodowaty kwas octowy 36:9:1, heksan-eter dietylowy-kwas mrówkowy 24:8:4)		Yilmaz 2004
<i>Cladia retipora</i> , rozdrobniony	aparatus Soxhle ta, eter dietylowy	krystalizacja i rekrytalizacja CC (SP: żel krzemionkowy zwykły lub C-18)	¹ H-NMR, ¹³ C-NMR	Perry 1999
<i>Lecanora muralis</i> , rozdrobniony	w kolbie pod chłodnicą zwrotną, dichlorometan	VLC (MP: gradient heksan-octan etylu)	IR, UV, ¹ H-, ¹³ C-NMR	König 1999
<i>Cladonia arbuscula</i> , rozdrobniony	aparatus Soxhle ta, eter dietylowy	osad wypadający podczas ochładzania wyciągu	temperatura topnienia, IR, ¹ H-, ¹³ C-NMR	Ingolfstdottir 1998
<i>Asahinea chrysantha</i> , <i>A. scolanderi</i> , <i>Parmelia birulae</i> , rozdrobniony	aparatus Soxhle ta, heksan	osad wypadający podczas ochładzania wyciągu	temperatura topnienia, ¹ H-, ¹³ C-NMR, MS	Krivoshchekova 1983
<i>Usnea laevis</i> , sproszkowany	aparatus Soxhle ta, eter naftowy	osad wypadający podczas ochładzania wyciągu	temperatura topnienia, TLC, IR, MS, ¹ H-NMR	Marcano 1999
<i>Xanthoparmelia somloensis</i> , sproszkowany	aceton, temperatura pokojowa	CC (SP: żel krzemionkowy, MP: eter naftowy-octan etylu 1:9)	1D, 2D-NMR	Burlando 2009
<i>Usnea densirostra</i> , sproszkowany	w kolbie pod chłodnicą,	osad wypadający podczas ochładzania	temperatura topnienia,	Correche 1998

	etanol →heksan	dziania wyciągu	¹ H-, ¹³ C-NMR	
<i>Cladonia arbuscula</i> , <i>Alectoria ochroleuca</i> , sproszkowany	aparatus Soxhleeta, benzyna lekka	osad wypadający podczas ochładzania wyciągu, rekrytalizacja osadu	temperatura topnienia, HPLC, IR, ¹ H-, ¹³ C-NMR	Einarsdottir 2010
<i>Ramalina farinacea</i> , rozdrobniony	aceton, temperatura pokojowa, ultradźwięki	pTLC (SP: żel krzemionkowy F ₂₅₄ , MP: toluen-octan etylu-kwas mrówkowy 139:83:8)	TLC	Tay 2004
<i>Ramalina reticulata</i> , rozdrobniony	aceton, temperatura pokojowa	osad wypadający po odstawieniu wyciągu, rozpuszczony w metanolu→eterze naftowym→mieszaninie acetonu i etanolu(10:1), rekrytalizacja z acetonu	miar skręcalności	Stark 1950
<i>Usnea longissima</i> , sproszkowany	aparatus Soxhleeta, aceton	osad wypadający podczas ochładzania wyciągu, rekrytalizacja z etanolu	IR, ¹ H-, ¹³ C-NMR	Jin 2008
<i>Usnea longissima</i> , rozdrobniony	aparatus Soxhleeta, eter dietylowy	osad wypadający podczas ochładzania wyciągu, CC (SP: żel krzemionkowy, MP: chloroform-heksan 80:20)	UV, IR, ¹ H-, ¹³ C-NMR	Odabasoglu 2006
<i>Xanthoparmelia chlorochroa</i> , rozdrobniony	aceton, temperatura pokojowa	elucja wyciągu dichlorometanem i wodą, osad wypadający po odparowaniu dichlorometanu	miar skręcalności	Dailey 2008
<i>Cladonia sylvatica</i> , sproszkowany	w kolbie pod chłodnicą zwrotną, benzen	elucja wyciągu eterem naftowym, osad wypadający podczas ochładzania frakcji eterowej, następnie rekrytalizacja z benzenu	temperatura topnienia, mmiar skręcalności, IR	Oświecimska 1987
<i>Ramalina farinacea</i> , <i>Cladonia foliacea</i> , sproszkowany	aceton, temperatura pokojowa, ultradźwięki	pTLC (SP: żel krzemionkowy, MP: toluen-octan etylu-kwas mrówkowy 139:83:8)	TLC, IR, temperatura topnienia, mmiar skręcalności	Cetin 2008
<i>Cladonia substellata</i> , rozdrobniony	aparatus Soxhleeta, chloroform	osad wypadający podczas ochładzania	¹ H-, ¹³ C-NMR	Bomfim 2009

		dzania wyciągu, CC (SP: żel krzemionkowy, MP: chloroform- heksan 80:20)		
<i>Cladonia convoluta</i> , sproszkowany	aparat Soxhleta, heksan	osad wypadający podczas ochłá- dzania wyciągu, rekrytalizacja z heksanu	?	Bezivin 2004
<i>Usnea fasciata</i> , roz- drobniony	w kolbie pod chłodnicą zwrot- ną, eter dietylowy→ aceton→metanol	HPLC (SP: RP- 18, MP: metanol- woda-kwas octo- wy 80:19:0.5)	HPLC	Pereira 1994
<i>Usnea rubicunda</i> , <i>Nephroma laeviga- tum</i> , <i>Parmelia tincti- na</i> , sproszkowany	aceton, tempera- tura pokojowa	CC, pTLC (SP: żel krzemionko- wy, MP: heksan, heksan-eter ety- lowy 8:2, 5:5 i 2:8, eter etylowy- aceton 8:2, 5:5 i 2:8)	TLC, tempe- ratura top- nienia, UV, MS	Garcia Rowe 1999
<i>Cladonia sp.</i> , <i>Ever- nia sp.</i> , <i>Flavoparme- lia sp.</i> , <i>Flavocetraria sp.</i> , <i>Hypogymnia sp.</i> , <i>Nephroma sp.</i> , <i>Ophioparma sp.</i> , <i>Parmelia sp.</i> , <i>Rama- lina sp.</i> , <i>Usnea sp.</i> , <i>Xanthoparmelia sp.</i> , <i>Alectoria sp.</i> , <i>Cetra- ria sp.</i> , <i>Nephro- mopsis sp.</i> , <i>Parme- liopsis sp.</i> , <i>Vulpicida sp.</i>	aceton, tempera- tura pokojowa	identyfikacja enantjomerów kwasu usninowe- go oraz izousni- nowego	HPLC	Kinoshita 1997
<i>Cladonia sylvatica</i> , sproszkowany	w kolbie pod chłodnicą zwrot- ną, chloroform	pPC (MP: buta- nol-aceton-woda 5:1:2)	TLC, UV	Gertig 1960

CC – chromatografia kolumnowa; VLC – chromatografia próżniowo-cieczowa; pTLC - preparatywna chromatografia cienkowarstwowa; pPC – preparatywna chromatografia bibułowa; HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa; SP – faza stacjonarna; MP – faza ruchoma

Tabela 6. Zestawienie faz ruchomych wykorzystywanych do izolacji kwasu usninowego

faza ruchoma	cytowanie
chloroform-heksan 80:20	Odabasoglu 2006 Bomfim 2009
eter etylowy-aceton 2:8	Garcia Rowe 1999
eter etylowy-aceton 5:5	Garcia Rowe 1999
eter etylowy-aceton 8:2	Garcia Rowe 1999
eter naftowy-octan etylu 1:9	Burlando 2009
heksan-aceton (gradient)	Honda 2010
heksan-chloroform (gradient)	Santos 2004
heksan-eter dietylowy-kwas mrówkowy 24:8:4	Yilmaz 2004
heksan-eter etylowy 2:8	Garcia Rowe 1999
heksan-eter etylowy 5:5	Garcia Rowe 1999
heksan-eter etylowy 8:2	Garcia Rowe 1999
heksan-octan etylu (gradient)	König 1999
toluen-dioksan-lodowaty kwas octowy 36:9:1	Yilmaz 2004
toluen-lodowaty kwas octowy 20:3	Yilmaz 2004
toluen-octan etylu-kwas mrówkowy 139:83:8	Tay 2004 Cetin 2008 Be Gora 2000

5.1.6. Badania ilościowe

Analiza ilościowa kwasu usninowego w różnych gatunkach była prowadzona najczęściej z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC [Bjerke 2002, Bjerke 2005, Caviglia 2001, Cansaran 2007, Cansaran 2008, Lisickov 2002, Nybakken 2006, Nybakken 2010, Bezivin 2004, Toledo Marante 2003, Ji 2005], rzadziej metody densytometrycznej [Polonia 2001, Be Gora 2000, Be Gora 2001]. Pojedyncze prace opisują zastosowanie metody micelarnej chromatografii kinetycznej [Falk 2008], elektroforezy kapilarnej [Kreft 2001] czy kolorymetrycznego pomiaru ekstynkcji [Gertig 1960].

Zestawienie metod i warunków przeprowadzania analizy ilościowej przedstawione jest w Tabeli 7.

Tabela 7. Zestawienie metod i warunków przeprowadzania analizy ilościowej kwasu usninowego

METODA	WARUNKI ANALIZY	CYTOWANIE
micelarna chromatografia elektrokinetyczna	kapilara: $\varnothing$ 50 μ m i.d., l=32.5 cm (24 cm do detektora) napięcie +10kV, natężenie ~30 mA MP: mieszanina 20mM tetraboranu sodowego (pH 9.3), 60mM siarczanu do decylu sodu i 30mM β cyklodekstryny detekcja: λ =214 nm	Falk 2008
kolorymetryczna, pomiar ekstynkcji	odczynniki do reakcji barwnej: mieszanina 1% roztworu octanu uranylu i 1% roztworu chlorku żelaza (1:1) filtr: S ₄₇	Gertig 1960
elektroforeza kapilarna RP	kapilara: stopiona krzemionka (fused-silica), $\varnothing$ 50 μ m, l=32.5 cm (24 cm do detektora) napięcie -30kV, natężenie 41-45 μ A temperatura: 30°C MP: mieszanina 50 mL 1 M wodnego roztworu NaOH, 50 mL 3% metanolewego roztworu kwasu octowego i 900 mL metanolu (pH 11.2) detekcja: λ =290 nm	Kreft 2001
UPLC	kolumna: C18, 50x2.1 mm MP: gradient woda (A)-acetonitryl (B), od 10 do 30 % B w ciągu 6 min, potem liniowo do 95% B przez 9 min, następnie spadek do 10% B w ciągu 5 min temperatura: 50°C	Dailey2010
HPLC RP	kolumna: C18, 3.9x150 mm MP: mieszanina metanolu i 1% wodnego roztworu kwasu ortofosforowego, zawartość metanolu wzrastała z 30 do 90% w ciągu 13 min temperatura: 25°C detekcja: λ =250-420 nm; $\lambda_{\max}$ =233 i 282 nm	Bjerke 2002, 2005
HPLC	kolumna: C18 MP: metanol-woda-kwas octowy 81:14:5 detekcja: λ =254 nm	Caviglia 2001
HPLC RP	kolumna: 250x4.6 mm MP: metanol-bufor fosforanowy (pH 7.4) 70:30 detekcja: λ =245 nm	Cansaran 2007, 2008
HPLC	kolumna: C18 (250/8/4) MP: 0.05 M roztwór węglanu amonu-metanol 3:7 temperatura: 35°C detekcja: λ =298 nm (DAD)	Lisickov 2002
HPLC	kolumna: ODS (60x4.6 mm) MP: mieszanina 0.25% roztworu kwasu ortofosforowego i 1.5% tetrahydrofuranu w wodzie (A) oraz 100% metanolu	Nybakken 2006 Nybakken 2010

	(B), w gradiencie początkowo 30% B, po 15 min. wzrost do 70% B i w kolejnych 15 min. do 100% B, następnie izokratycznie 100% B przez 5 min. temperatura: 25°C detekcja: $\lambda=245$ nm (diode array)	
HPLC	kolumna: C18 (250x4.6 mm, 5 μ m) MP: acetonitryl-woda-kwas trójfluorooctowy 70:30:0.5 detekcja: $\lambda=290$ nm	Bezivin 2004
HPLC	kolumna: C18 MP: kwas octowy-woda-metanol 0.4:19.6:80.0 i 0.8:39.2:60.0 temperatura: 25°C detekcja: $\lambda=254$ nm (uv detektor)	Toledo Marante 2003
HPLC RP	kolumna: RP18 MP: wodny 0.1% roztwór kwasu octowego (A) - acetonitryl (B), od 60A:40B do 10A:90B w ciągu 20 min temperatura: 30°C detekcja: $\lambda=233$ nm (photodiode array)	Ji 2005
densytometryczna HPTLC	MP: toluen-lodowaty kwas octowy 9:1 detekcja: $\lambda=285$ nm	Polonia 1991
densytometryczna	SP: żel krzemionkowy 60 F ₂₅₄ MP: toluen-octan etylu-kwas mrówkowy 139:83:8; toluen-kwas octowy 100:15 detekcja: $\lambda=365$ nm	Be Gora 2000, 2001

$\emptyset$ – średnica kapilary; l – długość kapilary; λ – długość fali

SP – faza stacjonarna; MP – faza ruchoma

Zawartość kwasu usninowego w badanych gatunkach jest trudna do porównania, ponieważ poszczególni autorzy podają ilość tego związku w różnych jednostkach. Można jednak przyjąć, że zawartość ta mieściła się w przedziale od 0.006% w *Parmelia soledians* [Caviglia 2001] do 5.30% w *Flavocetraria nivalis* [Bjerke 2005]. W obrębie zbadanych gatunków z rodzaju *Cladonia* zawartość kwasu usninowego mieściła się w granicach od 0.14% w *Cladonia fimbriata* [Cansaran 2008] do 1.083% w *Cladonia stellaris* [Nybakken 2010].

Zestawienie zawartości kwasu usninowego określoną w różnych gatunkach przedstawia Tabela 8.

Tabela 8. Zawartość kwasu usninowego w różnych gatunkach porostów

GATUNEK	ILOŚĆ	CYTOWANIE
<i>Cladina stellaris</i>	9.39±4.66 mg/g 10.83±0.90 mg/g	Falk 2008 Nybakken 2010
<i>Cladonia arbuscula</i>	6.81±3.45 mg/g 0.800 - 0.875% 3.33±0.32 mg/g	Falk 2008 Gertig 1960 Nybakken 2010
<i>Cladonia conicria</i>	nd	Cansaran 2008
<i>Cladonia convoluta</i>	0.92%	Bezivin 2004
<i>Cladonia fimbriata</i>	0.14%	Cansaran 2008
<i>Cladonia mitis</i>	5.92 – 8.66 mg/ml	Be Gora 2001
<i>Cladonia rangiferina</i>	nd	Falk 2008
<i>Cladonia uncialis</i>	0.52 mg/ml	Be Gora 2001
<i>Evernia prunastri</i>	0.19±0.02 mg/g	Nybakken 2010
<i>Flavocetraria cuculata</i>	9.39±4.86 mg/g	Falk 2008
<i>Flavocetraria nivalis</i>	16.2±0.69 mg/g 1.0 - 2.6 % 5.11 - 5.30 %	Falk 2008 Bjerke 2002 Bjerke 2005
<i>Lethariella canariensis</i>	0.01-0.06% wyciągu	Toledo Marante 2003
<i>Parmelia caperata</i>	1.022 - 1.125 mg/100g	Caviglia 2001
<i>Parmelia soledians</i>	0.557 – 1.008 mg/100g	Caviglia 2001
<i>Ramalina capitata</i>	1.25±0.29 %	Cansaran 2008
<i>Ramalina fastigiata</i>	3.23±0.16 %	Cansaran 2008
<i>Ramalina fraxinea</i>	0.13±0.01 %	Cansaran 2008
<i>Ramalina pollinaria</i>	0.22±0.01 %	Cansaran 2008
<i>Ramalina polymorpha</i>	0.27±0.02 %	Cansaran 2008
<i>Stereocaulon sp.</i>	nd	Falk 2008
<i>Usnea barbata</i>	3.5 - 11,5 µg/15 mg wyciągu 10.33 – 56.76 % wyciągu	Kreft 2001 Lisickov 2002
<i>Usnea florida</i>	3.58 - 4.11 g%	Polonia 1991
<i>Xanthoparmelia chlorochroa</i>	8.41±3.67 - 18.13±4.49 µg/ml	Dailey 2010

nd – nie wykrywalny

5.1.7. Wpływ czynników na zawartość kwasu usninowego w porostach

W kilku pracach opisano wpływ różnych czynników na zawartość kwasu usninowego w porostach. Badania te prowadzono zarówno w warunkach in vitro [Bjerke 2002, Be Gora 2001, Nybakken 2006], jak i w środowisku naturalnym [Bjerke 2002, Bjerke 2005, Be Gora 2001, Toledo Marante 2003, Caviglia 2001], w zależności od określanego czynnika. W warunkach laboratoryjnych materiał roślinny poddawano naświetlaniu światłem UV o różnej intensywności [Bjerke 2002, Be Gora 2001]. Określano także optymalną porę i miejsce zbioru porostów w celu pozyskania materiału o największej zawartości kwasu usninowego [Bjerke 2002, Bjerke 2005, Be Gora 2001, Toledo Marante 2003], a w jednej z prac porównano wyniki analizy przeprowadzonej in vitro z wynikami badań materiału zebranego w terenie [Be Gora 2001]. Dwie prace dotyczą prób określenia optymalnego rozpuszczalnika do ekstrakcji kwasu usninowego z materiału roślinnego [Lisickov 2002, Bezivin 2004]. Ciekawe badanie przeprowadzone przez Caviglia i wsp. opisuje wpływ herbicydu na zawartość kwasu usninowego w dwóch gatunkach porostów [Caviglia 2001].

a) wpływ promieniowania UV

Bjerke i wsp. określali wpływ promieniowania ultrafioletowego i światła widzialnego na zawartość kwasu usninowego w plechach *Flavocetraria nivalis* (1 stanowisko) i *Ophioparma ventosa* (3 stanowiska), zebranych w Norwegii, a następnie hodowanych w warunkach in vitro i poddawanych naświetlaniu światłem UV-B (4h dziennie) bądź pozostających pod wpływem światła widzialnego (8h dziennie) przez 30 dni. Po tym czasie materiał roślinny wysuszono i poddano dwukrotnej ekstrakcji acetonem w temperaturze pokojowej przez 24 h, z wytrząsaniem. Podobną procedurę powtórzono z użyciem metanolu. Wyciągi acetonowe analizowano pod kątem zawartości kwasu usninowego metodą HPLC (warunki - Tabela 7). W plechach *Flavocetraria nivalis* poddanych działaniu UV-B po 30 dniach zaobserwowano znaczny wzrost ilości kwasu usninowego, o 31% wyższy niż w próbkach wyjściowych, podczas gdy próbki będące pod wpływem światła widzialnego miały o 28% mniej kwasu usninowego. W przypadku *Ophioparma ventosa* zaobserwowano wzrost ilości kwasu usninowego zarówno w próbkach poddanych działaniu UV-B, jak i światła widzialnego, jednak różnice pomiędzy obiema grupami nie były statystycznie istotne [Bjerke 2002].

Be Gora i Fahlset badali fotostabilność kwasu usninowego pod wpływem światła UV metodą densytometryczną. Materiał roślinny (*Cladonia uncialis*) ekstrahowano acetonem, uzyskane wyciągi наносzono na płytki chromatograficzne, które po rozwinięciu poddawano naświetlaniu promieniami UV A/B, a następnie analizowano densytometrycznie (warunki - Tabela 7). Odczyty prowadzono co 20 minut aż do 240 minut całkowitego czasu analizy. Zaobserwowano, że kwas usninowy osiągał fotostabilność dopiero po upływie 2 h. Wynik ten należy uwzględniać przy analizie densytometrycznej chcąc uzyskać wiarygodne wyniki ilościowe [Be Gora 2000].

Ta sama grupa autorów badała ilościowo wpływ naświetlania promieniami UV A i B na zawartość kwasu usninowego w plechach *Cladonia uncialis* metodą densytometryczną (warunki - Tabela 7). Zaobserwowano wyraźny wzrost ilości kwasu usninowego w próbkach poddanych działaniu promieniowania UV-A o niskiej i wysokiej intensywności, połączonemu ze światłem widzialnym, podczas gdy próbki poddane promieniowaniu UV-B oraz łącznie UV-A i B nie różniły się istotnie od kontroli zawartością kwasu usninowego [Be Gora 2001].

Nybakken i wsp. określali wpływ naświetlania promieniowaniem UV na stymulację syntezy kwasu usninowego w *Cladonia arbuscula*, *C. rangiferina* i *C. stellaris* w warunkach laboratoryjnych. Plechy poddawano przez 4 tygodnie naświetlaniu światłem widzialnym (warunki kontrolne) przez 18 h dziennie, bądź światłem widzialnym i dodatkowo UV-B przez 3 h 15 min. Po zakończeniu eksperymentu materiał roślinny wysuszono i poddano ekstrakcji acetonem. Wyciągi analizowano pod kątem zawartości kwasu usninowego metodą HPLC (warunki - Tabela 7). W plechach *Cladonia arbuscula* i *C. stellaris* poddanych działaniu UV-B zaobserwowano dwukrotny wzrost ilości kwasu usninowego w odniesieniu do warunków kontrolnych, natomiast w *Cladonia rangiferina* taki efekt się nie pojawił [Nybakken 2006].

b) różna lokalizacja i pora zbioru

Bjerke i wsp. zbadali różnice w zawartości kwasu usninowego pomiędzy próbkami *Ophioparma ventosa*, zebranymi w trzech różnych lokalizacjach: w lesie sosnowym, górskim piętrze alpejskim oraz w zacienionym wąwozie. Najwięcej kwasu usninowego zawierały egzemplarze zebrane w górach, ilość ta przekraczała wyraźnie zawartość badanego metabolitu w plechach z pozostałych dwóch lokalizacji, które nieznacznie tylko różniły się między sobą [Bjerke 2002].

Ten sam zespół badał też ilościowo zmiany zawartości kwasu usninowego w plechach *Flavocetraria nivalis* w zależności od pory zbioru surowca. Materiał roślinny zebrany był w czterech różnych lokalizacjach: w Norwegii (21 próbek, czas zbioru: 21.10.2000-8.08.2002), na Spitsbergenie (12 próbek, czas zbioru: 20.07.2000-15.07.2001), na Grenlandii (11 próbek, czas zbioru: 4.09.2000-20.08.2001) oraz w Chile (14 próbek, czas zbioru: 30.01.2001-30.03.2002). Zebrane próbki wysuszono i przechowywano w temperaturze pokojowej w zaciemnionym miejscu aż do czasu analizy. Materiał roślinny macerowano przez 24 h w acetonie, następnie w mieszaninie 1:1 acetonu i metanolu i ostatecznie w czystym metanolu. Wyciągi analizowano ilościowo metodą HPLC (warunki - Tabela 7). Średnia zawartość kwasu usninowego z poszczególnych lokalizacji wahała się od 5.11-5.30%, najwięcej kwasu usninowego zawierały próbki zebrane na Grenlandii a najmniej – na Spitsbergenie. Porosty z lokalizacji w Norwegii zawierały średnio 5.28%, a próbki z Chile 5.24%. Różnice w zawartości kwasu usninowego w próbkach surowców zebranych w kolejnych czasach zbioru były znaczne. Najwięcej badanego związku zawierały próbki zebrane późną wiosną i w lecie, a najmniej w okazach z jesieni i zimy. Wyjątkiem od tej reguły były próbki porostów zebranych na Grenlandii, wśród których zaobserwowano podobny poziom kwasu usninowego zarówno na wiosnę i w lecie, jak i późną jesienią i zimą [Bjerke 2005].

Be Gora i Fahlset porównali zawartość kwasu usninowego w plechach *Cladonia mitis*, zebranych w różnych porach roku: na początku listopada, na początku lutego, pod koniec kwietnia i pod koniec lipca. Ilość kwasu usninowego była najwyższa w jesieni i zimą, odpowiednio 8.14 i 8.66 mg/ml, a najniższa na wiosnę i w lecie, odpowiednio 5.92 i 6.15 mg/ml. Wyniki te są zgodne z wcześniej opisaną analizą próbek naświetlanych w laboratorium, ponieważ wiosną i latem promieniowanie UV-B jest wyższe w warunkach naturalnych niż jesienią i zimą [Be Gora 2001].

Zawartość kwasu usninowego w plechach *Lethariella canarensis*, zebranych latem i zimą, była określona metodą HPLC w badaniach Toledo-Marante i wsp. Zaobserwowano nieznaczny wzrost zawartości kwasu usninowego w próbkach zebranych latem (0.01% w ekstrakcie) w porównaniu do zbioru zimowego (0.06% w ekstrakcie) [Toledo Marante 2003]

c) warunki ekstrakcji

Lisickov i wsp. przeprowadzili ekstrakcję kwasu usninowego z *Usnea barbata* za pomocą CO₂ w warunkach nadkrytycznych, dla porównania przeprowadzając również klasyczną ekstrakcję etanolem. Rozdrobniony materiał roślinny macerowano w 96% etanolu w różnych stosunkach objętościowych materiału do solwentu (1:6, 1:9, 1:12 i 1:15) przez 1.5 h w następujących temperaturach: 30, 40, 50 i 60°C. Ekstrakcję nadkrytycznym CO₂ prowadzono przez 3 h

przy ciśnieniu 300 bar, przepływie CO₂ 20 kg/h i temperaturze 30, 40, 50, 60 i 80°C. Uzyskane ilości kwasu usninowego ze wszystkich warunków ekstrakcji etanolowej i nadkrytycznym CO₂ były określone metodą HPLC (warunki - Tabela 7). Zaobserwowano wyraźnie większą wydajność ekstrakcji nadkrytycznym CO₂ (47.94-56.76% kwasu usninowego w wyciągu) w porównaniu do ekstrakcji etanolem (10.33-27.22% kwasu usninowego w wyciągu). Ilość kwasu usninowego w wyciągu zależała od zastosowanej temperatury ekstrakcji. Co ciekawe, zależność ta była odwrotnie proporcjonalna w przypadku ekstrakcji nadkrytycznym CO₂ i wprost proporcjonalna przy ekstrakcji etanolem w zakresie od 30-50°C. W przypadku ekstrakcji etanolem, ilość kwasu usninowego w ekstrakcie różniła się w zależności od zastosowanego stosunku objętościowego materiału roślinnego do rozpuszczalnika, najlepsze wyniki uzyskano w wyciągach 1:6 i 1:9 [Lisickov 2002].

Bezivin i wsp. określali zawartość kwasu (-)-usninowego w wyciągach z *Cladonia convoluta*, przygotowanych z użyciem różnych rozpuszczalników. Sproszkowany materiał roślinny ekstrahowano w aparacie Soxhleta kolejno heksanem, octanem etylu i metanolem. Analizę ilościową prowadzono metodą HPLC (warunki - Tabela 7). Zawartość kwasu usninowego w wyciągu heksanowym, octanowym i metanolowym wynosiła odpowiednio 66, 16 i 1.7%, co wskazuje na heksan jako optymalny rozpuszczalnik [Bezivin 2004].

d) inne

Caviglia i wsp. badali zawartość kwasu usninowego w dwóch gatunkach rodzaju *Parmelia*: *P. caperata* i *P. soredians*, poddanych działaniu Paraquatu, silnego herbicydu wywołującego powstawanie wolnych rodników w roślinie i stres oksydacyjny. Materiał roślinny był zebrany na wybrzeżu we Włoszech z kory drzew oliwnych w lipcu i październiku (grupy kontrolne) oraz w październiku, po potraktowaniu Paraquatem w lipcu. Zebrany materiał był suszony i przechowywany w -20°C do czasu analizy. Ekstrakcję acetonem prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 h, uzyskany ekstrakt odparowano, a suchą pozostałość rozpuszczono w metanolu. Analizę ilościową prowadzono metodą HPLC (warunki - Tabela 7). W gatunku *Parmelia soredians* zaobserwowano znaczny (o 36.3%) wzrost zawartości kwasu usninowego w grupie traktowanej Paraquatem, w stosunku do grupy kontrolnej, podczas gdy w drugim badanym gatunku wzrost ten był zdecydowanie niższy, o 13.7%. Różnice te wskazują na odmienną rolę kwasu usninowego w badanych gatunkach [Caviglia 2001].

5.1.8. Aktywność biologiczna i farmakologiczna

5.1.8.1. Aktywność przeciwbakteryjna

Aktywność przeciwbakteryjną *in vitro* kwasu usninowego zbadano wobec szeregu szczepów bakterii zarówno Gram dodatnich (*Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Propionibacterium*, *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*), jak i Gram ujemnych (*Aeromonas*, *Bacteroides*, *Escherichia*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Yersinia*). W większości przypadków przedmiotem badań był enancjomer (+) [Honda 2010, Perry 1999, König 1999, Ingolfssdottir 1998, Natić 2004, Correche 1998, Tay 2004 i in.], w jednej pracy opisano aktywność kwasu (-)-usninowego [Yilmaz 2004], a w innej

porównano aktywność obu enancjomerów [Lauterwein 1995]. Zestawienie aktywności przeciwbakteryjnej kwasu usninowego przedstawia Tabela 9.

Kwas usninowy wykazał zróżnicowaną, od słabej po umiarkowaną, aktywność przeciwbakteryjną wobec zarówno Gram dodatnich, jak i Gram ujemnych szczepów. Aktywność obydwu enancjomerów była identyczna w przypadku szczepów *Clostridium*, *Propionibacterium* i *Staphylococcus*, wobec szczepów *Bacillus* i *Aeromonas* kwas (-)-usninowy wykazał wyższą aktywność od enancjomeru (+), natomiast w pozostałych przypadkach kwas (+)-usninowy był bardziej aktywny.

Dane dotyczące aktywności kwasu (+)-usninowego wobec niektórych szczepów były niekiedy bardzo zróżnicowane, lub wręcz sprzeczne. Szczególnie widoczne jest to w przypadku *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, gdzie według niektórych autorów badany związek jest nieaktywny [Correche 1998, Perry 1999, König 1999, Tay 2004], posiada aktywność słabą [Perry 1999, Natić 2004] lub wysoką [Tay 2004, Hanuš 2007].

W kilku pracach zbadano także aktywność pochodnych kwasu usninowego, porównując ją z aktywnością macierzystego związku. Pochodne acylohydrazonowe, połączone w kompleksy z palladem i miedzią, wykazały wyższą od wyjściowego związku aktywność wobec *Bacillus subtilis*, przy czym związki kompleksowe palladu charakteryzowały się wyższą aktywnością niż odpowiadające im ligandy [Natić 2004]. Correche i wsp. określali wpływ kwasu dihydroususninowego i dioctanu kwasu usninowego na szczepy *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*. Żaden z badanych związków nie wykazał aktywności wobec *Bacillus subtilis*, natomiast wobec drugiego z badanych szczepów pochodne kwasu usninowego charakteryzowały się niższą aktywnością niż związek wyjściowy [Correche 1998]. Sól sodowa kwasu usninowego w porównaniu do macierzystego związku wykazała dwu- lub trzykrotnie wyższą aktywność wobec klinicznie izolowanych szczepów *Staphylococcus aureus*, opornych na metycylinę oraz *Enterococcus faecium* i *E. faecalis* opornych na wankomycynę [Elo2007].

Ciekawy przykład praktycznego wykorzystania aktywności przeciwbakteryjnej kwasu usninowego opisał Francolini i wsp. Badał on wpływ kwasu usninowego na adhezję bakterii na powierzchni polimerów, z których tworzone są urządzenia i drobny sprzęt medyczny. W tym celu dodawano kwas usninowy do poliuretanu, a następnie określano jego zdolność do hamowania powstawania biofilmu bakteryjnego (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) na jego powierzchni. Jako kontrolę stosowano poliuretan bez dodatku kwasu usninowego. Zabieg dodania kwasu usninowego nie spowodował istotnego zmniejszenia adhezji komórek bakterii do poliuretanu, natomiast wykazywał aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii już przyczepionych. W przypadku biofilmu wytworzonego przez *Pseudomonas aeruginosa*, kwas usninowy powodował wyraźne zmiany w strukturze warstwy bakteryjnej [Francolini 2004].

Tabela 9. Aktywność przeciwbakteryjna in vitro kwasu usninowego

SZCZEP	AKTYWNOŚĆ (+)-USNINOWY	AKTYWNOŚĆ (-)-USNINOWY	CYTOWANIE
<i>Aeromonas hydrophila</i>	- na	MIC 1.2 µg -	Yilmaz 2004 Tay 2004
<i>Bacillus cereus</i>	MIC 6.9 µg/ml - na	- MIC 0.15 µg -	Hanuš 2007 Yilmaz 2004 Tay 2004
<i>Bacillus megaterium</i>	MIC 7.7 µg/ml IZ 10 mm (50 µg)	- -	Hanuš 2007 König 1999
<i>Bacillus subtilis</i>	- MIC 6.3 µg/ml IZ 23 mm (250 µg) IZ 10 mm (60 µg) na MIC 0.036 mM	MIC 0.61 µg - - - - -	Yilmaz 2004 Hanuš 2007 Natić 2004 Perry 1999 Correche 1998 Tay 2004
<i>Bacteroides thetaiota-micron</i>	MIC 4 µg/ml	MIC 8 µg/ml	Lauterwein 1995
<i>Bacteroides vulgatus</i>	MIC 4 µg/ml	MIC 8 µg/ml	Lauterwein 1995
<i>Bacteroides fragilis</i>	MIC 2 µg/ml	MIC 1 µg/ml	Lauterwein 1995
<i>Bacteroides ruminicola</i> <i>ssp. brevis</i>	MIC 8 µg/ml	MIC 16 µg/ml	Lauterwein 1995
<i>Bacteroides loeschii</i>	MIC 2 µg/ml	MIC 2 µg/ml	Lauterwein 1995
<i>Clostridium perfringens</i>	MIC 4 µg/ml	MIC 4 µg/ml	Lauterwein 1995
<i>Enterococcus faecalis</i>	IZ 23 mm (40 mg/ml) MIC 4-8 µg/ml	- MIC 4-16 µg/ml	Elo 2007 Lauterwein 1995
<i>Enterococcus faecium</i>	IZ 18-23 mm (40 mg/ml) MIC 4-16 µg/ml	- MIC 4-16 µg/ml	Elo 2007 Lauterwein 1995
<i>Escherichia coli</i>	MIC 4.9 µg/ml na na IZ 5 mm (250 µg) na	- - - - -	Hanuš 2007 Perry 1999 König 1999 Natić 2004 Tay 2004
<i>Helicobacter pylori</i>	MIC ₅₀ 0.064 µg/ml	-	Safak 2009
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	na	-	Tay 2004
<i>Listeria monocytogenes</i>	- MIC 0.018 mM	MIC 0.31 µg -	Yilmaz 2004 Tay 2004
<i>Mycobacterium aurum</i>	MIC 32 µg/ml	-	Ingolfssdottir 1998
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MIC 62.5 µg/ml	-	Honda 2010
<i>Propionibacterium acnes</i>	MIC 2 µg/ml	MIC 2 µg/ml	Lauterwein 1995
<i>Proteus vulgaris</i>	- MIC 0.036 mM	MIC 0.15 µg -	Yilmaz 2004 Tay 2004
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MIC 5.2 µg/ml na IZ 5 mm (250 µg) na	- - - -	Hanuš 2007 Perry 1999 Natić 2004 Tay 2004

<i>Pseudomonas syringae</i>	na	-	Tay 2004
<i>Salmonella choleraesius</i>	MIC 6.3 µg/ml	-	Hanuš 2007
<i>Salmonella enterica typhi</i>	MIC 8.2 µg/ml	-	Hanuš 2007
<i>Salmonella enterica typhimurium</i>	MIC 5.4 µg/ml	-	Hanuš 2007
<i>Salmonella typhimurium</i>	na	-	Tay 2004
<i>Sarcina lutea</i>	MIC 19.1 µg/ml	-	Hanuš 2007
<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC 8.3 µg/ml - MIC 6.06 µg/ml MIC 0.15 mM IZ 13-16 mm (40 mg/ml) MIC 2-16 µg/ml	- MIC 2.4 µg - - - MIC 2-16 µg/ml	Hanuš 2007 Yilmaz 2004 Correche 1998 Tay 2004 Elo 2007 Lauterwein 1995
<i>Streptococcus faecalis</i>	- MIC 0.073 mM	MIC 0.15 µg -	Yilmaz 2004 Tay 2004
<i>Yersinia enterocolitica</i>	MIC 0.018 mM	-	Tay 2004

MIC – minimalne stężenie hamujące, IZ – strefa zahamowania, na – nieaktywny

Jedno badanie, przeprowadzone w 1950 roku przez Marshaka i Kuschnera, dotyczy aktywności przeciwbakteryjnej kwasu usninowego *in vivo* wobec eksperymentalnie wywołanej gruźlicy u 99 świń morskich. Zwierzęta podzielono na 5 grup: grupa 1 była grupą kontrolną, bez podawania leków, grupa 2 otrzymywała podskórnie 20 mg kwasu usninowego przez 6 dni, a następnie 10 mg przez 24 dni, grupa 3 i 4 otrzymywała przez 30 dni streptomycynę w ilości odpowiednio 3 i 1 mg, grupa 5 otrzymywała kwas usninowy w schemacie dla grupy 2 i dodatkowo 2 mg streptomycyny przez 30 dni. Po zakończeniu eksperymentu, zwierzęta zostały uśmiercone, a ich organy (płuca, wątroba, śledziona) poddane analizie histopatologicznej. W grupie 2 i 5, otrzymującej kwas usninowy, zaobserwowano niewielki spadek wagi ciała w porównaniu do pozostałych grup. Najmniejsze zmiany wywołane rozwojem choroby zaobserwowano u zwierząt z grupy 3 i 5, które otrzymywały odpowiednio streptomycynę w większej dawce lub kwas usninowy i streptomycynę łącznie. Grupa zwierząt poddana terapii tylko kwasem usninowym nie wykazała znaczącego zahamowania postępu choroby, podobnie jak grupa z niższą dawką streptomycyny [Marshak1950].

5.1.8.2. Aktywność przeciwgrzybicza

Aktywność przeciwgrzybiczą kwasu usninowego zbadano wobec szeregu szczepów, będących zarówno patogenami ludzkimi (*Candida*, *Aspergillus* i in.) jak i roślinnymi (*Ustilago*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Alternaria* i in.), a także wobec gatunków niepatogennych (*Saccharomyces*, *Aspergillus* i in.). W większości przypadków badano kwas (+)-usninowy [Hanuš 2007, Natić 2004, Perry 1999, Tay 2004, König 1999, Correche 1998], jedynie dwie prace dotyczą aktywności kwasu (-)-usninowego [Halama 2004, Yilmaz 2004], z czego jedna porównuje aktywność obydwu enancjomerów [Halama 2004]. Obydwa enancjomery charakteryzowały się zróżnicowaną aktywnością przeciwgrzybiczą wobec większości badanych szczepów, od słabej [Natić 2004, Perry 1999, König 1999] poprzez umiarkowaną [Hanuš 2007] po wysoką [Yilmaz 2004, Tay 2004]. Kwas (+)-usninowy był nieaktywny wobec *Fusarium oxysporum* [König 1999] i *Saccharomyces cerevisiae* [Correche 1998]. Zarówno kwas (+), jak i (-)-

usninowy nie wykazały aktywności wobec *Phytophthora infestans*, *Pythium ultimum* i *Ustilago maydis* [Halama 2004], natomiast wobec *Candida albicans* i *Candida glabrata* enancjomer (-) był bardziej aktywny. Warto zauważyć, że w przypadku tych dwóch szczepów *Candida* aktywność kwasu (+)-usninowego, podawana według różnych autorów, różniła się znacznie.

Zestawienie aktywności przeciwgrzybiczej kwasu usninowego przedstawione jest w Tabeli 10.

Tabela 10. Aktywność przeciwgrzybicza in vitro kwasu usninowego

SZCZEP	AKTYWNOŚĆ (+)-USNINOWY	AKTYWNOŚĆ (-)-USNINOWY	CYTOWANIE
<i>Alternaria brassicicola</i>	MIC 32.1 µg/ml	-	Hanuš 2007
<i>Aspergillus flavus</i>	MIC 20.1 µg/ml	-	Hanuš 2007
<i>Aspergillus nidulans</i>	MIC 14.3 µg/ml	-	Hanuš 2007
<i>Aspergillus niger</i>	MIC 5.8 µg/ml IZ 5 mm (250 µg)	- -	Hanuš 2007 Natić 2004
<i>Aspergillus ochraceus</i>	MIC 11.3 µg/ml	-	Hanuš 2007
<i>Aspergillus sojae</i>	MIC 6.4 µg/ml	-	Hanuš 2007
<i>Candida albicans</i>	MIC 21.4 µg/ml IZ 1 mm (60 µg) MIC 0.002 mM -	- - - MIC 0.15 µg	Hanuš 2007 Perry 1999 Tay 2004 Yilmaz 2004
<i>Candida glabrata</i>	MIC 29.2 µg/ml MIC 0.002 mM -	- - MIC 0.15 µg	Hanuš 2007 Tay 2004 Yilmaz 2004
<i>Candida krusei</i>	MIC 30.1 µg/ml	-	Hanuš 2007
<i>Candida tropicalis</i>	MIC 20.9 µg/ml	-	Hanuš 2007
<i>Eurotium repens</i>	IZ 1 mm (50 µg)	-	König 1999
<i>Fusarium moniliforme</i>	MIC 18.6 µg/ml	-	Hanuš 2007
<i>Fusarium oxysporum</i>	na	-	König 1999
<i>Mycotypha microspora</i>	IZ 3 mm (50 µg)	-	König 1999
<i>Phytophthora infestans</i>	na	na	Halama 2004
<i>Pythium ultimum</i>	na	na	Halama 2004
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	na	-	Correche 1998
<i>Trichoderma viridae</i>	MIC 14.2 µg/ml	-	Hanuš 2007
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	MIC 18.0 µg/ml IZ 5 mm (60 µg)	- -	Hanuš 2007 Perry 1999
<i>Ustilago maydis</i>	na	na	Halama 2004
<i>Ustilago violacea</i>	IZ 1mm (50 µg)	-	König 1999

MIC – minimalne stężenie hamujące, IZ – strefa zahamowania, na – nieaktywny

5.1.8.3. Aktywność przeciwwirusowa

Kwas usninowy w nielicznych badaniach wykazał słabą aktywność przeciwwirusową wobec wirusów HSV (*Herpes simplex* typu 1) i PSV1 (wirus polio typu1), powodując ponad 4 mm strefę zahamowania wzrostu w stężeniu 30 µg/dysk, a w przypadku wirusa HSV również w stężeniu 7.5 µg/dysk [Perry 1999]. W kilku przypadkach opisano wpływ kwasu usninowego na enzymy wirusowe, takie jak integraza czy odwrotna transkryptaza, jak również badano wpływ tego związku na kwasy nukleinowe mysiego wirusa polyoma. Stwierdzono, że kwas usninowy posiadał słabą aktywność hamującą aktywność integrazy wirusa HIV-1wartość IC₅₀ wynosiła 126.4 µM [Neamati 1997], natomiast nie wykazał w stężeniu 50 µg/ml aktywności hamującej na odwrotną transkryptazę wirusa HIV1 [König 1999].

W badaniach nad wpływem kwasu usninowego na mysie wirusy polyoma określano jego potencjalne interakcje z wirusowym RNA. Mysie fibroblasty linii 3T6 transfekowano wirusem polyoma i inkubowano z kwasem usninowym, rozpuszczonym w DMSO, w stężeniach 5 i 10 µg/ml lub w medium bez dodatku kwasu usninowego (kontrola). Kwas usninowy znacząco hamował namnażanie wirusowego DNA już w stężeniu 5 µg/ml. Zaobserwowano również, że po usunięciu kwasu usninowego z hodowli, DNA wirusowe namnażało się ponownie. Dodatkowo stwierdzono, że kwas usninowy hamuje silnie replikację RNA, wyizolowanego z transfekowanych komórek [Campanella 2002].

Jedno doniesienie opisuje badanie wpływu kwasu usninowego, podawanego łącznie z siarczanem cynku, u 100 pacjentek, cierpiących na infekcję układu płciowego wirusem brodawczaka HPV, będących po zabiegach chirurgicznych. Pacjentki podzielono na trzy grupy: kontrolną, nie otrzymującą żadnych środków po leczeniu chirurgicznym, grupę otrzymującą dopochwowo kwas usninowy i siarczan cynku przed i po zabiegu chirurgicznym oraz trzecią grupę, otrzymującą te związki tylko po zabiegu. Oceniano stan uszkodzeń wywołanych wirusem po 1, 2, 3 i 6 miesiącach od zabiegu. W obu grupach otrzymujących kwas usninowy i siarczan cynku zaobserwowano lepsze gojenie się nabłonka dróg rodnych w odniesieniu do grupy kontrolnej, zjawisko to było proporcjonalne do upływającego czasu. W grupie drugiej, której podawano oba związki przed i po zabiegu, reepitelizacja była bardziej efektywna i obejmowała krótszy czas w porównaniu do grupy trzeciej [Scirpa 1999].

5.1.8.4. Aktywność przeciwpiętotniakowa

Aktywność przeciwpiętotniakową kwasu usninowego zbadano w warunkach *in vitro* wobec *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* oraz *Leishmania amazonensis*. Wobec ostatniego gatunku aktywność kwasu usninowego zbadano również *in vivo*, na modelu mysim.

W badaniach *in vitro* kwas usninowy wykazał hamującą aktywność na wzrost pierwotniaka *Trypanosoma cruzi*. Badany związek w stężeniach od 5 do 50 µg/ml inkubowano z koloniami pierwotniaka przez 24, 48, 72, 96 i 144 h. Kwas usninowy hamował wzrost *Trypanosoma cruzi* już w najniższym stężeniu, jednak lepsze efekty osiągnięto stosując stężenia od 10 do 50 µg/ml. Badania ultrastrukturalne z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego wskazały na znaczące uszkodzenia mitochondriów w komórkach pierwotniaków. Ponadto, w komórkach makrofagów, zakażonych pierwotniakami i poddanych działaniu kwasu usninowego w stężeniu 40 i 80 µg/ml, zaobserwowano jedynie zmiany w organizacji cytoplazmy (wakuolizacja), pod-

czas gdy pierwotniaki miały uszkodzone mitochondria. Oznacza to, że kwas usninowy, działając na pierwotniaki, nie uszkadzał w istotny sposób komórek gospodarza [De Carvalho 2005]. Zarówno kwas (+)- jak i (-)-usninowy wykazały słabą aktywność hamującą wobec *Plasmodium falciparum*, wartości IC_{50} wynosiły odpowiednio 15.3 i 16.1 μM , podczas gdy substancji referencyjnej (chlorochina) 0.089 μM [Verotta2007]. W badaniu innych autorów kwas usninowy w stężeniu 50 $\mu g/ml$ nie wykazał aktywności przeciwmalarycznej [König 1999]. Kwas (+)-usninowy, izolowany z *Protosnea malacea*, wykazał aktywność wobec *Leishmania amazonensis* w stężeniu 25 $\mu g/ml$ [Fournet 1997].

W badaniach in vivo kwas (+)-usninowy w stężeniu 25 mg/kg masy ciała podawano myszom, zainfekowanym *Leishmania amazonensis*, dwa razy dziennie przez 15 dni (doustnie), raz dziennie przez 15 dni (podskórnie) lub w pięciu zastrzykach z 4 dniowymi przerwami bezpośrednio w zakażone miejsce. Kwas usninowy podawany w zastrzykach bezpośrednio w miejsce zakażenia wykazał znaczący efekt zmniejszający obszar zakażenia o 43.34% oraz ilość pasożytów o 72.28%, w porównaniu do grupy nie otrzymującej żadnego środka. Podawanie badanego związku pozostałymi drogami nie dało efektów [Fournet 1997].

5.1.8.5. Aktywność przeciw owadom i larwom

Nieliczne doniesienia opisują aktywność larwobójczą kwasu usninowego, głównie wobec różnych gatunków komarów, jak również jego wpływ na rozwój różnych postaci owadów. Badany związek wykazywał silną aktywność larwobójczą wobec larw dwóch gatunków komarów [Bomfim 2009, Cetin 2008] jak również wobec owadów będących szkodnikami roślin [Emmerich 1993, Sahib 2008]. Dwa badania porównują aktywność kwasu (+)- i (-)-usninowego, w przypadku wpływu na larwy komara obydwa enancjomery wykazały porównywalną aktywność [Cetin 2008], natomiast wobec larw *Spodoptera littoralis* kwas (-)-usninowy był ponad dziesięciokrotnie bardziej aktywny od kwasu (+)-usninowego [Emmerich 1993].

Bomfim i wsp. badali wpływ kwasu usninowego, izolowanego z *Cladonia stellaris*, na larwy komara *Aedes aegypti*, wywołującego gorączkę denga. Kwas usninowy wykazał aktywność larwobójczą, wartość LC_{50} wynosiła 6.1-7 ppm [Bomfim 2009]. Cetin i wsp. określali aktywność kwasu (+)- i (-)-usninowego wobec larw innego gatunku komara *Culex pipiens*. Obydwa enancjomery wykazały wysoką aktywność larwobójczą, wartości LC_{50} wynosiły odpowiednio 0.9 i 0.8 ppm [Cetin 2008].

W badaniach Emmericha i wsp. kwas (+)- i (-)-usninowy wykazały aktywność wobec larw owada *Spodoptera littoralis*, będącego szkodnikiem roślinnym. Obydwa enancjomery powodowały śmiertelność larw oraz wyraźne opóźnienie ich wzrostu w efekcie działania jako deterenty pokarmowe. Kwas (-)-usninowy był znacznie bardziej aktywny od kwasu (+)-usninowego, wartości LD_{50} wynosiły odpowiednio 8.6 i 90.8 $\mu mol/g$ suchej masy [Emmerich 1993].

Sahib i wsp. określali aktywność kwasu (+)-usninowego wobec *Xyleborus fornicatus*, owadów pasożytujących na krzewach herbaty *Camellia sinensis*. Badany związek, dodany do pożywki w stężeniach 50, 75 i 100 ppm, znacząco hamował wzrost i rozwój różnych stadiów owadów, co może wskazywać na potencjalne zastosowanie kwasu usninowego jako środka ochrony krzewów herbacianych przed tymi owadami [Sahib 2008].

5.1.8.6. Aktywność fitotoksyczna

Wpływ kwasu usninowego na inne rośliny określano zarówno wobec izolowanych komórek roślinnych glonów i roślin wyższych, jak i tkanek roślinnych, badając procesy degradacji barwników oraz poziom wymiany gazowej [König 1999, Cardarelli 1997, Bačkor 2010, Bouaid 1998, Romagni 2000, Latkowska 2006]. Kwas usninowy wykazywał aktywność fitotoksyczną wobec komórek glonów *Scenedesmus* i *Trebouxia* [Bačkor 2010] oraz komórek *Nicotiana* [Cardarelli 1997], natomiast nie był aktywny wobec glonu *Chlorella* [König 1999]. W niektórych badaniach kwas (-)-usninowy był odpowiedzialny za degradację chlorofilu, podczas gdy enancjomer (+) nie wykazywał tej aktywności [Romagni 2000], jednak w innych pracach zaobserwowano taki efekt również dla kwasu (+)-usninowego [Bouaid 1998, Latkowska 2006, Bačkor 2010]. Prawdopodobnie związany z tym zjawiskiem był także efekt ograniczający wymianę gazową w roślinach hodowanych w medium z dodatkiem kwasu usninowego [Latkowska 2006].

Kwas usninowy w stężeniach 1-2.5 µg/ml wykazał słaby wpływ na żywotność protoplastów z komórek liści *Nicotiana tabacum*, aktywność ta zwiększyła się wyraźnie w wyższych dawkach badanego związku, 100-200 µg/ml, który powodował ponad 90% śmiertelność tych komórek. Zbadano również wpływ kwasu usninowego na komórki *Nicotiana tabacum* w warunkach hodowli in vitro. Badany związek hamował wzrost komórek w stężeniach 0.5-1 µg/ml, powodując zupełne zahamowanie wzrostu w stężeniu 5 µg/ml [Cardarelli 1997].

Kwas usninowy w stężeniu 50 µg/ml nie wykazał aktywności fitotoksycznej wobec komórek glonów *Chlorella fusca* [König 1999].

Bačkor i wsp. badali wpływ kwasu (+)-usninowego na komórki glonu *Scenedesmus quadricauda* (żyjącego wolno) oraz *Trebouxia erici* (występującego zwykle jako fotobiont porostowy) w warunkach in vitro. Kwas usninowy, rozpuszczony w acetonie, stosowany był w stężeniach 0.01 i 0.1 mg/ml. Zaobserwowano, że kwas usninowy znacząco hamował wzrost komórek *Scenedesmus*, powodując dodatkowo zwiększenie rozmiarów komórek i degradację chlorofilu a oraz wzrost aktywności reaktywnych form tlenu w komórkach glonu. W przypadku komórek *Trebouxia* efekt fitotoksyczny kwasu usninowego był znacznie mniejszy, co według autorów może wskazywać na adaptację tego gatunku do obecności kwasu usninowego, nabytą w procesie ewolucji [Bačkor 2010].

Bouaid i Vincente określali wpływ kwasu usninowego na degradację chlorofilu in vitro w liściach *Quercus rotundifolia*. Zaobserwowano że kwas usninowy dużo łatwiej przenika przez błony chloroplastów, powodując degradację zarówno chlorofilu a, jak i b, niż badana również w tym eksperymencie atranoryna. Zjawisko to może mieć znaczenie w przypadku porostów epifitycznych, występujących na korze drzew i mogących w ten sposób wpływać niekorzystnie na liście [Bouaid 1998].

Eksperyment przeprowadzony przez Romagni i wsp. wskazał na różnicę w aktywności fitotoksycznej pomiędzy enancjomerami kwasu usninowego. Kwas (-)-usninowy powodował, w sposób zależny od dawki (0.03-100 µM), blaknięcie tkanek roślin z rodzaju *Lactuca*, *Allium* i *Cucumis*, hodowanych in vitro, co było związane z obniżeniem ilości chlorofilu i karotenoidów w badanych tkankach, podczas gdy kwas (+)-usninowy nie wywoływał takiego efektu. Ponadto stwierdzono zahamowanie aktywności oksydazy porfirynogenowej w obecności kwasu (-)-usninowego. Blaknięcie tkanek pod wpływem kwasu (-)-usninowego wynikało również

z nieodwracalnego hamowania dioksygenazy 4-hydroksyfenylopirogrońianowej, co może mieć w przyszłości znaczenie przy zastosowaniu kwasu (-)-usninowego jako herbicydu [Romagni 2000].

Latkowska i wsp. określali wpływ kwasu (+)-usninowego na poziom wymiany gazowej (fotosynteza, transpiracja, respiracja) w hydroponicznych uprawach szklarniowych pomidora (*Lycopersicon esculentum*). Kwas usninowy dodawany był do medium hodowlanego, końcowe stężenie wynosiło od 0 do 30 μM . U roślin hodowanych pod wpływem największej dawki kwasu usninowego stwierdzono zahamowanie procesu fotosyntezy i respiracji odpowiednio na poziomie 41 i 80%. Ponadto zaobserwowano zmniejszenie ilości chlorofilu i karotenoidów w badanych roślinach odpowiednio o 30 i 35% pod wpływem najwyższej dawki badanego związku. Transpiracja w roślinach hodowanych w ciemności i w świetle również była zahamowana w sposób zależny od dawki kwasu usninowego [Latkowska 2006].

5.1.8.7. Działanie jako deterent pokarmowy

Pojedyncze doniesienie opisuje potencjalną rolę kwasu usninowego jako deterentu pokarmowego wobec gryzoni. Nybakken i wsp. podawali plechy *Cladonia arbuscula*, *C. stellaris* i *Evernia prunastri* nornicom jako paszę. Plechy porostów, poddane lub nie poddane wcześniejszej maceracji w acetonie w celu wymycia części substancji porostowych, podawano zwierzętom w formie nierozdrobnionej lub zmielonej. Uzyskane wyciągi acetonowe analizowano jakościowo i ilościowo. Zaobserwowano, że nornice znacznie chętniej wybierały pokarm o zmniejszonej zawartości związków porostowych, zwłaszcza w przypadku gatunków o dużej zawartości wyjściowej kwasu usninowego (*C. stellaris*), co może wskazywać na jego rolę jako środka zniechęcającego [Nybakken 2010].

5.1.8.8. Aktywność antyoksydacyjna

Własności antyoksydacyjne kwasu usninowego badano w kilku zaledwie pracach, za pomocą testu DPPH [Kumar 1999], pomiaru wpływu na peroksydację lipidów [Toledo Marante 2003] oraz wpływu na przeżywalność komórek poddanych stresowi oksydacyjnemu w obecności kwasu usninowego [Amo de Paz 2010]. Ponadto, określono również aktywność prooksydacyjną badanego związku. Kwas usninowy nie wykazywał aktywności antyoksydacyjnej ani prooksydacyjnej [Toledo Marante 2003, Kumar 1999], jednak miał ochronny wpływ na komórki poddane w jego obecności stresowi oksydacyjnemu [Amo de Paz 2010]. Wpływ taki jednak niekoniecznie musi wynikać z własności antyoksydacyjnych badanego związku.

W badaniu przeprowadzonym przez Kumara i Müllera określano aktywność prooksydacyjną oraz antyoksydacyjną kwasu usninowego. Badany związek nie wykazywał własności prooksydacyjnych w badaniach na modelowych błonach fosfolipidowych w stężeniach do 200 μM , jak również nie posiadał aktywności wymiatającej wolne rodniki ani aktywności antyoksydacyjnej w teście DPPH [Kumar 1999].

W badaniu przeprowadzonym przez Toledo-Marante i wsp. kwas usninowy nie wykazał aktywności antyoksydacyjnej w stężeniu 100 i 250 μM , w teście polegającym na zahamowaniu peroksydacji lipidów w homogenacie mózgu szczura [Toledo Marante 2003].

Kwas usninowy był dodawany w stężeniach 5, 10, 25 i 50 $\mu\text{g/ml}$ do hodowli ludzkich komórek glejaka U373 MG i inkubowany przez 24 h. Po tym czasie komórki poddawano działaniu 1 mM H_2O_2 przez 30 minut, w celu wywołania stresu oksydacyjnego. Jako kontrolę stosowano komórki bez wcześniejszej inkubacji z kwasem usninowym, poddane stresowi oksydacyjnemu. Żywotność komórek określano następnie metodą MTT. Badany związek we wszystkich stosowanych stężeniach wykazał aktywność protekcyjną wobec komórek poddanych stresowi oksydacyjnemu, zaobserwowano istotny wzrost przeżywalności komórek w odniesieniu do komórek nie poddanych preinkubacji z kwasem usninowym. Autorzy sugerują że zjawisko to może mieć potencjalne znaczenie w schorzeniach neurodegeneracyjnych [Amo de Paz 2010].

5.1.8.9. Działanie fotoprotekcyjne

Kwas usninowy został również zbadany pod kątem potencjalnych własności fotoprotekcyjnych, zarówno w warunkach *in vitro* na modelach komórkowych poddawanych naświetlaniu promieniowaniem UV-B [Kohlhardt-Floehr 2010, Rancan 2002], na modelach zwierzęcych [Fernandez 1996], jak i na zdrowych ochotnikach, u których porównywano aktywność kwasu usninowego chroniącą przed wpływem promieniowania UV z działaniem kosmetyku stosowanego jako filtr przeciwsłoneczny [Rancan 2002].

Kohlhardt-Floehr i wsp. badali wpływ kwasu usninowego, izolowanego z *Xanthoparmelia farinosa*, na ludzkie limfocyty linii Jurkat, poddane działaniu promieniowania UV-B. Komórki były inkubowane przez 48 h z kwasem usninowym w stężeniu 1×10^{-8} , 1×10^{-6} i 1×10^{-4} M, a następnie poddawane naświetlaniu promieniowaniem UV-B w dawce 0.02, 0.1 i 1 J/cm^2 . Jako kontrolę stosowano komórki naświetlane, lecz nie inkubowane wcześniej z badanym związkiem. Przeżywalność komórek określano testem z eozyną oraz testem XTT. Zaobserwowano, że komórki poddane preinkubacji z kwasem usninowym w dawkach 1×10^{-8} i 1×10^{-6} wykazywały zwiększoną przeżywalność pod wpływem niższych dawek UV-B (0.02 i 0.1 J/cm^2) w odniesieniu do komórek nie poddanych preinkubacji. Natomiast przy większych dawkach naświetlania i wyższych stężeniach kwasu usninowego, przeżywalność komórek malała w stosunku do kontroli. Autorzy sugerują, że świadczy to o podwójnej roli kwasu usninowego, która ujawnia się w zależności od panujących warunków, i może również świadczyć o jego funkcji jako antyoksydanta i prooksydanta [Kohlhardt-Floehr 2010].

W badaniach przeprowadzonych na świnkach morskich, którym fragment ogolonej skóry poddawano działaniu promieniowania UV B, wykazano wysoką aktywność fotoprotekcyjną kwasu usninowego podawanego w ilości 2 mg/cm^2 skóry – wyliczona wartość czynnika SPF wynosiła 8.0 ± 0.15 , podczas gdy standardowy związek wykazał $\text{SPF} = 4.3 \pm 0.20$. Ponadto zaobserwowano słabą aktywność kwasu usninowego zapobiegającą przegrzaniu się naświetlanego fragmentu skóry – różnice pomiędzy temperaturą skóry w grupie zwierząt poddanej traktowaniu kwasem usninowym i grupie kontrolnej mieściły się w granicach $0.81 - 1.3^\circ\text{C}$ dla czasu naświetlania 20-50 minut [Fernandez 1996].

Badania *in vivo* aktywności fotoprotekcyjnej kwasu usninowego przeprowadzono na 5 zdrowych ochotnikach. Kwas usninowy w stężeniu 2.5×10^{-2} M rozpuszczono w mieszaninie glikolu propylenowego i chloroformu (1:1), a następnie наносono na niewielki (12 cm^2) fragment skóry pleców ochotników. Po odparowaniu chloroformu naniesiony roztwór tworzył

cienką warstwę na skórze, którą naświetlano promieniami UV 295-340 nm. Kwas usninowy wykazał aktywność porównywalną z działaniem Nivea Sun Spray LSF 5, wyliczone średnie wartości czynnika UVP (ochrona przed promieniowaniem UV) wynosiły odpowiednio 4.1 i 4.2 [Rancan 2002].

5.1.8.10. Aktywność immunomodulująca

Potencjalne zdolności kwasu usninowego pod kątem wpływu na komórki układu odpornościowego zostały zbadane w eksperymencie *in vitro*. W badaniach na makrofagach izolowanych z myszy zaobserwowano umiarkowaną aktywność kwasu usninowego, w stężeniu 100 µg/ml, stymulującą uwalnianie nadtlenu wodoru i tlenu azotu przez te komórki. Badany związek stymulował uwalnianie tlenu azotu w ilości 83 µmol, podczas gdy substancja referencyjna (lipopolisacharyd z *Escherichia coli*) w ilości 65 µmol. W przypadku stymulowania produkcji nadtlenu wodoru, kwas usninowy uwalniał 65.68 nmol, podczas gdy substancja referencyjna (zymosan) 275.41 nmol [Santos 2004].

5.1.8.11. Aktywność przeciwzapalna i przeciwbólowa

Aktywność przeciwzapalna kwasu usninowego została przebadana zarówno w warunkach *in vitro* [Jin 2008, Bucar 2004, Kumar 1999], jak i w modelu zwierzęcym [Vijayakumar 2000]. Prace o podobnym charakterze opisują wpływ przeciwbólowy i przeciwgorączkowy [Okuyama 1995] oraz gastroprotektoryjny [Odabasoglu 2006] kwasu usninowego w badaniach na zwierzętach. Kwas usninowy wykazywał aktywność porównywalną ze stosowanymi w eksperymentach substancjami referencyjnymi.

Bucar i wsp. badali wpływ kwasu usninowego na aktywność 12(S)-lipooksygenazy typu płytkowego *in vitro*. W zakresie stężeń od 0-100 µg/ml kwas usninowy nie hamował aktywności badanego enzymu [Bucar 2004]. Kumar i Müller badali wpływ kwasu usninowego na biosyntezę leukotrienu B₄ (LTB₄) z wielojądrowych leukocytów *in vitro*. Związek ten wykazał słaby wpływ hamujący na biosyntezę LTB₄, wartość IC₅₀ wynosiła 42±2.2 µM, podczas gdy wartość ta dla substancji referencyjnych wynosiła 0.4±0.21 µM (kwas nordihydrogwaretynowy) oraz 37±4.6 µM (antralina) [Kumar 1999].

W badaniach nad aktywnością przeciwzapalną kwasu usninowego *in vitro* makrofagi RAW264.7, stymulowane lipopolisacharydem (LPS) w celu produkcji czynnika martwicy nowotworów (TNF-α) oraz tlenu azotu (NO), inkubowano z badanym związkiem o stężeniu 1, 3, 5, 10 i 20 µM przez 24 h. Kwas usninowy obniżał poziom TNF-α w sposób zależny od dawki, wartość IC₅₀ wynosiła 12.8 µM. Dodatkowo przeprowadzona analiza RNA wykazała, że kwas usninowy hamował transkrypcję TNF-α z matrycowego RNA (mRNA). Badany związek hamował także produkcję tlenu azotu, wartość IC₅₀ wynosiła 4.7 µM. Ponadto kwas usninowy hamował wyraźnie syntezę enzymu odpowiedzialnego za produkcję tlenu azotu (iNOS) oraz obniżał poziom czynnika transkrypcji NF-κB [Jin 2008].

W badaniach *in vivo* kwas usninowy podawano szczurom w dawkach 25, 50 i 100 mg/kg masy ciała, z wcześniej wywołanym ostrym (obrzęk łapy wywołany karageniną) i przewlekłym (test zwitka waty) stanem zapalnym. Badany związek wywoływał zmniejszenie obrzęku łapy we wszystkich dawkach, jednak w najwyższej podanej dawce efekt był porów-

nywalny z substancją referencyjną (ibuprofen, 100 mg/kg masy ciała). W przypadku stanu chronicznego, kwas usninowy zmniejszał masę powstającej ziarniny w sposób zależny od dawki. Aktywność ta w najwyższej podanej dawce była również porównywalna z substancją referencyjną [Vijayakumar 2000].

Okuyama i wsp. badali aktywność przeciwbólową i przeciwgorączkową kwasu usninowego u myszy. Aktywność przeciwbólową badano za pomocą testu przeciągania pod wpływem kwasu octowego oraz testu ściskania ogona. Kwas usninowy podawano doustnie w dawkach 30 i 100 mg/kg masy ciała (aktywność przeciwbólowa) oraz 100 i 300 mg/kg masy ciała (aktywność przeciwgorączkowa). Badany związek wykazał aktywność przeciwbólową w obu podanych dawkach, powodując zmniejszenie przeciągania się zwierząt odpowiednio o 50 i 40%, a także długotrwały efekt przeciwbólowy w teście ściskania ogona. Kwas usninowy w obydwu badanych dawkach miał także efekt przeciwgorączkowy, powodując spadek temperatury odpowiednio o 1 i 2.5°C w przeciągu 4 godzin od podania [Okuyama 1995].

Odabasoglu i wsp. badali działanie kwasu usninowego w wywołanym indometacyną modelu wrzodów żołądka u szczurów. Kwas usninowy był podawany doustnie w dawkach 25, 50, 100 i 200 mg/kg masy ciała, substancję referencyjną stanowiła ranitydyna w dawce 50 mg/kg masy ciała. Po 6 godzinach trwania eksperymentu, zwierzęta były uśmiercane i mierzone wielkość obszarów wrzodowych w ich żołądkach. Kwas usninowy wywoływał silny efekt gastroprotekcyjny, większy od substancji referencyjnej, powodując zahamowanie powstawania wrzodów od 80.2 do 96.4 % w odniesieniu do kontroli (grupa z indometacyną), podczas gdy ranitydyna hamowała ten proces w 72.7%. Ponadto określano aktywność katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej, reduktazy glutationowej, mieloperoksydazy, peroksydazy glutationowej i syntazy tlenu azotu oraz poziom glutationu i stopień peroksydacji lipidów w tkankach żołądka zwierząt. Wszystkie dawki kwasu usninowego powodowały zwiększanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy glutationowej, oraz podnosiły poziom glutationu w badanych tkankach, podczas gdy aktywność katalazy i reduktazy glutationowej zmniejszała się pod wpływem badanego związku. Kwas usninowy powodował również istotne zmniejszenie peroksydacji lipidów oraz obniżenie aktywności mieloperoksydazy i syntazy tlenu azotu w badanych tkankach. Autorzy sugerują, że znaczący efekt gastroprotekcyjny kwasu usninowego wynika z jego zdolności do zmniejszania uszkodzeń oksydacyjnych i infiltracji neutrofili w badanych tkankach żołądka [Odabasoglu 2006].

5.1.8.12. Wpływ na mięśnie gładkie

Badania nad wpływem kwasu usninowego na mięśnie gładkie przeprowadzone zostały w warunkach *in vitro*, na izolowanych mięśniach aorty szczura oraz wzdłużnych mięśniach jelita krętego świnki morskiej. Kwas usninowy znacząco zmniejszał skurcze mięśni aorty wywołane chlorkiem potasu i fenylefryną, natomiast miał słaby wpływ hamujący na skurcze mięśni jelita krętego wywołane tymi substancjami, jak również acetylocholiną. Sugeruje to, że aktywność relaksująca kwasu usninowego jest związana z hamowaniem napływu jonów wapnia przez kanały wapniowe zlokalizowane w błonach komórkowych mięśni gładkich [Mustafa 1995].

5.1.9. Aktywność cytotoksyczna i przeciwnowotworowa

5.1.9.1. Aktywność cytotoksyczna

Kwas usninowy jest intensywnie badany także pod kątem aktywności cytotoksycznej. Pierwsze doniesienia o jego wpływie na komórki nowotworowe pochodzą z końca lat 70 XX wieku, kiedy to Kupchan i Kopperman, a następnie Takai badali jego aktywność *in vivo* w doświadczalnie wywołanym nowotworze płuc [Kupchan 1975, Takai 1979] oraz białaczkę [Takai 1979] u myszy. Co ciekawe, badanym związkiem był w obydwu przypadkach kwas (-)-usninowy. Późniejsze badania, przede wszystkim *in vitro*, dotyczyły w większości przypadków kwasu (+)-usninowego, jedynie kilka prac opisywało aktywność cytotoksyczną kwasu (-)-usninowego [Bezivin 2004, Koparal 2006, Bazin 2008, Einarsdottir 2010], z czego trzy ostatnie porównywały aktywność obu enancjomerów. Aktywność ta, przebadana wobec szeregu nowotworowych linii zwierzęcych i ludzkich, a także kilku linii prawidłowych, była w większości przypadków umiarkowana, jednak w niektórych badaniach aktywność ta może być określona jako wysoka ($EC_{50} \leq 5 \mu\text{g/ml}$) [Einarsdottir 2010, Kumar 1999 b, Kristmundsdottir 2005]. Zestawienie aktywności cytotoksycznej kwasu usninowego przedstawione jest w Tabeli 11.

Porównując działanie obu enancjomerów można zauważyć wyższą aktywność kwasu (-)-usninowego, zwłaszcza wobec linii białaczkowych zwierzęcych i ludzkich, a także ludzkiej linii nowotworu prostaty [Bezivin 2004, Bazin 2008]. W przypadku linii nowotworów piersi T-47D i MCF7 wyniki nie są jednoznaczne i wskazują na porównywalną aktywność obu enancjomerów [Mayer 2005, Bezivin 2004, Einarsdottir 2010], przewagę kwasu (+)-usninowego [Mayer 2005, Kristmundsdottir 2010] lub (-)-usninowego [Bazin 2008, Bezivin 2004]. Aktywność cytotoksyczna obu enancjomerów była porównywalna również wobec komórek glejaka i nowotworu trzustki [Bazin 2008, Bezivin 2004].

Kwas usninowy był aktywny również wobec komórek prawidłowych, jednak w większości przypadków była to aktywność bardzo niska lub umiarkowana [Koparal 2006, Correche 2004]. Jednak w badaniu Kumara i Müllera zaobserwowano wysoką aktywność antyproliferacyjną kwasu usninowego wobec prawidłowych keratynocytów linii HaCaT ($IC_{50} 2.1 \pm 0.7 \mu\text{M}$), połączone z brakiem wpływu na integralność ich błon komórkowych. Wynik ten może mieć jednak znaczenie w kontekście schorzeń przebiegających z nadmierny podziałem komórek naskórka, np. łuszczyca, stąd hamujący wpływ kwasu usninowego na proliferację komórek prawidłowych w tym przypadku można uznać za korzystny [Kumar 1999 a]. W innych badaniach nad keratynocytami, kwas usninowy wykazał wysoką aktywność stymulującą gojenie się rany, powstałej poprzez mechaniczne zadrapanie warstwy keratynocytów, rosnących w hodowli konfluentnej. Badany związek w stężeniu $2 \mu\text{M}$ powodował ponad 300% zamykanie się powstałej rany podczas gdy substancja kontrolna (lizat płytkowy) powodowała 400% efekt. Ponadto, kwas usninowy w stężeniu $2 \mu\text{M}$ silnie (200%) stymulował migrację keratynocytów [Burlando 2009].

W kilku przypadkach badano również aktywność pochodnych kwasu usninowego. Pochodne acylohydrazone, połączone w kompleksy z palladem i miedzią, wykazały aktywność antyproliferacyjną wobec komórek nowotworu macicy HeLa. Związki te wykazały zróżnicowaną aktywność, wartości IC_{50} wynosiły od $1.8\text{--}86 \mu\text{M}$ (IC_{50} kwasu usninowego $14.9 \mu\text{M}$),

przy czym związki kompleksowe charakteryzowały się wyższą aktywnością niż odpowiadające im ligandy, a kompleksy z miedzią były bardziej aktywne niż kompleksy z palladem [Natić 2004]. Correche i wsp. określali wpływ kwasu dihydrousninowego oraz dioctanu kwasu usninowego na limfocyty. Pochodne kwasu usninowego wykazywały silniejszy od macierzystego związku wpływ hamujący wzrost limfocytów. Aktywność wszystkich trzech związków przewyższała aktywność kolchicyny, stosowanej jako kontrola. W kolejnym etapie eksperymentu określono wpływ badanych związków na kompleksy DNA z zielenią metylenową. Kwas usninowy nie wykazał wpływu na te kompleksy, co oznacza brak jego interakcji z DNA w trakcie procesu cytotoksycznego. Natomiast pochodne badanego związku powodowały uwolnienie zieleni metylenowej z kompleksu z DNA, co sugeruje, że nieznaczne modyfikacje strukturalne w obrębie cząsteczki kwasu usninowego znacznie zmieniają jego aktywność cytotoksyczną [Correche 1998]. Bazin i wsp. określali wpływ 9 aminowych pochodnych kwasu usninowego na nowotworowe linie zwierzęce (białaczka L1210, nowotwór płuc Lewisa 3LL) i ludzkie (chroniczna białaczka K-562, nowotwór prostaty Du145, nowotwór piersi MCF7, glejak U251). Najwyższą aktywnością, przewyższającą znacznie związek wyjściowy, wykazał się 1,8-diaminooctan kwasu usninowego, wartości IC_{50} wynosiły od 2.7 ± 0.8 do 14.1 ± 2.1 μM i były zbliżone do substancji referencyjnej (etopozyd): 0.5 ± 0.1 – 12.2 ± 0.5 μM , podczas gdy dla substancji macierzystej IC_{50} wynosiło 19.5 ± 1.6 – 105.4 ± 16 μM [Bazin 2008]. We wspomnianych już pionierskich badaniach Takai i wsp. porównywali aktywność kwasu (-)-usninowego i jego kilkunastu pochodnych (hydrazonowe, octanowe, glukozydowe) wobec linii białaczki L1210. Kwas usninowy okazał się najbardziej aktywnym związkiem, żadna z jego pochodnych nie wykazała wyższej aktywności cytotoksycznej [Takai 1979].

Tabela 11. Aktywność cytotoksyczna kwasu usninowego

LINIA	METODA	AKTYWNOŚĆ (+)-USNINOWY	AKTYWNOŚĆ (-)-USNINOWY	CYTOWANIE
3LL	MTT	IC ₅₀ 23±6.6 µM	IC ₅₀ 35.1±10.7µM IC ₅₀ 12.1µg/ml	Bazin 2008 Bezivin 2004
A2780	MTT	IC ₅₀ 75.9±2.0 µM	-	Bačkorova 2010
A431	CV, NRU	EC ₅₀ 39µM, 72 µM	-	Burlando 2009
A549	MTT	żywołność 85 % w stężeniu 25 µg/mL (24h)	żywołność 100% w stężeniu 25 µg/mL (24h)	Koparal 2006
Capan-2	test ze znakowaną tymidyną	IC ₅₀ 5.3 µg/mL	IC ₅₀ 5.0 µg/mL	Einarsdottir 2010
Du145	MTT	IC ₅₀ 57.4±2.1 µM	IC ₅₀ 45.9±7.0 µM IC ₅₀ 15.8 µg/ml	Bazin 2008 Bezivin 2004
H1299	MTT	IC ₅₀ 22.3 µM	-	Mayer 2005
HaCaT	liczenie pod mikroskopem kontrastowo- fazowym CV, NRU	IC ₅₀ 2.1±0.7 µM EC ₅₀ 35µM, 76 µM	- -	Kumar 1999 a Burlando 2009
HCT-116 p53 ^{-/-}	MTT	IC ₅₀ 143.1±11.3µM	-	Bačkorova 2010
HCT-116 p53 ^{+/+}	MTT	IC ₅₀ 157.2±4.0 µM	-	Bačkorova 2010
HEC-50	?	70% zahamowania w stężeniu 50 µg/ml (46h)	-	Cardarelli 1997
HeLa	MTT	IC ₅₀ 14.9 µM IC ₅₀ 178.3±9.7 µM	- -	Natić 2004 Bačkorova 2010
HEp-2	MTT	IC ₅₀ 12.6 µg/ml	-	Ribeiro- Costa2004
hepatocyty szczurze	LDH	IC ₅₀ 25 µg/ml (8h), 21 µg/ml (24h)	-	Correche 2004
HL-60	MTT	IC ₅₀ 14.3±0.1 µM IC ₅₀ 48.5±9.1 µM	- -	Toledo Marante 2003 Bačkorova 2010
HT-29	MTT	IC ₅₀ 99.7±8.4 µM	-	Bačkorova 2010
Ishikawa	?	90% zahamowania w stężeniu 5 µg/ml (46h)	-	Cardarelli 1997
Jurkat	MTT	IC ₅₀ 76.3±8.2 µM	-	Bačkorova 2010
K-562	?	90% zahamowania w stężeniu 50 µg/ml (46h)	-	Cardarelli 1997
K-562	MTT	IC ₅₀ 52.8±8.7 µM	IC ₅₀ 21.8±3.8 µM IC ₅₀ 8.2 µg/ml	Bazin 2008 Bezivin 2004
KB	?	ED ₅₀ 13 µg/ml	-	König 1999
L1210	MTT Coulter Coun- ter	IC ₅₀ 26.4±8.5 µM	IC ₅₀ 17.4±1.4 µM IC ₅₀ 6 µg/ml 95% zahamowania w stężeniu 1.4x10 ⁻⁷ mol/mL (23h)	Bazin 2008 Bezivin 2004 Takai 1979
limfocyty	test ze znako-	wysoka aktywność	-	Correche 1998

	wana tymidy- ną			
MCF7	MTT	IC ₅₀ 18.9 μM IC ₅₀ 105.4±16μM IC ₅₀ 94.6±7.9 μM	- IC ₅₀ 51.7±7.3 μM IC ₅₀ 17.8 μg/ml -	Mayer 2005 Bazin 2008 Bezivin 2004 Bačkorova 2010
MDA- MB-231	MTT	IC ₅₀ 22.3 μM	-	Mayer 2005
MM98	CV, NRU	EC ₅₀ 23μM, 64 μM	-	Burlando 2009
P388	MTT	IC ₅₀ 16 μg/ml	-	Perry 1999
Panc-1	test ze znako- waną tymidy- ną	EC ₅₀ 4.3μg/ml	-	Kristmundsdottir 2005
PC-3	test ze znako- waną tymidy- ną	EC ₅₀ 8.2μg/ml	-	Kristmundsdottir 2005
SK-BR-3	MTT	IC ₅₀ 199.2±18.8μM	-	Bačkorova 2010
T-47D	test ze znakowaną tymidyną	EC ₅₀ 2.9μg/ml IC ₅₀ 4.2 μg/mL	- IC ₅₀ 4.0 μg/mL	Kristmundsdottir 2005 Einarsdottir 2010
U251	MTT	IC ₅₀ 19.5±1.6 μM -	IC ₅₀ 19.7±4.6 μM IC ₅₀ 6.8 μg/ml	Bazin 2008 Bezivin 2004
U373 MG	MTT	żywołność 82.8±0.5% w stęże- niu 25 μg/mL	-	Amo de Paz 2010
U937	MTT	IC ₅₀ 14.3±0.1 μM	-	Toledo Marante 2003
V79	MTT	żywołność 60 % w stężeniu 25 μg/mL (24h)	żywołność 90% w stężeniu 25 μg/mL (24h)	Koparal 2006

linie zwierzęce: białaczka (L1210, P388); nowotwór płuc Lewisa 3LL; komórki nabłonkowe płuc V79
linie ludzkie: nowotwór piersi (T-47D, MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3); nowotwór jajnika A2780; nowo-
twór trzustki (Panc-1, Capan-2); nowotwór jelita grubego (HT-29, HCT-116 p53^{+/+} i ^{-/-}); nowotwór prostaty
(PC-3, Du145); białaczka (U937, HL-60, K-562, Jurkat); nowotwór nosogardzieli KB; nowotwór krtani HEp-
2; nowotwór płuc (A549, H1299); nowotwór macicy (HeLa, Ishikawa, HEC-50); glejak U251; gwiazdziak
U373 MG; międzybłoniak MM98; nowotwór sromu A431; keratynocyty HaCaT
metody: CV – test krystalicznego fioletu; NRU – test pobierania czerwieni obojętnej; MTT – test redukcji soli
tetrazoliowych

5.1.9.2. Określenie mechanizmu działania cytotoksycznego

Nieliczne prace podejmują próbę opisanie mechanizmu działania cytotoksycznego kwasu usninowego, w większości dotyczą one enancjomeru (+) [Correche 2004, Einarsdottir 2010, Koparal 2006, Bezivin 2004, Bazin 2008, Mayer 2005, O'Neill 2009, Bačkorova 2010], jedno doniesienie porównuje działanie obydwu enancjomerów [Koparal 2006]. Prace te skupiają się przede wszystkim na określeniu wpływu kwasu usninowego na stymulację procesu apoptozy [Correche 2004, Einarsdottir 2010, Koparal 2006, Bezivin 2004, Bazin 2008, Mayer 2005, Bačkorova 2010], rzadziej nekrozy [Einarsdottir 2010], pojedyncze doniesienia mówią o wywoływaniu zmian w mikrotubulach [O'Neill 2009].

Doniesienia na temat stymulacji procesu apoptozy przez kwas usninowy są sprzeczne, dwie spośród cytowanych prac wykazują brak tego wpływu [Correche 2004, Einarsdottir 2010], natomiast pozostałe cztery stwierdzają wyraźne znamiona zmian apoptotycznych w

badanych liniach komórkowych [Koparal 2006, Bezivin 2004, Bazin 2008, Bačkorova 2010]. Prace nie wskazujące na proapoptotyczną aktywność kwasu usninowego dotyczą badań zarówno na komórkach prawidłowych (szczurze hepatocyty), jak i nowotworowych (ludzkie nowotwory piersi i trzustki). Co ciekawe, w pracach wykluczających i wskazujących na proces apoptozy pod wpływem badanego związku zastosowano podobną metodykę (cytometr przepływowy, aktywność kaspazy3, fragmentacja jąder komórkowych). Wskazywać to może na selektywne działanie kwasu usninowego jako stymulatora procesu apoptozy, w zależności od rodzaju użytych komórek i innych czynników. Pojawianie się fragmentacji jąder komórkowych, wzrost aktywności kaspazy-3 czy spadek potencjału błon mitochondrialnych pod wpływem badanego związku mogą wskazywać na ścieżkę wewnętrzną procesu apoptozy, czego jednak nie potwierdzają badania Mayera i wsp., nie wykazujące wpływu kwasu usninowego na wzrost poziomu białek p53 [Mayer 2005].

Correche i wsp. określali wpływ kwasu usninowego na stymulację aktywności kaspazy 3, enzymu pojawiającego się we wczesnych stadiach apoptozy, w szczurzych hepatocytach, metodą DTT. Badano także potencjalną fragmentację DNA w badanych komórkach pod wpływem kwasu usninowego z wykorzystaniem cytometru przepływowego. Badany związek nie wpływał na aktywność kaspazy 3, nie wywoływał również fragmentacji DNA, co wskazuje na brak efektu apoptotycznego [Correche 2004].

Einarsdottir i wsp. wykazali aktywność antyproliferacyjną kwasu (+)-usninowego wobec komórek nowotworu piersi T-47D oraz nowotworu trzustki Capan2 w badaniu na cytometrze przepływowym. Komórki poddane wpływowi kwasu usninowego w mniejszym stopniu wchodziły w fazę S cyklu komórkowego, a w jeszcze mniejszym stopniu w fazę G2/M. Po 24 h inkubacji komórek z 20 $\mu\text{g/mL}$ kwasu usninowego nie wykazano procesu apoptozy, z wykorzystaniem metody TUNEL. W kolejnym etapie doświadczeń zbadano wpływ kwasu usninowego w stężeniach 5 i 10 $\mu\text{g/mL}$ na wywoływanie nekrozy w badanych komórkach metodą LDH, po inkubacji przez 24 i 48 h. Nekroza została zaobserwowana jedynie w komórkach Capan-2, w sposób zależny od dawki i czasu inkubacji. W ostatnim etapie określono wpływ badanego związku w stężeniach 5 i 10 $\mu\text{g/mL}$ na potencjał błonowy mitochondriów obu linii komórkowych. Zaobserwowano wyraźny spadek potencjału błonowego pod wpływem kwasu usninowego, zwłaszcza w stężeniu 10 $\mu\text{g/mL}$, a efekt był porównywalny z substancją referencyjną CCCP [Einarsdottir 2010].

Bačkorova i wsp. opisali zróżnicowaną odpowiedź ludzkich komórek nowotworowych na działanie kwasu usninowego. Badania przeprowadzono na 4 liniach nowotworowych: jajnika (A2780), jelita grubego (HCT-116 p53^{+/+} i ^{-/-}), oraz białaczce (HL-60), określając wpływ kwasu usninowego na stymulację procesu apoptozy z wykorzystaniem cytometru przepływowego. Kwas usninowy w dawce 50 i 100 μM powodował zatrzymanie komórek w fazie S, w sposób zależny od czasu inkubacji (48, 72 h), przy czym wyraźniejszą odpowiedź zaobserwowano w przypadku komórek nowotworu jajnika oraz białaczki. Linia komórek nowotworu jajnika była najbardziej podatna na proapoptotyczne działanie kwasu usninowego. Efekt ten został potwierdzony ponadto w analizie morfologii jąder komórkowych, barwionych metodą DAPI [Bačkorova 2010].

W badaniach Koparala i wsp. obydwa enancjomery powodowały stymulację procesu apoptozy w limfocytach, zwierzęcych komórkach nabłonkowych płuc oraz ludzkich komór-

kach nowotworu płuc. Kwas (-)-usninowy był bardziej aktywny (zakres stężeń 25-30 $\mu\text{g/ml}$) niż (+)-usninowy (zakres stężeń $>50 \mu\text{g/ml}$) [Koparal 2007].

Wpływ kwasu usninowego na stymulację procesu apoptozy w komórkach zwierzęcych białaczki L1210, określano wstępnie barwiąc jądra komórkowe barwnikiem Hoechst, a następnie określając fazy cyklu komórkowego za pomocą cytometru przepływowego. Komórki inkubowane przez 24 i 48 h z badanym związkiem o stężeniu 6, 9 i 12 $\mu\text{g/ml}$, obserwowane pod mikroskopem fluorescencyjnym wykazywały zmiany morfologii, typowe dla procesu apoptozy: kondensację chromatyny jądrowej, fragmentację jąder komórkowych i tworzenie ciałek apoptotycznych. Ilość komórek apoptotycznych w różnych stężeniach kwasu usninowego wynosiła odpowiednio 9.6, 14.1 i 44.4% po 24 h i 11.9, 29.1 i 63.2% po 48 h inkubacji, podczas gdy etopozyd w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ powodował pojawienie się odpowiednio 47.4 i 52.7% komórek apoptotycznych. Efekt ten został potwierdzony w badaniu na cytometrze przepływowym: zaobserwowano dodatkowy pik sub-G1, przed pikiem G0-G1 [Bezivin 2004].

Kwas (+)-usninowy i jego pochodna dioctanowa zostały przebadane pod kątem wywoływania procesu apoptozy w komórkach linii L1210. Zdolność ta była mierzona poprzez barwienie jąder komórkowych barwnikiem Hoechst i obserwacje mikroskopowe wybarwionych komórek, jak również poprzez pomiar aktywności kaspazy-3 w badanych komórkach. Obydwa badane związki wykazały zdolność do indukowania apoptozy, w sposób zależny od dawki (kwas usninowy: 17, 26, 35 μM , pochodna: 3, 4.5, 6 μM , etopozyd 1.7 μM) i czasu inkubacji (24, 48 h), powodując pojawienie się 30 ± 9 - 35 ± 9 % (kwas usninowy) i 35 ± 6 - 38 ± 10 % (pochodna) komórek apoptotycznych, podczas gdy etopozyd powodował $47\pm 7\%$ komórek apoptotycznych. Po 48 h zmierzono także aktywność kaspazy-3, markera apoptozy, i zaobserwowano wzrost aktywności pod wpływem obydwu badanych związków [Bazin 2008].

W komórkach nowotworowej linii MCF7 określano poziom białek p53 i p21 po 24 h inkubacji z 29 μM stężeniem kwasu usninowego. Nie zaobserwowano wzrostu poziomu badanych białek pod wpływem kwasu usninowego, poziom ich był porównywalny do warunków kontrolnych. Co więcej, nie zaobserwowano również fosforylacji białka p53 na fragmencie Ser15, co świadczy o braku uszkodzenia DNA w komórkach poddanych działaniu kwasu usninowego. Dodatkowo autorzy zbadali wpływ kwasu usninowego w stężeniach 3.6, 7.25, 14.5 i 29 μM na aktywność transkrypcyjną p53 w mysich fibroblastach T22. Nie zaobserwowano istotnego wzrostu transkrypcji białka pod wpływem badanego związku, w najwyższym stężeniu wzrost ten wynosił 0.49 ± 0.05 , podczas gdy substancja referencyjna (aktynomycyna D) w stężeniu 60 ng/ml, będąca aktywatorem transkrypcji p53, powodowała wzrost 9.25 ± 1.51 . Sugeruje to brak wpływu kwasu usninowego na proces apoptozy [Mayer 2005].

Jedna zaledwie praca dotyczy wpływu kwasu usninowego na elementy cytoszkieletu komórkowego - mikrotubule. Rola mikrotubul w komórkach dotyczy przede wszystkim podziałów mitotycznych, lecz także ruchów komórek i sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, stąd praca ta jest niezwykle istotna, tym bardziej iż ma charakter pionierski w badaniach nad aktywnością kwasu usninowego. O'Neill i wsp. badali wpływ kwasu usninowego w stężeniu 29 μM na mikrotubule w ludzkich komórkach nowotworu piersi MCF7 oraz nowotworu płuc H1299. Jako kontrole stosowano taksol (stabilizujący mikrotubule) i winkrystynę (hamującą polimeryzację mikrotubul). Komórki inkubowano z badanym związkiem przez 4 i 24 h, a ze związkami kontrolnymi w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ przez 4 h, a następnie wybarwiano komórki barwnikiem FITC. Nie zaobserwowano żadnych zmian w mikrotubulach w komórkach traktowa-

nych kwasem usninowym, co świadczy o braku wpływu tego związku na mikrotubule [O'Neill 2009].

Określenie potencjalnego mechanizmu wpływu kwasu usninowego na komórki nowotworowe wymaga zatem dalszych badań na poszerzonym zakresie linii komórkowych.

5.1.9.3. Aktywność antymitotyczna

Aktywność antymitotyczna kwasu usninowego była określana przez różnych autorów z zastosowaniem testu *Allium* [Oświecimska 1980, Oświecimska 1987, Grzycka 1979, Huovinen 1989, Öztürk 1999]. We wszystkich przeprowadzonych badaniach kwas (+)-usninowy wykazał bardzo silną aktywność hamującą podział i wzrost korzeni, w bardzo niskich stężeniach (0.0004%, 100 ppm), aktywność kwasu (-)-usninowego, opisana w jednym tylko badaniu, była nieco słabsza (0.25, 2.5 µg/ml). Podobnie wysoką aktywnością, co związek macierzysty, charakteryzowała się sól sodowa kwasu usninowego [Grzycka 1979].

Oświecimska i wsp. badali aktywność antymitotyczną kwasu usninowego, izolowanego z *Cladonia sylvatica*, w teście *Allium*. Badany związek był dodawany bezpośrednio do wody z kranu (4 mg/1000cm³) albo rozpuszczany w DMSO i rozcieńczany wodą destylowaną lub wodą kranową, albo gotowany przez 20 minut w wodzie kranowej (pH 7.2-7.4) lub w wodzie destylowanej (doprowadzonej do pH 7.5 przy użyciu Ca(OH)₂). Kwas usninowy dodany bezpośrednio do wody z kranu nie wykazywał wpływu hamującego na wzrost korzeni *Allium*, podczas gdy rozpuszczony w DMSO a następnie w wodzie kranowej powodował 94.6% zahamowanie wzrostu po 24 h inkubacji w stężeniu 0.0004%. To samo stężenie kwasu usninowego, przygotowane z wykorzystaniem wody destylowanej, nie powodowało inhibicji. Kwas usninowy gotowany w wodzie zarówno kranowej, jak i destylowanej, wykazał silną aktywność hamującą wzrost korzeni *Allium*, powodując odpowiednio 92.4 oraz 98.4% zahamowania w stężeniu 0.0005%. Autorzy sugerują, że kwas usninowy, przygotowany poprzez gotowanie w wodzie w obecności jonów Ca²⁺, przechodzi w postać bardziej rozpuszczalną w wodzie [Oświecimska 1987].

Grzycka określała wpływ kwasu usninowego, izolowanego z *Ramalina fraxinea*, a następnie przeprowadzonego w sól sodową, na wzrost korzeni *Allium*. Sól sodowa kwasu usninowego w stężeniu 0.0001% powodowała 62.5% zahamowanie wzrostu korzeni po 24 h inkubacji [Grzycka 1979]. Podobne badanie przeprowadził Öztürk i wsp., wykazując aktywność antymitotyczną kwasu usninowego w teście *Allium* w dawkach 100, 200 i 300 ppm [Öztürk 1999] oraz Huovinen i Lampero, obserwując wpływ antymitotyczny kwasu (-)-usninowego w tym samym teście przy stężeniach 0.25 i 2.5 µg/ml [Huovinen 1989].

5.1.9.4. Aktywność przeciwnowotworowa

Nieliczne badania opisują aktywność kwasu usninowego wobec eksperymentalnie wywołanych nowotworów w modelach zwierzęcych [Kupchan 1975, Takai 1979, Al-Bekairi 1991, Al-Bekairi 1991 a, Ribeiro Costa 2004]. Najwcześniejsze badania dotyczą aktywności kwasu (-)-usninowego [Kupchan 1975, Takai 1979], natomiast późniejsze dotyczą enanajomeru (+) [Ribeiro Costa 2004, Al-Bekairi 1991, Al-Bekairi 1991 a]. Kwas (-)-usninowy nie wywoływał znaczącego wydłużenia przeżywalności zwierząt z wszczepionym nowotworem

[Kupchan 1975, Takai 1979], natomiast kwas (+)-usninowy powodował wyraźne zmniejszenie guza, nie powodując jednocześnie zmian w pozostałych, zdrowych organach. Co ciekawe, kwas usninowy podany w postaci mikrokapsułek był znacznie bardziej aktywny od związku podanego w postaci wolnej [Ribeiro Costa 2004]. Zaobserwowanym efektem ubocznym podawania kwasu usninowego zwierzętom było obniżenie proliferacji erytrocytów w szpiku oraz nieznaczne zmniejszenie poziomu białek i kwasu RNA w wątrobie pod wpływem wysokich dawek badanego związku [Al-Bekairi 1991, Al-Bekairi 1991a].

Kupchan i Kopperman określali aktywność przeciwnowotworową kwasu (-)-usninowego w doświadczalnie wywołanym nowotworze płuc Lewisa u myszy. Kwas usninowy, podawany w dawkach 20-200 mg/kg masy ciała, wywoływał zwiększenie przeżywalności zwierząt o 13-15% [Kupchan 1975]. Podobnie, kwas (-)-usninowy podawany dootrzewnowo myszom z eksperymentalnie wszczepioną białaczką P388 w dawce 100 mg/kg masy ciała przez 9 kolejnych dni wywoływał wydłużenie przeżywalności zwierząt o 14%. Żadna z 18 półsyntetycznych pochodnych kwasu usninowego, przebadanych w tym eksperymencie, nie była bardziej aktywna [Takai 1979].

Ribeiro Costa i wsp. porównywali aktywność przeciwnowotworową kwasu usninowego wolnego oraz umieszczonego w mikrokapsułkach u myszy z wszczepionym mięsakiem Sarcoma 180. Mysiom po 24 h od wszczepienia nowotworu podawano dootrzewnowo badany związek, w postaci wolnej lub w mikrokapsułkach, w dawce 15 mg/kg masy ciała przez 7 dni. Po tym czasie zwierzęta uśmiercono, określano masę guza oraz analizowano histopatologicznie organy wewnętrzne (wątroba, nerki i śledziona). Aktywność przeciwnowotworowa kwasu usninowego podanego w postaci mikrokapsułek była wyższa niż wolnego związku, i wynosiła odpowiednio 63% i 42% zahamowania wzrostu guza. Analiza histopatologiczna nie wykazała zmian w badanych organach wewnętrznych pod wpływem żadnej z badanych postaci kwasu usninowego [Ribeiro-Costa 2004]. Podobne badania przeprowadzone przez Santos i wsp. również wykazały zmniejszenie wzrostu guza u myszy pod wpływem kwasu usninowego podanego w formie nanokapsułek, w porównaniu do wolnego związku [Santos 2006].

Kwas usninowy, komercyjnie zakupiony, podawano doustnie myszom w postaci zawiesiny wodnej w dawce 200 i 100 mg/kg masy ciała. Po 35 dniach podawania badanego związku zwierzęta uśmiercono i pobrano nasienie oraz jądra, nasieniowody i ogon najądrza. Badano liczebność, ruchliwość i morfologię plemników, a także kwasy nukleinowe (RNA, DNA) oraz całkowitą ilość protein w jądrach. Kwas usninowy nie spowodował istotnych statystycznie zmian w jakości nasienia ani w wadze narządów rozrodczych, nie zmienił również ilości kwasów nukleinowych ani protein w badanych narządach. Autorzy sugerują, że może to świadczyć o braku efektów ubocznych kwasu usninowego przy jego potencjalnym zastosowaniu jako środka o działaniu przeciwnowotworowym [Al-Bekairi 1991].

Ta sama grupa autorów podawała myszom doustnie kwas usninowy w dawce 100 i 200 mg/kg masy ciała. Po 24, 48 i 72 h zwierzęta uśmiercano, pobierano szpik i przygotowywano z niego preparaty mikroskopowe. Obserwacje wskazały na obniżenie proliferacji polichromatycznych erytrocytów pod wpływem najwyższej dawki kwasu usninowego po 24 h, w pozostałych przypadkach efekt ten nie był statystycznie istotny. Ponadto w pobranych wątrobach określano zawartość białek i kwasów nukleinowych. Zaobserwowano obniżenie poziomu białek pod wpływem obu dawek kwasu usninowego jedynie po 48 h. Poziom kwasu RNA był rów-

niez obniżony po 24 i 48 h w przypadku obu dawek kwasu usninowego, natomiast poziom kwasu DNA nie uległ zmianie [Al-Bekairi 1991 a].

5.1.10. Farmakokinetyka i metabolizm

Bardzo niewiele danych opisuje losy kwasu usninowego w organizmie [Foti 2008, Krishna 1992, Sundset 2010]. Badania te ograniczone są do eksperymentów *in vitro* [Foti 2008] oraz na zwierzętach [Krishna 1992, Sundset 2010]. Badania *in vitro* wskazują na wpływ kwasu usninowego na niektóre podjednostki cytochromu P450, co może się wiązać z potencjalnymi interakcjami lekowymi [Foti 2008]. Wyniki badań wskazują na stosunkowo dobrą biodostępność kwasu usninowego oraz jego wolne wchłanianie z przewodu pokarmowego zwierząt po podaniu doustnym [Krishna 1992]. Ciekawe badania przeprowadzone przez autorów norweskich dotyczyły degradacji kwasu usninowego przez florę bakteryjną w przewodzie pokarmowym reniferów [Sundset 2010].

Foti i wsp. badali metabolizm kwasu usninowego *in vitro* w ludzkich hepatocytach oraz wątrobowej frakcji subkomórkowej. Kwas usninowy był metabolizowany do trzech monohydroksylowych pochodnych oraz dwóch koniugatów glukuronidowych, za pomocą odpowiednio cytochromu P450 (CYP) 1A2 oraz glukuronozylotransferazy urydynodwufosforanu UGT1A1 i UGT1A3. Czas półtrwania kwasu usninowego w mikrosomach wątroby wynosił 19.3 ± 0.58 min. W komórkach hepatocytów kwas usninowy w stężeniu $20 \mu\text{M}$ nie indukował cytochromu CYP1A2, CYP2B6 i CYP3A4, w przeciwieństwie do substancji referencyjnych, odpowiednio omeprazolu, fenobarbitalu i rifampicyny. Badany związek był natomiast słabym inhibitorem CYP2D6 oraz umiarkowanym inhibitorem CYP2C19 ($\text{IC}_{50}=9 \text{ nM}$) i CYP2C9 ($\text{IC}_{50}=94 \text{ nM}$), a także CYP2C8 ($\text{IC}_{50}=1.9 \mu\text{M}$) i CYP2C18 ($6.3 \mu\text{M}$). Wskazywać to może na potencjalne powodowanie interakcji kwasu usninowego z innymi lekami [Foti 2008].

Krishna i Venkataramana określali farmakokinetykę kwasu usninowego w badaniach na królikach. Zwierzętom podawano kwas usninowy w stężeniach 5 mg/kg masy ciała (dożylnie) lub 20 mg/kg masy ciała (doustnie) i pobierano krew natychmiast po podaniu oraz 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36 i 48 h po podaniu dożylnym. W przypadku podania doustnego pobierano krew z pominięciem czasu 0.25 h od podania, natomiast dodatkowo po 8, 60 i 72 h po podaniu. Osocze oddzielano od krwi i analizowano ilościowo pod kątem obecności kwasu usninowego metodą HPLC. Analizę prowadzono na kolumnie C18 z odwróconą fazą ($250 \times 4 \text{ mm}$), z wykorzystaniem fazy ruchomej metanol-bufor fosforanowy (pH 7.4) 7:3, przy przepływie 1 ml/min i długości fali detekcji 280 nm . Poziom kwasu usninowego w osoczu po podaniu dożylnym miał charakter trójwykładniczy, ze średnim czasem półtrwania $10.7 \pm 4.6 \text{ h}$. Objętość dystrybucji w kompartmentcie centralnym oraz klirens systemowy wynosiły odpowiednio $43.9 \pm 21.3 \text{ ml/kg}$ i $12.2 \pm 3.0 \text{ ml/h/kg}$. Po podaniu doustnym kwas usninowy osiągał najwyższe stężenie w osoczu, równe $32.5 \pm 6.8 \mu\text{g/ml}$, w ciągu $12.2 \pm 3.8 \text{ h}$. Średnia absolutna biodostępność badanego związku po podaniu doustnym wynosiła 77.8%. Uzyskane wyniki sugerują dobrą biodostępność oraz powolne wchłanianie kwasu usninowego po podaniu doustnym [Krishna 1992].

Sundset i wsp. określali metabolizm kwasu usninowego u reniferów, karmionych przez 4 tygodnie plechami *Cladonia stellaris*, zawierającymi 9.1 mg/g DM kwasu usninowego. Dzienna ilość kwasu usninowego w diecie zwierząt wynosiła $91\text{--}117 \text{ mg/kg}$ masy ciała. W

trakcie eksperymentu pobierano próbki odchodów i moczu, a także pozostawiano kontrolne próbki paszy. Po zakończeniu eksperymentu zwierzęta uśmiercono i określano ilość kwasu usninowego w zawartości przewodu pokarmowego oraz tkankach wątroby i nerek, a także wcześniej pobranych próbkach odchodów, moczu i paszy. Kwas usninowy nie został znaleziony w próbkach treści przewodu pokarmowego, tkankach wątroby ani nerek, nie wykryto go również w odchodach i moczu zwierząt. Autorzy sugerują, że kwas usninowy został poddany degradacji przez mikroorganizmy w przewodzie pokarmowym zwierząt, co może wskazywać na ich zdolność do unieczynniania potencjalnych związków toksycznych [Sundset 2010].

5.1.11. Toksyczność

Toksyczność kwasu usninowego określano w laboratoryjnym teście wpływu na jaja skorupiaka *Artemia salina* [Bomfim 2009], jak również wobec organizmów zwierzęcych, takich jak gryzonie [Odabasoglu 2006, Abo-Khatwa 2005] czy owce [Dailey 2008]. Kwas usninowy wykazał dużą toksyczność w stosunku do *Artemia salina* [Bomfim 2009]. Wobec gryzoni aktywność ta była mocno zróżnicowana, u szczurów dawka toksyczna przekraczała poziom 1000 mg/kg, natomiast u myszy wartość LD_{50} wynosiła 180 mg/kg [Abo-Khatwa 2005, Odabasoglu 2006]. W przypadku owiec, dzienna dawka ED_{50} mieściła się w przedziale 485-647 mg/kg/ [Dailey 2008].

Toksyczność kwasu usninowego wobec jaj *Artemia salina* określano w teście brine shrimp. Kwas usninowy wykazał toksyczność wobec badanego organizmu, dawka LC_{50} mieściła się w przedziale 5.06-7.76 ppm [Bomfim 2009].

Kwas usninowy, podawany doustnie szczurom, nie był dla tych zwierząt toksyczny w dawkach 500 i 1000 mg/kg masy ciała. Ostrą toksyczność zaobserwowano dopiero w dawce 2000 mg/kg masy ciała [Odabasoglu 2006]. Abo-Khatwa i wsp. określali toksyczność kwasu usninowego u myszy. Zwierzętom podawano badany związek podskórnie w dawkach 80-280 mg/kg masy ciała. Zaobserwowano liniową zależność pomiędzy śmiertelnością zwierząt a podawaną dawką kwasu usninowego, wyliczona wartość LD_{50} wynosiła 180 mg/kg. Z wątroby zwierząt izolowano ponadto mitochondria, obserwując w nich rozprzeganie oksydacyjne: zahamowanie oddychania komórkowego, hamowanie biosyntezy ATP oraz stymulowanie aktywności ATPazy [Abo-Khatwa 2005].

Dailey i wsp. badali toksyczność kwasu (+)-usninowego u owiec, na podstawie wcześniejszych doniesień o śmiertelnych przypadkach wśród zwierząt, jedzących niektóre gatunki porostów. Z jednego z tych gatunków, *Xanthoparmelia chlorochroa*, wyizolowano kwas usninowy, który następnie posłużył do badań. Dziewięciu owcom podawano doustnie kwas usninowy w dawkach od 102 do 776 mg/kg masy ciała/dzień przez siedem kolejnych dni. U czterech zwierząt nie zaobserwowano żadnych objawów. W dwóch przypadkach zaobserwowano takie objawy, jak letarg, anoreksja czy symptomy świadczące o zaburzeniach trawiennych, u zwierząt otrzymujących dawki kwasu usninowego 647 i 776 mg/kg/dzień. Ponadto, zwierzęta te zmarły niespodziewanie odpowiednio w ósmym i siódmym dniu eksperymentu. Po wykonaniu analiz biochemicznych u tych zwierząt zaobserwowano podniesione poziomy enzymów wątrobowych oraz dehydrogenazy mleczanowej, natomiast sekcja ciał wykazała uszkodzenia w mięśniach szkieletowych. Dawka ED_{50} mieściła się w przedziale 485-647 mg/kg/dzień. Autorzy sugerują, że zjedzenie porostów zawierających taką dawkę kwasu usninowego w naturze

jest niemożliwe, ze względu na jego zawartość w roślinie równą najwyżej kilku procentom, stąd obserwowana toksyczność porostów z rodzaju *Xanthoparmelia* musi wynikać z obecności również innych związków [Dailey 2008].

5.1.12. Działanie hepatotoksyczne

Sporo opublikowanych doniesień dotyczy działania hepatotoksycznego kwasu usninowego. Są to badania prowadzone zarówno *in vitro*, na hodowanych hepatocytach i izolowanych z nich mitochondriach [Pramyothin 2004, Han 2004], jak i na modelach zwierzęcych [Pramyothin 2004, Joseph 2009, Santos 2006]. Co ciekawe, hepatotoksyczność była zmniejszona w przypadku podawania kwasu usninowego w postaci nanokapsułek [Santos 2006]. Opisano również kilkanaście przypadków ciężkich uszkodzeń wątroby u osób przyjmujących kwas usninowy jako suplement diety wspomagający odchudzanie, z czego ponad połowa przypadków dotyczy złożonego preparatu LipoKinetix [Durazo 2004, Sanchez 2006, Hsu 2005, Neff 2004, Favreau 2002]. W skład tego suplementu wchodzi między innymi sól sodowa kwasu usninowego, a ponadto chlorowodorek norefedryny, diiodotyronina, chlorowodorek johimbiny i kofeina [Favreau 2002], stąd określenie przyczyn uszkodzeń wątroby w tych przypadkach nie jest jednoznaczne z obecnością w nim pochodnej kwasu usninowego. Jednak pozostałe przypadki dotyczą zażywania preparatów zawierających wyłącznie kwas usninowy [Durazo 2004] lub preparatów z dodatkiem substancji nie podejrzewanych o negatywny wpływ na wątrobę (nasiona soi, L-karnityna, pirogronian wapnia) [Sanchez 2006, Hsu 2005], co wskazuje na jego silny wpływ hepatotoksyczny. Zastosowanie kwasu usninowego we wspomaganiu odchudzania wynika najprawdopodobniej z jego aktywności rozprzegającej fosforylację oksydacyjną w mitochondriach [Han 2004, Durazo 2004], porównywalną lub nawet przewyższającą 2,4-dinitrofenol, stosowany od lat 30 XX wieku właśnie w tym celu [Durazo 2004]. Ma to przyspieszać tzw. spalanie tłuszczu w organizmie i prowadzić do efektu utraty wagi.

Badanie wpływu kwasu usninowego (0.01, 0.1 i 1 mM) na izolowane hepatocyty wykazało zwiększone wydzielanie transaminaz (AST, ALT) przez te komórki w sposób zależny od dawki, a także nasilenie peroksydacji lipidów. Efekt ten był podobny do działania czterochloru węgla w dawce 10 μ M, którego użyto jako substancji referencyjnej. Ponadto stwierdzono, że kwas usninowy w dawkach 0.15-6 μ M powodował rozpręganie fosforylacji oksydacyjnej w izolowanych mitochondriach [Pramyothin 2004]. Podobne badanie przeprowadził Han i wsp., określając wpływ kwasu usninowego na mysie hepatocyty w hodowli *in vitro* oraz na izolowane z nich mitochondria. Badany związek w dawce 5 μ M powodował 98% nekrozę hepatocytów po 16 h inkubacji, jednak nie zaobserwowano symptomów apoptozy. Ponadto zaobserwowano rozpręganie fosforylacji oksydacyjnej w izolowanych mitochondriach oraz wywołanie stresu oksydacyjnego pod wpływem kwasu usninowego [Han 2004].

Potencjalne działanie hepatotoksyczne kwasu usninowego zostało przebadane na szczurach, którym podawano dootrzewnowo kwas usninowy w stężeniu 50 i 200 mg/kg masy ciała dziennie przez 5 dni. Po tym czasie pobrano próbki krwi, w których oznaczano poziom enzymów wątrobowych ALAT i ASPAT, natomiast wycinki wątroby zwierząt badano histopatologicznie za pomocą mikroskopu elektronowego. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w poziomie enzymów wątrobowych, natomiast badanie mikroskopowe wykazało oznaki uszkodzenia hepatocytów, w postaci zaburzeń w strukturze mitochondriów oraz retikulum en-

doplasmatycznego, zwłaszcza w przypadku większej z podawanych dawek kwasu usninowego [Pramyothin 2004] .

Myszom z wszczepionym mięsakiem (sarcoma-180) podawano kwas usninowy w postaci wolnej oraz w formie nanokapsułek. Poza znaczącym zmniejszeniem się guza, zaobserwowano wyraźny spadek aktywności hepatotoksycznej kwasu usninowego w przypadku podawania go w formie nanokapsułek, w porównaniu do postaci wolnej. Spadek ten wyrażał się zarówno poprzez mniejszą wakuolizację hepatocytów w analizie histopatologicznej, jak i poprzez wyniki badań biochemicznych. Poziom enzymów wątrobowych ALT i AST był wyraźnie niższy w grupie zwierząt otrzymujących kwas usninowy w postaci nanokapsułek (406 ± 9.45 IU/l i 322.48 ± 32.36 IU/l) niż w przypadku wolnego kwasu usninowego (552 ± 0.82 IU/l i 403.10 ± 32.36 IU/l), co wskazuje na mniejsze uszkodzanie komórek wątroby przez kwas usninowy w postaci nanokapsułek [Santos 2006].

W badaniach Josepha i wsp. kwas usninowy w dawkach 60, 180 i 600 ppm podawano myszom wraz z dietą przez 14 dni, a następnie określano poziom ekspresji niektórych genów w komórkach wątroby. Zaobserwowano istotny wpływ stymulujący kwasu usninowego w dawce 600 ppm na ekspresję genów związanych z kompleksami I-IV łańcucha transportu elektronów (m.in. Ndufa, Ndufb, mt-Nd, Cox, Uqcrb), a także nadekspresję genów odpowiadających za utlenianie kwasów tłuszczowych (m.in. Acadm, Acads, Cpt, Facl, Hadhb), cykl Krebsa (m.in. Dlst, Idh, Sdhb, Sucla), apoptozę (m.in. Bax, Bcl2, Bnip, Pdcd) oraz transport błonowy (m.in. Aqp, Scp, Sfxn, Slc, Timm), co wskazuje na rolę kwasu usninowego w rozprężaniu potencjału błonowego mitochondriów w hepatocytach i efekt hepatotoksyczny [Joseph 2009]

Durazo i wsp. opisują przypadek ciężkiej niewydolności wątroby i wynikającego z tego przeszczepu narządu u pacjentki stosującej preparat odchudzający, zawierający czysty kwas usninowy w dawce 500 mg dziennie przez dwa tygodnie. Nieprzytomna 28-letnia kobieta została przywieziona do szpitala w stanie wymagającym intubacji i nie reagowała na bodźce bólowe. Przeprowadzone badania laboratoryjne wykazały ponad dziesięciokrotnie przekroczone wskaźniki enzymów wątrobowych ALAT i ASPAT oraz bilirubiny, tomografia komputerowa mózgu wskazała na rozlany obrzęk. Pacjentka została poddana zabiegowi przeszczepu wątroby. Analiza usuniętej wątroby wskazała na prawie trzykrotne zmniejszenie jej rozmiarów, natomiast badanie histologiczne potwierdziło rozległe obumarcie tkanek miękkich [Durazo 2004].

Sanchez i wsp. podają dwa przypadki ostrej hepatotoksyczności po trzymiesięcznym zażywaniu wspomagającego odchudzanie suplementu diety UCP-1, zawierającego kwas usninowy, L-karnitynę oraz pirogronian wapnia odpowiednio 150 mg, 525 mg i 1050 mg na kapsułkę. Małżeństwo prowadzące klub fitness, 38-letnia kobieta i mężczyzna w tym samym wieku, stosowało 3 kapsułki preparatu trzy razy dziennie w dwutygodniowych cyklach. W obydwu przypadkach wskaźniki enzymów wątrobowych były znacznie przekroczone (ASPAT: 40-krotnie u kobiety, 15-krotnie u mężczyzny, ALAT: 40-krotnie u kobiety, 33-krotnie u mężczyzny), ponadto kobieta miała kilkunastokrotnie podwyższony poziom bilirubiny. W przypadku pacjentki niezbędny był zabieg przeszczepu wątroby, ze względu na postępującą encefalopatię wątrobową. W przypadku jej męża zaobserwowano jedynie częściowe uszkodzenie wątroby, nie wymagające przeszczepu. Po zastosowanym leczeniu, wyniki laboratoryjne pacjenta wróciły do normy [Sanchez 2006].

Hsu i wsp. opisali przypadek ciężkiego uszkodzenia wątroby u trzech sióstr, zażywających środek wspomagający odchudzanie, zawierający kwas usninowy oraz nasiona soi, przez odpowiednio 2 tygodnie, 1 miesiąc i 3 dni (przerwanie kuracji ze względu na objawy grypopodobne). Dwie pierwsze pacjentki miały znacznie przekroczone wskaźniki enzymów wątrobowych (odpowiednio ALAT 10 i 20-krotnie, ASPAT 5 i 10-krotnie) oraz bilirubiny. Po odstawieniu preparatu zawierającego kwas usninowy oraz odpowiednim leczeniu wyniki pierwszej z pacjentek wróciły do normy po 3 miesiącach. W przypadku drugiej z sióstr, ze względu na rozwijającą się encefalopatię wątrobową stopnia 1, brano pod uwagę transplantację wątroby, jednak zabieg ten ostatecznie nie został wykorzystany ze względu na poprawiający się stan pacjentki. Po 5 miesiącach leczenia wyniki pacjentki również wróciły do normy [Hsu 2005].

Neff i wsp. opisuje dwa przypadki ciężkiego uszkodzenia wątroby po stosowaniu złożonego suplementu diety LipoKinetix, pomagającego w odchudzaniu i zawierającego między innymi sól sodową kwasu usninowego. Dwie 32-letnie kobiety stosowały ten preparat przez 2 i 4 tygodnie. U obu pacjentek zaobserwowano wielokrotnie przekroczone poziomy enzymów wątrobowych (ASPART 30 i 40-krotne, ALAT prawie 40-krotne w obu przypadkach) oraz bilirubiny (20 i 13-krotne). U pacjentki przyjmującej preparat przez 2 tygodnie konieczny był przeszczep wątroby, u drugiej z pacjentek zadowalające wyniki osiągnięto po 8 tygodniach leczenia [Neff 2004].

Podobne siedem przypadków osób, zażywających LipoKinetix opisuje Favreau i wsp. U wszystkich osób zaobserwowano ostrą hepatotoksyczność, objawiającą się bólami brzucha, wymiotami oraz znacznie podwyższonym poziomem enzymów wątrobowych i bilirubiny. Pacjenci zażywali preparat przez 10-84 dni. U jednej z pacjentek zaobserwowano encefalopatię wątrobową stopnia 2 i poddano zabiegowi transplantacji wątroby. U pozostałych pacjentów powrót do zdrowia nastąpił w przeciągu od 2-4 miesięcy po odstawieniu preparatu i poddaniu się leczeniu [Favreau 2002].

5.1.13. Wywoływanie alergii kontaktowej

Kwas usninowy został przebadany pod kątem wywoływania alergii kontaktowej na podstawie doniesień o takim zjawisku u osób stosujących kosmetyki lub mających kontakt zawodowy lub hobbystyczny z ogrodnictwem lub leśnictwem. Rola kwasu usninowego jako alergen została w kilku przypadkach potwierdzona [Stinchi 1997, Mitchell 1972], natomiast w pozostałych przypadkach był on jedną z wielu substancji mogącą powodować uczulenie [Sheu 2006, Stinchi 1997].

Sheu i wsp. opisali cztery przypadki pacjentów z alergią kontaktową, wywołaną stosowaniem kosmetyków (głównie dezodorantów). Po przeprowadzeniu testów (patch test) w każdym z opisywanych przypadków wykazano pozytywny wynik testu dla kwasu usninowego oraz dla kilku innych substancji. W żadnym z badanych przypadków kwas usninowy nie był jedynym możliwym alergenem [Sheu 2006].

Stinchi i wsp. opisali 7 przypadków pacjentów z alergią kontaktową, u których po przeprowadzeniu testów wykazano pozytywny wynik dla kwasu usninowego. W dwóch przypadkach kwas usninowy był jedynym alergenem, jak ustalono pacjenci zajmowali się hobbystycznie ogrodnictwem. W kolejnych dwóch przypadkach pacjenci również uprawiali ogród, jednak kwas usninowy nie był jedynym związkiem, który u tych osób dał wynik pozytywny w

testach alergicznych. Troje pacjentów nie miało żadnego kontaktu z roślinami, stąd pozytywny wynik testu dla kwasu usninowego u tych osób może być związany ze stosowaniem kosmetyków zawierających ten związek [Stinchi 1997].

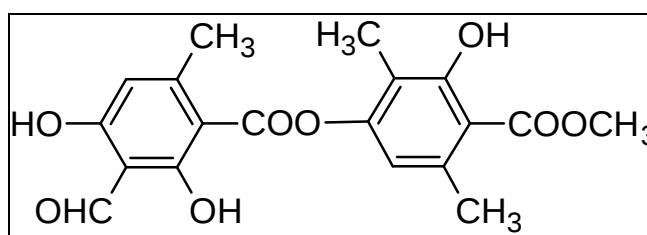
Mitchell i Armitage opisują kilka przypadków alergii kontaktowej u drwali i pracowników leśnych. U dwóch z nich testy alergiczne wykazały pozytywny wynik dla kwasu usninowego. Zjawisko alergii kontaktowej nasilało się u osób pracujących w lasach starych, natomiast było bardzo rzadkie przy pracy z drzewostanem młodym, co jest równoznaczne z brakiem lub niewielką ilością porostów występujących na tych drzewach [Mitchell 1972].

5.2. Atranoryna

Atranoryna została po raz pierwszy wyizolowana w 1898 roku przez Hessego [Dias 2009]. W porównaniu do kwasu usninowego, najbardziej zbadanego metabolitu porostowego, ilość prac dotyczących atranoryny jest dużo mniejsza.

5.2.1. Własności fizykochemiczne

Atranoryna – jest pochodną β -orcynolu: 3-hydroksy-4-metoksy- (metoksykarbonylo)-2,5-dimetylofenylo ester kwasu 3-formylo-2,4-dihydroksy-6-metylobenzoowego, o wzorze sumarycznym $C_{19}H_{18}O_8$; syn. kwas atranorynowy, parmelina [Culberson 1979], usnaryna; paradepsyd; ester diarylowy; 3,7,4'-trimetyloeter kemferolu



Rycina 9. Wzór strukturalny atranoryny

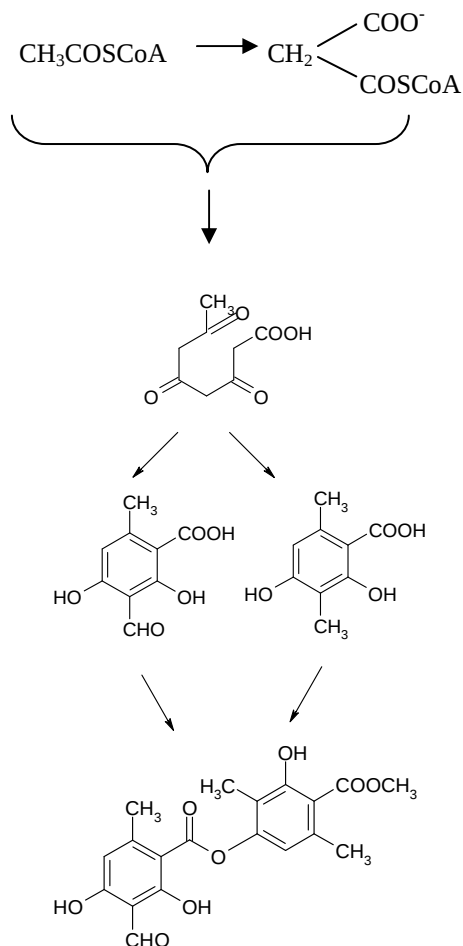
Atranoryna jest bezbarwną, krystaliczną substancją, o temperaturze topnienia 192-194°C [Podterob 2008] lub 196°C [Culberson 1979]. Jest dobrze rozpuszczalna we wrzącym benzenie, chloroformie i ksylenie, słabo rozpuszczalna we wrzącym etanolu i eterze dietylowym, natomiast nierozpuszczalna w wodzie, zimnym etanolu i zimnym eterze dietylowym [Podterob 2008]. Do celów badania aktywności biologicznej i farmakologicznej *in vitro* niektórzy autorzy wskazują na 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstrynę jako optymalny rozpuszczalnik [Kristmundsdottir 2005].

W widmie w podczerwieni charakterystycznymi pasmami dla atranoryny są pasma 3450, 1770, 1730, 1650, 1580, 1260 i 1145 cm^{-1} [Melo 2008]. W obrazie ^1H -NMR widoczne są sygnały singletowe przy δ_{H} 2.09, 2.54, 2.68 i 3.98 ppm, odpowiadające trzem grupom metylowym przy węglach pierścieni aromatycznych oraz grupie metoksyłowej. Charakterystycznych jest także sześć sygnałów singletowych odpowiadających dwóm protonom aromatycznym (δ_{H} 6.39, 6.51 ppm), protonowi grupy formylowej (δ_{H} 10.35 ppm) oraz trzem grupom hydroksylowym (δ_{H} 11.93, 12.49, 12.54 ppm) [Melo 2008, De Carvalho 2000]. Widmo ^{13}C -NMR atranoryny przedstawia charakterystyczny sygnał dla grup karbonylowych przy δ_{H} 169.3 i 169.9 ppm, a także sygnał przy δ_{H} 194.1 ppm, wskazujący na grupę aldehydową [Nasser 2009].

5.2.2. Biogeneza

Atranoryna wywodzi się biogenetycznie ze szlaku octanowo-polimalynolowego (Tabela 2.) Biosynteza atranoryny została zaproponowana w 1965 roku przez Yamazakiego. Zwią-

zek ten powstaje z udziałem octanu oraz mrówczanu, co jest wyjątkiem w porównaniu do biosyntezy innych depsydów porostowych, np. kwasu lekanorowego [Yamazaki 1965]. Schemat biosyntezy atranoryny przedstawiony jest na Ryc. 10.



Rycina 10. Schemat biosyntezy atranoryny [wg. Yamazaki 1965]

5.2.3. Rozpowszechnienie w roślinach

Atranoryna występuje przede wszystkim w porostach, ale także została opisana w mchach i niektórych roślinach wyższych (Tabela 12). Najczęściej występuje w rodzajach *Cladonia*, *Evernia*, *Parmelia*, *Pseudevernia*, *Streocaulon* czy *Lecanora*.

Blanch i wsp. opisali syntezę atranoryny w warunkach *in vitro* przez unieruchomione komórki *Pseudevernia furfuracea*, gdzie źródłem węgla był dostarczany do pożywki octan [Blanch 2001].

Tabela 12. Rozpowszechnienie atranoryny w roślinach

RODZINA	RODZAJ	CYTOWANIE
POROSTY		
<i>Cladoniaceae</i>	<i>Baeomyces</i> <i>Cladia</i> <i>Cladina</i> <i>Cladonia</i> <i>Pycnothelia</i>	Culberson 1979 Perry 1999 Maia 2002 Melo 2008 Culberson 1979 Honda 2010 Yilmaz 2004 Nybakken 2010 Falk 2008 Huneck 2004 Piercey-Normore 2007 Culberson 1979
<i>Graphidaceae</i>	<i>Graphina</i> <i>Graphis</i> <i>Xylographa</i>	Culberson 1979 Culberson 1979 Culberson 1979
<i>Lecanoraceae</i>	<i>Haematomma</i> <i>Lecanora</i> <i>Thamnolecania</i>	Culberson 1979 Culberson 1979 Milot 2008 Hesbacher 1996 Culberson 1979
<i>Lecideaceae</i>	<i>Lecidea</i> <i>Mycoblastus</i>	Culberson 1979 Culberson 1979
<i>Pannariaceae</i>	<i>Pannaria</i>	Culberson 1979
<i>Parmeliaceae</i>	<i>Anzia</i> <i>Asahinea</i> <i>Cavernularia</i> <i>Cetraria</i> <i>Cetrelia</i> <i>Hendrickxia</i> <i>Hypogymnia</i> <i>Menegazzia</i> <i>Parmelia</i> <i>Parmeliopsis</i> <i>Parmotrema</i> <i>Platismatia</i> <i>Pseudevernia</i>	Culberson 1979 Culberson 1979 Krivoshchekova 1983 Culberson 1979 Culberson 1979 Culberson 1979 Culberson 1979 Culberson 1979 Białońska 2005 Culberson 1979 Nybakken 2010 Krivoshchekova 1983 Kumar 1999 b Garcia Rowe 1999 Culberson 1979 Santos 2004 Bugni 2009 Culberson 1979 Nybakken 2010 Culberson 1979 Türk 2006
<i>Pertusariaceae</i>	<i>Pertusaria</i> <i>Ochrolechia</i>	Culberson 1979 Milot 2007
<i>Physciaceae</i>	<i>Anaptychia</i> <i>Buellia</i>	Culberson 1979 Culberson 1979

	<i>Diploicia</i> <i>Heterodermia</i> <i>Physcia</i> <i>Rinodina</i>	Millot 2009 Culberson 1979 Culberson 1979 Culberson 1979
<i>Rocellaceae</i>	<i>Lepraria</i>	Culberson 1979
<i>Sphaerophoraceae</i>	<i>Acrocypus</i>	Culberson 1979
<i>Stereocaulaceae</i>	<i>Stereocaulon</i>	Culberson 1979 König 1999 Falk 2008 Kristmundsdottir 2005 Ingolfssdottir 1998
<i>Stictaceae</i>	<i>Lobaria</i> <i>Pseudocyphellaria</i>	Nybakken 2010 Culberson 1979
<i>Teloschistaceae</i>	<i>Xanthoria</i>	Culberson 1979
<i>Umbilicariaceae</i>	<i>Umbilicaria</i>	Nybakken 2010
<i>Usneaceae</i>	<i>Alectoria</i> <i>Evernia</i> <i>Everniopsis</i> <i>Himantormia</i> <i>Letharia</i> <i>Lethariella</i> <i>Ramalina</i> <i>Siphula</i> <i>Usnea</i>	Culberson 1979 Culberson 1979 Nybakken 2010 Legaz 1990 Culberson 1979 Culberson 1979 Culberson 1979 Toledo Marante 2003 Culberson 1979 Culberson 1979 Culberson 1979 Lohezic Le Devehat 2007
MCHY		
<i>Neckeraceae</i>	<i>Homalia trichomanoides</i>	Wang 2005
ROŚLINY WYŻSZE		
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>Hopea sangal</i>	Nasser 2009
<i>Ochnaceae</i>	<i>Ouratea floribunda</i> <i>Luxemburgia nobilis</i>	De Carvalho 2000 De Carvalho 2000 a
<i>Fabaceae</i>	<i>Acacia mellifera</i>	Mutai 2007

5.2.4. Warunki ekstrakcji, izolacji i identyfikacji

W celu uzyskania atranoryny wykorzystywano jako źródła porosty z różnych gatunków, a także mech [Wang 2005] oraz rośliny wyższe [De Carvalho 2000, 2000 a, Nasser 2009, Mutai 2007], w postaci sproszkowanej [Lohezic Le Devehat 2007, Yilmaz 2004, Türk 2006, Millot 2008, Garcia Rowe 1999, De Carvalho 2000, De Carvalho 2000 a, Nasser 2009, Mutai 2007, Wang 2005] lub tylko rozdrobnionej [Krivoshchekova 1983, Melo 2008, Bugni 2009, König 1999, Perry 1999, Honda 2010, Santos 2004, Maia 2002]. Materiał roślinny ekstrahowano najczęściej w aparacie Soxhleta [Maia 2002, Santos 2004, Lohezic Le Devehat 2007, Honda 2010, Perry 1999, Millot 2008, Melo 2008, Krivoshchekova 1983, Nasser 2009], stosowano również ekstrakcję w temperaturze pokojowej, czasem z jednoczesnym użyciem ultra-

dźwięków w początkowej fazie ekstrakcji [De Carvalho 2000, De Carvalho 2000 a, Wang 2005, Garcia Rowe 1999, Türk 2006, Yilmaz 2004], kilka doniesień opisuje ekstrakcję klasyczną, w kolbie pod chłodnicą zwrotną [König 1999, Bugni 2009, Mutai 2007]. Jako rozpuszczalniki wykorzystywano najczęściej heksan, chloroform, aceton, eter dietylowy [Bugni 2009, Krivoshchekova 1983, De Carvalho 2000 a, Türk 2006, Melo 2008, Mutai 2007, Yilmaz 2004, Garcia Rowe 1999, Maia 2002, Perry 1999, Wang 2005], rzadko etanol, heptan, dichlorometan czy octan etylu [Türk 2006, Millot 2008, König 1999, Nasser 2009]. W kilku przypadkach wykorzystano ekstrakcję rozpuszczalnikami następującymi po sobie: chloroform → aceton, heksan → eter dietylowy → aceton → metanol → woda, heksan → octan etylu → metanol [Santos 2004, Honda 2010, Lohezic Le Devehat 2007, De Carvalho 2000].

Izolacja atranoryny była prowadzona z zastosowaniem chromatografii kolumnowej lub cienkowarstwowej chromatografii preparatywnej, na żelu krzemionkowym standardowym lub, rzadziej, z dodatkiem znacznika fluorescencyjnego, bądź na żelu Sephadex, w fazach ruchomych zestawionych w Tabeli 14. W pojedynczych przypadkach wykorzystano preparatywną wysokosprawną chromatografię cieczową HPLC [Mutai 2007, Bugni 2009] lub chromatografię radiacyjną [Nasser 2009]. Często atranoryna wypadła jako osad podczas ochładzania wyciągów, była wówczas poddawana kilkukrotnej rekrytalizacji w celu oczyszczenia [Maia 2002, König 1999, Millot 2008, Krivoshchekova 1983]. Uzyskany związek identyfikowano metodami chromatograficznymi, najczęściej TLC poprzez kochromatografię z substancją referencyjną, rzadziej HPLC, a także pomiarem temperatury topnienia czy metodami spektralnymi – IR, UV, ^1H , ^{13}C -NMR, MS.

Zestawienie warunków ekstrakcji, izolacji i identyfikacji atranoryny przedstawia Tabela 13. Zestawienie faz ruchomych, wykorzystywanych podczas izolacji i identyfikacji atranoryny przedstawia Tabela 14.

Tabela 13. Zestawienie warunków ekstrakcji, izolacji i identyfikacji atranoryny

MATERIAŁ ROŚLINNY	EKSTRAKcja, ROZPUSZ-CZALNIK	IZOLACJA	IDENTYFI-KACJA	CYTO-WANIE
<i>Cladina dendroides</i>	aparatus Soxhletera eter dietylowy	rozdzielanie pomiędzy chloroform i etanol, osady wypadające podczas ochładzania frakcji etanolowej, rekrytalizacja	TLC, HPLC	Maia 2002
<i>Parmotrema tinctorum</i>	aparatus Soxhletera chloroform → aceton	CC (SP: żel krzemionkowy, MP: gradient heksan-chloroform o wzrastającej polarności)	TLC, HPLC, UV, IR, MS, NMR	Santos 2004
<i>Cladonia verticillaris</i>	aparatus Soxhletera chloroform → aceton	CC (SP: żel krzemionkowy, MP: gradient heksan-aceton o wzrastającej polarności)	TLC, HPLC, UV, IR, MS, NMR	Honda 2010
<i>Usnea articulata</i> sproszkowany	aparatus Soxhletera heksan → eter dietylowy → aceton → metanol → woda	CC (SP: żel krzemionkowy, MP: heksan- metanol 1:1 do 0:1; heksan-octan etylu 3:2; heksan-chloroform 1:1)	HPLC	Lohezic Le Devehat 2007
<i>Cladonia foliacea</i> sproszkowany	aceton, temp. pokojowa, ultradźwięki	pTLC (SP: żel krzemionkowy 60 F ₂₅₄ , MP: toluen-dioksan-lodowaty kwas octowy 36:9:1, heksan-eter dietylowy-kwas mrówkowy 24:8:4)	temperatura topnienia, IR	Yilmaz 2004
<i>Cladia retipora</i>	aparatus Soxhletera eter dietylowy	krystalizacja i rekrytalizacja, CC (SP: żel krzemionkowy zwykłym lub C-18)	¹ H-, ¹³ C-NMR	Perry 1999
<i>Stereocaulon vesuvianum</i>	w kolbie pod chłodnicą zwrotną, dichlorometan	osady wypadające podczas ochładzania wyciągu	IR, UV, ¹ H-, ¹³ C-NMR	König 1999
<i>Pseudevernia furfuracea</i> var. <i>furfuracea</i> sproszkowany	etanol, aceton, eter dietylowy, chloroform temp. pokojowa	pTLC (SP: żel krzemionkowy 60 F ₂₅₄ , MP: toluen-kwas octowy 170:30, cykloheksan-octan etylu 75:25)	temperatura topnienia, IR	Türk 2006
<i>Tephromaella alba</i> sproszkowany	aparatus Soxhletera heptan	elucja wyciągu acetonitrylem, osady wypadające podczas ochładzania roztworu	NMR	Millot 2008
<i>Parmotrema saccatilobum</i>	w kolbie pod chłodnicą zwrotną, heksan	HPLC (SP: kolumna fenylowo-heksylowa, MP: gradient od 50% mieszaniny acetonitrylu-woda do 100% acetonitrylu w ciągu 15 minut)	HPLC	Bugni 2009
<i>Cladina kalbii</i>	aparatus Soxhletera chloroform	osady wypadające podczas ochładzania wyciągu, CC (SP: żel krzemionkowy, MP: chloroform-heksan 80:20)	IR, XRD, ¹ H-, ¹³ C-NMR	Melo 2008
<i>Pertusaria albescens</i> , <i>P. pseudoco-</i>	aceton temp. pokojowa	CC, pTLC (SP: żel krzemionkowy MP: heksan, heksan-eter etylowy 8:2,	temperatura topnienia, UV, MS	Garcia Rowe 1999

<i>rallina</i> , <i>Parmelia</i> <i>tinctina</i> <i>Physconia</i> <i>venusta</i> sproszkowany		5:5 i 2:8, eter etylowy, eter etylowy-aceton 8:2, 5:5 i 2:8, aceton)		
<i>Asahinea</i> <i>chrysantha</i> , <i>A. scolanderi</i> , <i>Parmelia</i> <i>birulae</i>	aparat Soxhleta heksan	osad wypadający podczas ochładzania wyciągu	temperatura topnienia, ^1H -, ^{13}C -NMR, MS	Krivoshchekova 1983
<i>Homalia</i> <i>trichoma-</i> <i>noides</i> sproszkowany	eter dietylowy temp. pokojowa	CC (SP: żel krzemionkowy, MP: eter naftowy-octan etylu (gradient) oraz eter naftowy-chloroform 100:5), CC (SP: Sephadex LH-20, MP: chloroform-metanol 1:1)	^1H -, ^{13}C -NMR	Wang 2005
<i>Hopea sangal</i> sproszkowany	aparat Soxhleta octan etylu	CC (SP: żel krzemionkowy, MP: heksan-octan etylu (gradient); RC (SP: żel krzemionkowy); rekrytalizacja z acetonu	temperatura topnienia, UV, IR, ^1H -, ^{13}C -NMR	Nasser 2009
<i>Ouratea</i> <i>floribunda</i> sproszkowany	heksan→octan etylu→metanol temp. pokojowa	CC (SP: żel krzemionkowy, MP: gradient heksan-dichlorometan →metanol)	temperatura topnienia, IR, ^1H -, ^{13}C -NMR	De Carvalho 2000
<i>Luxemburgia</i> <i>nobilis</i> sproszkowany	heksan temp. pokojowa	elucja mieszaniną metanol-woda 9:1; CC (SP: żel krzemionkowy, MP: heksan-chloroform 1:1); rekrytalizacja mieszaniną heksan-octan etylu 1:1	temperatura topnienia	De Carvalho 2000 a
<i>Acacia</i> <i>mellifera</i> sproszkowany	w kolbie pod chłodnicą zwrotną, chloroform	CC (SP: żel krzemionkowy, MP: cykloheksan-octan etylu 75:25 – 70:30); HPLC (MP: cykloheksan-octan etylu 80:20)	^1H -, ^{13}C -NMR	Mutai 2007

CC – chromatografia kolumnowa; pTLC – preparatywna chromatografia cienkowarstwowa; HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa; RC – chromatografia radialna
SP – faza stacjonarna; MP – faza ruchoma

Tabela 14. Zestawienie faz ruchomych, stosowanych podczas izolacji atranoryny.

faza ruchoma	cytowanie
chloroform-heksan 80:20	Melo 2008
chloroform-metanol 1:1	Wang 2005
cykloheksan-octan etylu 70:30	Mutai 2007
cykloheksan-octan etylu 75:25	Türk 2006 Mutai 2007
eter etylowy-aceton 8:2, 5:5 i 2:8	Garcia Rowe 1999
eter naftowy-chloroform 100:5	Wang 2005
eter naftowy-octan etylu (gradient);	Wang 2005
heksan- metanol 1:1 do 0:1	Lohezic Le Devehat 2007
heksan-aceton o wzrastającej polarności	Honda 2010
heksan-chloroform 1:1	Lohezic Le Devehat 2007 De Carvalho 2000 a
heksan-chloroform o wzrastającej polarności	Santos 2004
heksan-dichlorometan→metanol (gradient)	De Carvalho 2000
heksan-eter dietylowy-kwas mrówkowy 24:8:4	Yilmaz 2004
heksan-eter etylowy 8:2, 5:5 i 2:8,	Garcia Rowe 1999
heksan-octan etylu (gradient)	Nasser 2009
heksan-octan etylu 3:2	Lohezic Le Devehat 2007
toluen- kwas octowy 170:30	Türk 2006
toluen-dioksan-lodowaty kwas octowy 36:9:1,	Yilmaz 2004

5.2.5. Badania ilościowe

Analiza ilościowa atranoryny w różnych gatunkach była prowadzona najczęściej z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC [Maia 2002, Hesbacher 1996, Białońska 2005, Toledo Marante 2003, Nybakken 2010], rzadziej metody densytometrycznej [Be Gora 2000, Be Gora 2001]. Pojedyncze prace opisują zastosowanie metody micelarnej chromatografii kinetycznej [Falk 2008] czy spektrofotometrycznej [Klee 1976]. Zestawienie metod i warunków przeprowadzania analizy ilościowej przedstawia Tabela 15.

Tabela 15. Zestawienie metod i warunków przeprowadzania analizy ilościowej atranoryny

metoda	warunki analizy	cytowanie
micelarna chromatografia elektrokinetyczna	kapilara: bare-fused, $\varnothing=50\ \mu\text{m}$ i.d., l=32.5 cm (24 cm do detektora) napięcie +10kV, natężenie ~30 mA detekcja: $\lambda=214\ \text{nm}$	Falk 2008
HPLC	kolumna: C ₁₈ (250x4.6 mm, 10 μm) MP: metanol-woda-kwas octowy 80:19.5:0.5 detekcja: $\lambda=254\ \text{nm}$.	Maia 2002
HPLC	kolumna: C18 (125x4 mm) MP: mieszanina 50% metanolu i 50% wody (doprowadzonej do pH 2 za pomocą kwasu o-fosforowego) w liniowym gradiencie od 100% mieszaniny do 100% metanolu przez 15 minut, a następnie w warunkach izokratycznych przez 5 minut	Hesbacher 1996
HPLC	kolumna: ODS (4.6x250 mm) MP: mieszanina 1% wodnego roztworu kwasu fosforowego i metanolu w gradiencie od 75 do 100% metanolu w ciągu 15 min detekcja: $\lambda=254\ \text{nm}$.	Białońska 2005
HPLC	kolumna: C18 MP: kwas octowy-woda-metanol 0.4:19.6:80.0 i 0.8:39.2:60.0 temperatura: 25°C detekcja: $\lambda=254\ \text{nm}$ (uv detektor)	Toledo Marante 2003
HPLC	kolumna: ODS (60x4.6 mm) MP: mieszanina 0.25% roztworu kwasu ortofosforowego i 1.5% tetrahydrofuranu w wodzie (A) oraz 100% metanolu (B), w gradiencie początkowo 30% B, po 15 minutach wzrost do 70% B i w kolejnych 15 minutach do 100% B, następnie izokratycznie 100% B przez 5 minut temperatura: 25°C detekcja: $\lambda=245\ \text{nm}$ (diode array)	Nybakken 2006 Nybakken 2010
spektrofotometryczna	UV=250 nm	Klee 1976
densytometryczna	SP: żel krzemionkowy 60 F ₂₅₄ MP: toluen-octan etylu-kwas mrówkowy 139:83:8; toluen-kwas octowy 100:15 detekcja: $\lambda=365\ \text{nm}$	Be Gora 2000, Be Gora 2001

SP – faza stacjonarna; MP – faza ruchoma

Zawartość atranoryny w poszczególnych gatunkach jest trudna do porównania, ze względu na podawanie ilości tego związku w różnych jednostkach. Można jednak przyjąć, że zawartość ta mieściła się w przedziale od 0.0058% w *Tephromela altra* [Hesbacher 1996] do 3.6% w *Pseudevernia furfuracea* [Klee 1976]. W obrębie zbadanych gatunków z rodzaju *Cladonia*

donia zawartość atranoryny mieściła się w granicach od 0.13% do 0.40% w *Cladonia rangiferina* [Falk 2008, Nybakken 2010], natomiast nie zidentyfikowano atranoryny w *Cladonia arbuscula* i *Cladonia stellaris* [Falk 2008]. Zestawienie zawartości atranoryny w różnych gatunkach przedstawia Tabela 16.

Tabela 16. Zestawienie zawartości atranoryny w różnych gatunkach

GATUNEK	IŁOŚĆ	CYTOWANIE
<i>Cetraria glauca</i>	1.1%	Klee 1976
<i>Cladonia dendroides</i>	55.5 – 72.4% wyciągu	Maia 2002
<i>Cladonia stellaris</i>	nd	Falk 2008
<i>Cladonia arbuscula</i>	nd	Falk 2008
<i>Cladonia rangiferina</i>	1.27±0.42 mg/g 3.98±0.75 mg/g 30 – 43 mg/ml wyciągu	Falk 2008 Nybakken 2010 Be Gora 2001
<i>Evernia prunastri</i>	7.59±0.48 mg/g	Nybakken 2010
<i>Flavocetraria nivalis</i>	nd	Falk 2008
<i>Flavocetraria cuculata</i>	nd	Falk 2008
<i>Hypogymnia physodes</i>	1.7 – 3.1% 1.4%	Białońska 2005 Klee 1976
<i>Lethariella canariensis</i>	6.35 – 50.62% wyciągu	Toledo Marante 2003
<i>Parmelia saxatilis</i>	2.14±0.33 mg/g	Nybakken 2010
<i>Platismatia glauca</i>	2.62±0.24 mg/g	Nybakken 2010
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	3.6%	Klee 1976
<i>Stereocaulon sp.</i>	4.84±1.11 mg/g	Falk 2008
<i>Tephromela altra</i>	0.58±0.20 – 4.16±0.77 µg/mg	Hesbacher 1996
<i>Umbilicaria spodochoa</i>	5.85±0.47 mg/g	Nybakken 2010

nd –nie wykrywalny

5.2.6. Wpływ czynników na zawartość atranoryny

W kilku pracach opisano wpływ różnych czynników na zawartość atranoryny w porostach. Badania te prowadzono zarówno w warunkach in vitro [Be Gora 2000, Be Gora 2001, Nybakken 2006], jak i w środowisku naturalnym [Hesbacher 1996, Toledo Marante 2003, Białońska 2005], w zależności od określanego czynnika. W warunkach laboratoryjnych materiał roślinny poddawano naświetlaniu światłem UV o różnej intensywności [Be Gora 2000, Be Gora 2001]. Określano także optymalną porę i miejsce zbioru porostów w celu pozyskania materiału o największej zawartości atranoryny [Hesbacher 1996, Toledo Marante 2003], a w jednej z prac porównano również wpływ stopnia zanieczyszczenia środowiska na obecność badanego związku w materiale roślinnym [Be Gora 2001]. Jedna praca dotyczy próby określenia optymalnego rozpuszczalnika do ekstrakcji atranoryny z materiału roślinnego [Maia 2002]. Ciekawe badania przeprowadzono w Szwecji, porównując zawartość atranoryny w częściach rośliny różniących się wiekiem [Hesbacher 1996].

a) wpływ promieniowania UV

Be Gora i Fahlset badali fotostabilność atranoryny pod wpływem światła UV metodą densytometryczną. Materiał roślinny (*Cladonia rangiferina*) ekstrahowano acetonem, uzyskane

wyciągi nanoszono na płytki chromatograficzne pokryte żelom krzemionkowym ze znacznikiem fluorescencyjnym 60 F-254. Płytki rozwijano w fazie ruchomej toluen-octan etylu-kwas mrówkowy 139:83:8, poddawano naświetlaniu promieniami UV A/B, a następnie analizowano densytometrycznie przy długości fali 365 nm (warunki - Tabela 15). Odczyty prowadzono po 5, 10, 15, 20, 25 i 30 minutach. Zaobserwowano, że atranoryna osiągała fotostabilność już po upływie 5 minut. Wynik ten należy uwzględniać przy analizie densytometrycznej chcąc uzyskać wiarygodne wyniki ilościowe [Be Gora 2000].

Ta sama grupa autorów badała ilościowo wpływ naświetlania promieniami UV A i B na zawartość atranoryny w plechach *Cladonia rangiferina*. Wyciągi i warunki analizy densytometrycznej jak powyżej, faza ruchoma toluen-dioksan-kwas octowy 90:22.5:2.5. Zaobserwowano wyraźny wzrost ilości atranoryny w próbkach poddanych działaniu promieniowania UV-A o niskiej i wysokiej intensywności, połączonemu ze światłem widzialnym, podczas gdy próbki poddane promieniowaniu UV-B oraz łącznie UV-A i B nie różniły się istotnie od kontroli zawartością atranoryny [Be Gora 2001].

Nybakken i wsp. określali wpływ naświetlania promieniowaniem UV na stymulację syntezy atranoryny w *Cladonia arbuscula*, *C. rangiferina* i *C. stellaris* w warunkach laboratoryjnych. Plechy poddawano przez 4 tygodnie naświetlaniu światłem widzialnym (warunki kontrolne) przez 18 h dziennie, bądź światłem widzialnym i dodatkowo UV-B przez 3 h 15 min. Po zakończeniu eksperymentu materiał roślinny wysuszone i poddano ekstrakcji acetonem. Wyciągi analizowano pod kątem zawartości atranoryny metodą HPLC (warunki - Tabela 15). W żadnym z badanych gatunków poddanych działaniu UV-B nie zaobserwowano statystycznie istotnego wzrostu ilości atranoryny w odniesieniu do warunków kontrolnych [Nybakken 2006].

b) wpływ lokalizacji i pory zbioru

Hesbacher i wsp. określali zawartość atranoryny w plechach *Tephromela alra*, zebranych na szwedzkiej wyspie na Bałtyku, porównując ilość tego metabolitu w próbkach pobranych z 8 różnych lokalizacji. Wszystkie stanowiska były niezacienione, próbki były pobierane ze skał, na których ten gatunek występuje. Zmielony materiał roślinny ekstrahowano acetonem w temperaturze pokojowej. Analizę ilościową przeprowadzano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC (warunki - Tabela 15). W próbkach z różnych lokalizacji zawartość atranoryny wahała się w zakresie od 0.58 ± 0.20 do 4.16 ± 0.77 $\mu\text{g}/\text{mg}$ suchej masy surowca [Hesbacher 1996].

Zawartość atranoryny w plechach *Lethariella canarensis*, zebranych latem i zimą, była określona metodą HPLC w badaniach Toledo-Marante i wsp. Zaobserwowano prawie dziesięciokrotnie więcej atranoryny w próbkach zebranych latem (50.62% w ekstrakcie) w porównaniu do zbioru zimowego (6.35% w ekstrakcie) [Toledo Marante 2003].

Białońska i Dayan określali wpływ akumulacji metali ciężkich na ilość wtórnych metabolitów w plechach *Hypogymnia physodes*, zbieranych w czterech lokalizacjach, różniących się stopniem zanieczyszczenia środowiska. Materiał roślinny ekstrahowano trzykrotnie po 15 minut 100% etanolem, z wykorzystaniem ultradźwięków. Analizę prowadzono metodą HPLC (warunki - Tabela 15). Zaobserwowano względną zawartość atranoryny w porostach z badanych lokalizacji w zakresie 1.7-3.1%. Ilość związku wzrastała o 16-36% w materiale roślinnym

pobranym z lokalizacji o dużym zanieczyszczeniu ołowiem, cynkiem i kadmem, natomiast zmniejszała się w obecności chromu [Białońska 2005].

c) warunki ekstrakcji

Maia i wsp. określali zawartość atranoryny w *Cladina dendroides* metodą wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej z odwróconą fazą (warunki - Tabela 15). Materiał roślinny macerowano w eterze dietylowym a następnie ekstrahowano kolejno chloroformem oraz acetonem. Największą zawartość tego związku zaobserwowano dla wyciągu eterowego (72.4%) i chloroformowego (72.2%), najmniejszą dla wyciągu acetonowego (55.5%) [Maia 2002].

d) wiek rośliny

Hesbacher i wsp. określali zawartość atranoryny w plechach *Tephromela alra*, zebranych na szwedzkiej wyspie na Bałtyku, porównując ilość tego metabolitu w tkankach starych, z rozwiniętymi apotecjami, oraz młodych, na których nie wykształciły się jeszcze apotecja. Zmielony materiał roślinny ekstrahowano acetonem w temperaturze pokojowej. Analizę ilościową przeprowadzano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC (warunki - Tabela 15). Nie zaobserwowano istotnych różnic w zawartości atranoryny pomiędzy tkankami starymi i młodymi [Hesbacher 1996].

5.2.7. Aktywność biologiczna i farmakologiczna

5.2.7.1. Aktywność przeciwbakteryjna

Aktywność przeciwbakteryjną atranoryny zbadano w warunkach *in vitro* wobec szeregu szczepów bakterii zarówno Gram dodatnich (*Bacillus*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*), jak i Gram ujemnych (*Aeromonas*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*). Zestawienie aktywności przeciwbakteryjnej atranoryny przedstawia Tabela 17.

Atranoryna wykazała zróżnicowaną, od słabej po umiarkowaną, aktywność przeciwbakteryjną wobec zarówno Gram dodatnich, jak i Gram ujemnych szczepów. Wobec niektórych szczepów aktywność ta była niekiedy różna, lub wręcz przeciwna. Szczególnie widoczne jest to w przypadku *Bacillus subtilis*, w mniejszym stopniu *Mycobacterium tuberculosis* i *Staphylococcus aureus*, gdzie według niektórych autorów badany związek jest nieaktywny [Perry 1999, König 1999, Piovano 2002], posiada aktywność słabą [Honda 2010, Yilmaz 2004, Toledo Marante 2003] lub wysoką [Yilmaz 2004].

Tabela 17. Aktywność przeciwbakteryjna atranoryny

SZCZEP	AKTYWNOŚĆ	CYTOWANIE
<i>Aeromonas hydrophila</i>	MIC 31.2 µg	Yilmaz 2004
<i>Bacillus cereus</i>	MIC 31.2 µg	Yilmaz 2004
<i>Bacillus megaterium</i>	na	König 1999
<i>Bacillus subtilis</i>	na MIC 15.6 µg	Perry 1999 Yilmaz 2004
<i>Escherichia coli</i>	na na	König 1999 Piovano 2002
<i>Listeria monocytogenes</i>	MIC 15.6 µg	Yilmaz 2004
<i>Mycobacterium aurum</i>	MIC 250 µg/ml	Ingolfssdottir 1998
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MIC 250 µg/ml na	Honda 2010 König 1999
<i>Proteus vulgaris</i>	MIC 62.5 µg	Yilmaz 2004
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	na	Piovano 2002
<i>Salmonella</i> sp.	na	Piovano 2002
<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC 500 µg MIC 512 µg/ml na	Yilmaz 2004 Toledo Marante 2003 Piovano 2002
<i>Streptococcus faecalis</i>	MIC 250 µg	Yilmaz 2004

MIC – minimalne stężenie hamujące; IZ – strefa zahamowania; na – nieaktywny

5.2.7.2. Aktywność przeciwgrzybicza

Aktywność przeciwgrzybiczą atranoryny zbadano wobec szeregu szczepów, będących zarówno patogenami ludzkimi (*Candida* i in.) jak i roślinnymi (*Ustilago*, *Phytophthora*, *Pythium* i in.), a także wobec gatunków niepatogennych (*Saccharomyces* i in.). Badany związek w większości opisanych przypadków charakteryzowały się brakiem aktywności przeciwgrzybiczej. Jedynie wobec szczepów *Candida* atranoryna wykazała bardzo słabą aktywność, wartość MIC wynosiła 500 µg, zarówno dla *C. albicans*, jak i *C. glabrata* [Yilmaz 2004], choć w badaniach Wang i wsp. aktywność ta była wysoka (MIC 2 µg) [Wang 2005]. Dodatkowo, König i wsp. opisali bardzo słabą aktywność atranoryny wobec *Eurotium repens*. W tym przypadku badany związek powodował 1 mm strefę zahamowania wzrostu w stężeniu 50 µg [König 1999]. Zestawienie aktywności przeciwgrzybiczej atranoryny przedstawia Tabela 18.

Tabela 18. Aktywność przeciwgrzybicza atranoryny

SZCZEP	AKTYWNOŚĆ	CYTOWANIE
<i>Aspergillus flavus</i>	na	Piovano 2002
<i>Aspergillus niger</i>	na	Piovano 2002
<i>Candida albicans</i>	na MIC 500 µg MID 2 µg na	Perry 1999 Yilmaz 2004 Wang 2005 Piovano 2002
<i>Candida glabrata</i>	MIC 500 µg	Yilmaz 2004
<i>Cryptococcus neoformans</i>	na	Piovano 2002
<i>Epidermophyton floccosum</i>	na	Piovano 2002
<i>Eurotium repens</i>	IZ 1 mm (50 µg)	König 1999

<i>Fusarium oxysporum</i>	na	König 1999
<i>Microsporum canis</i>	na	Piovano 2002
<i>Microsporum gypseum</i>	na	Piovano 2002
<i>Mycotypha microspora</i>	na	König 1999
<i>Phytium ultimum</i>	na	Halama 2004
<i>Phytophthora infestans</i>	na	Halama 2004
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	na	Piovano 2002
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	na na	Perry 1999 Piovano 2002
<i>Trichophyton rubrum</i>	na	Piovano 2002
<i>Ustilago maydis</i>	na	Halama 2004
<i>Ustilago violacea</i>	na	König 1999

MIC – minimalne stężenie hamujące; IZ – strefa zahamowania; na – nieaktywny

5.2.7.3. Aktywność przeciwwirusowa

Nieliczne prace dotyczą badań nad aktywnością przeciwwirusową atranoryny. Perry i wsp. wykazali brak aktywności przeciwwirusowej atranoryny w stężeniu 60 µg/ml wobec wirusów opryszczki (HSV) i polio (PSV1) in vitro [Perry 1999]. W badaniach nad wpływem atranoryny na enzymy wirusowe stwierdzono, że związek ten posiadał umiarkowaną aktywność hamującą integrasę wirusa HIV-1, wartość IC₅₀ wynosiła 61 µM [Neamati 1997], natomiast nie hamował aktywności odwrotnej transkryptazy tego wirusa [König 1999].

5.2.7.4. Aktywność fitotoksyczna

Wpływ atranoryny na komórki innych roślin, jak również na procesy zachodzące w roślinach, opisują zaledwie dwie prace. Bouaid i Vincente określali wpływ atranoryny na degradację chlorofilu in vitro w liściach *Quercus rotundifolia*. Zaobserwowano, że atranoryna łatwo przenika przez błony chloroplastów, powodując degradację chlorofilu a i b. Zjawisko to może mieć znaczenie w przypadku porostów epifitycznych, występujących na korze drzew i mogących w ten sposób wpływać niekorzystnie na liście [Bouaid 1998]. Natomiast w badaniach König i wsp. atranoryna w stężeniu 50 µg/ml nie wykazała aktywności fitotoksycznej wobec komórek glonów *Chlorella fusca* [König 1999].

5.2.7.5. Działanie jako deterent pokarmowy

Nybakken i wsp. badali rolę atranoryny jako potencjalnego deterentu pokarmowego. Plechy *Cladonia rangiferina*, *Evernia prunastri*, *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca* i *Umbilicaria spodochoa* podawano jako paszę normicom. Plechy porostów, poddane lub nie poddane wcześniejszej maceracji w acetonie w celu wymycia części substancji porostowych, podawano zwierzętom w formie nierozdrobnionej lub zmielonej. Uzyskane wyciągi acetonowe analizowano jakościowo i ilościowo pod kątem obecności i zawartości atranoryny. Nie zaobserwowano istotnych różnic w wybieraniu przez normice pokarmu o zmniejszonej zawartości związków porostowych, co świadczy o braku działania atranoryny jako deterentu pokarmowego [Nybakken 2010].

5.2.7.6. Aktywność antyoksydacyjna

Ze względu na przynależność do grupy związków polifenolowych atranoryna była badana pod kątem potencjalnych własności antyoksydacyjnych. W dwóch badaniach, opartych na teście DPPH, atranoryna nie wykazała własności wymiatających wolne rodniki [Kumar 1999, Millot 2008]. W innym doniesieniu, związek ten charakteryzował się umiarkowaną aktywnością antyoksydacyjną w stężeniu 100 i 250 μM , powodując 57% zahamowanie peroksydacji lipidów w homogenacie mózgu szczura [Toledo Marante 2003]. W badaniu przeprowadzonym przez Kumara i Müllera atranoryna nie wykazywała własności prooksydacyjnych w badaniach na modelowych błonach fosfolipidowych w stężeniach do 200 μM [Kumar 1999].

5.2.7.7. Aktywność immunomodulująca

Wpływ atranoryny na komórki układu odpornościowego został określony w badaniach *in vitro*, na makrofagach izolowanych z myszy. Zaobserwowano bardzo słabą aktywność atranoryny, w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$, stymulującą uwalnianie nadtlenu wodoru i tlenu azotu przez te komórki. Efekt ten świadczy o słabej aktywności immunostymulującej atranoryny w warunkach *in vitro* [Santos 2004].

5.2.7.8. Aktywność fotohemolityczna i fotoprotekcyjna

W badaniach Hidalgo i wsp. określano aktywność hemolityczną i fotohemolityczną atranoryny, jak również związków o podobnej strukturze ale zawierających atomy chloru – pannaryny i 1'-chloropannaryny. Atranoryna w stężeniu 12.5 μM powodowała znikomą, około 5%, hemolizę erytrocytów, która nie zwiększała się wraz z wydłużaniem czasu inkubacji do 200 minut, natomiast pozostałe dwa związki powodowały hemolizę w stopniu znacząco większym. Najbardziej aktywnym związkiem była 1'-chloropannaryna. Po naświetlaniu związków światłem UV 366 nm aktywność hemolityczna atranoryny zmniejszyła się do około 2%, natomiast aktywność pozostałych dwóch związków wzrosła znacząco [Hidalgo 1993].

Fernandez i wsp. opisali aktywność fotoprotekcyjną atranoryny, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i w badaniach na zwierzętach. Atranoryna w stężeniu 10 mM hamowała wiązanie się 8-metoksypsoralenu, związku o znanej aktywności fotouczulającej, z ludzką albuminą o 20%, co sugeruje jej potencjalne zastosowanie jako ochrony przed nadmiernym promieniowaniem UV A [Fernandez 1998].

W badaniach przeprowadzonych na świnkach morskich, którym fragment ogolonej skóry poddawano działaniu promieniowania UV B, wykazano wysoką aktywność fotoprotekcyjną atranoryny podawanej w ilości 2 mg/cm^2 skóry – wyliczona wartość czynnika SPF wynosiła 6.0 ± 0.15 , podczas gdy standardowy związek wykazał $\text{SPF} = 4.3 \pm 0.20$. Ponadto zaobserwowano słabą aktywność atranoryny zapobiegającą przegrzaniu się naświetlanego fragmentu skóry – różnice pomiędzy temperaturą skóry w grupie zwierząt poddanych traktowaniu atranoryną i grupie kontrolnej mieściły się w granicach $0.85 - 1.33^\circ\text{C}$ dla czasu naświetlania 20-50 minut [Fernandez 1996].

5.2.7.9. Aktywność przeciwzapalna i przeciwbólowa

Aktywność przeciwbólową i przeciwzapalną atranoryny zbadano w warunkach *in vitro*, określając wpływ tego związku na mediatory stanu zapalnego: cyklooksygenazę 1 i 2 oraz leukotrien B₄ [Bugni 2009, Kumar 1999]. W badaniach na zwierzętach aktywność przeciwbólowa atranoryny, określona za pomocą standardowych testów przeciągania i obrzęku łapy, była porównywalna lub większa od kwasu acetylosalicylowego [Maia 2002, Melo 2008].

Atranoryna posiadała aktywność hamującą cyklooksygenazę 1 i 2, w warunkach *in vitro*. Przy stężeniu 45 μM atranoryna hamowała COX-1 w około 50%, a COX-2 w około 40%, w sposób proporcjonalny do wzrastającego stężenia. Substancja referencyjna (kwas acetylosalicylowy) w stężeniu 50 μM hamowała COX-1 w 59% a COX-2 w 42%, zatem aktywność atranoryny była porównywalna. Autorzy wskazują na wykorzystanie tego gatunku porostu w tradycyjnej medycynie Papui Nowej Gwinei jako środka o działaniu przeciwbólowym, które może być zdeterminowane obecnością atranoryny [Bugni 2009]. Kumar i Müller badali wpływ atranoryny na biosyntezę leukotrienu B₄ (LTB₄) z wielojądrzastych leukocytów *in vitro*. Związek ten wykazał silny wpływ hamujący na biosyntezę LTB₄, wartość IC₅₀ wynosiła $6 \pm 0.4 \mu\text{M}$, podczas gdy wartość ta dla substancji referencyjnych wynosiła $0.4 \pm 0.21 \mu\text{M}$ (kwas nordihydrogwaretynowy) oraz $37 \pm 4.6 \mu\text{M}$ (antralina) [Kumar 1999].

W badaniach na myszach stwierdzono znaczącą aktywność przeciwbólową atranoryny. Myszom podawano dootrzewnowo 1% roztwór kwasu octowego, w dawce 10 ml/kg masy ciała, oraz w ten sam sposób atranorynę, w ilości 25 mg/kg masy ciała. Jako substancję referencyjną zastosowano aspirynę (50 mg/kg, *i.p.*). W teście przeciągania atranoryna wykazała silną aktywność zmniejszającą wrażliwość na ból, lepszą niż substancja referencyjna, powodując zahamowanie przeciągania się myszy o 87%. Dodatkowo atranoryna nie powodowała efektu toksycznego w dawce do 500 mg/kg masy ciała [Maia 2002]. Podobne badanie, z zastosowaniem tego samego testu, przeprowadziła Melo i wsp., podając myszom doustnie atranorynę w dawkach 100, 200 i 400 mg/kg masy ciała. Kwas octowy o stężeniu 0.85% był podawany dootrzewnowo w ilości 10 ml, substancję referencyjną (kwas acetylosalicylowy) podawano doustnie w dawce 200 mg/kg masy ciała. Atranoryna hamowała przeciąganie się myszy o 13.4%, 52.6% i 61.3% w dawce odpowiednio 100, 200 i 400 mg/kg, kwas acetylosalicylowy hamował o 69.9%. W kolejnym etapie eksperymentu, zwierzętom podawano podskórnie 20 μl 1% roztworu formaliny do prawej tylnej łapy. Atranoryna, jak również substancja referencyjna, w dawkach identycznych jak w teście przeciągania, były podawane doustnie na 30 minut przed podaniem formaliny. Efekt był mierzony po 5 (1 faza) i 15-30 (druga faza) minutach od wstrzyknięcia formaliny. Atranoryna w pierwszej fazie okazała się być słabo aktywna, natomiast w drugiej fazie znacząco hamowała odpowiedź bólową o 40.5%, 50.3% i 64.8% w dawce odpowiednio 100, 200 i 400 mg/kg masy ciała. Aktywność hamująca kwasu acetylosalicylowego w drugiej fazie wynosiła 69.9% [Melo 2008].

5.2.7.10. Wpływ na mięśnie gładkie

Badania nad wpływem atranoryny na mięśnie gładkie przeprowadzone zostały w warunkach *in vitro*, na izolowanych mięśniach aorty szczura oraz wzdłużnych mięśniach jelita krętego świnki morskiej. Atranoryna słabo zmniejszała skurcze mięśni aorty wywołane fenyle-

fryną, natomiast nie wpływała na skurcze pojawiające się pod wpływem chlorku potasu. W przypadku mięśni jelita krętego badany związek powodował znaczne zmniejszenie odpowiedzi fazowej, w przeciwieństwie do tonicznej, mięśni pod wpływem chlorku potasu, a także wyrażnie obniżał skurcze wywołane acetylocholiną. Sugeruje to aktywność relaksującą atranoryny związaną z hamowaniem napływu jonów wapnia przez kanały wapniowe, zlokalizowane w błonach komórkowych mięśni gładkich [Mustafa 1995].

5.2.8. Aktywność cytotoksyczna

Aktywność cytotoksyczna atranoryny, przebadana wobec kilku nowotworowych i prawidłowych linii zwierzęcych i ludzkich, w większości przypadków nie została zaobserwowana [Perry 1999, Kumar 1999 a, Kristmundsdottir 2005]. Jedynie wobec dwóch ludzkich linii białaczkowych HL-60 i U937, oraz wobec hepatocytów szczurzych atranoryna wykazała słabą aktywność cytotoksyczną, gdzie wartości IC_{50} oscylowały wokół 100 $\mu\text{g/ml}$ lub μM [Toledo Marante 2005, Correche 2004]. Zestawienie aktywności cytotoksycznej atranoryny przedstawia Tabela 19.

Zaledwie dwa doniesienia dotyczą próby określenia mechanizmu działania cytotoksycznego atranoryny [Correche 2004, Bačkorova 2010]. W obydwu przypadkach wykazano wpływ atranoryny na stymulację procesu apoptozy zarówno ludzkich w komórkach nowotworowych [Bačkorova 2010], jak i prawidłowych szczurzych hepatocytach [Correche 2004].

Correche i wsp. określali wpływ atranoryny na stymulację aktywności kaspazy 3, enzymu pojawiającego się we wczesnych stadiach apoptozy, metodą DTT w szczurzych hepatocytach. Badany związek wywoływał apoptozę komórek, powodując umiarkowany wzrost aktywności kaspazy 3 o 109% w stosunku do komórek kontrolnych, oraz zwiększenie ilości komórek z jądrami apoptotycznymi o 192.4% w stosunku do komórek kontrolnych. Wartość obliczonego potencjału apoptotycznego (API) wynosiła odpowiednio 2.18 i 3.85 [Correche 2004].

Bačkorova i wsp. opisali zróżnicowaną odpowiedź ludzkich komórek (nowotwory jajnika A2780, jelita grubego HCT-116 p53^{+/+} i ^{-/-}, białaczka HL-60) na działanie proapoptotyczne atranoryny. Atranoryna w dawce 100 i 200 μM powodowała zatrzymanie komórek w fazie S, w sposób zależny od czasu inkubacji (48, 72 h), przy czym wyraźniejszą odpowiedź zaobserwowano w przypadku komórek nowotworu jajnika oraz białaczki. Linia białaczkowa była również najbardziej podatna na proapoptotyczne działanie atranoryny. Efekt ten został potwierdzony ponadto w analizie morfologii jąder komórkowych, barwionych metodą DAPI [Bačkorova 2010].

Tabela 19. Aktywność cytotoksyczna atranoryny

LINIA	METODA	AKTYWNOŚĆ	CYTOWANIE
A2780	MTT	IC ₅₀ 197.9±12.0 µM	Bačkorova 2010
BSC-1	-	<i>na</i>	Perry 1999
HaCaT	liczenie pod mikroskopem	<i>na</i>	Kumar 1999 a
HCT-116 p53-/-	MTT	IC ₅₀ 197.5±3.4 µM	Bačkorova 2010
HCT-116 p53+/+	MTT	IC ₅₀ >200 µM	Bačkorova 2010
HeLa	MTT	IC ₅₀ >200 µM	Bačkorova 2010
hepatocyty szczurze	LDH	IC ₅₀ 111 µg/ml (8h), 82 µg/ml (24h)	Correche 2004
HL-60	MTT	IC ₅₀ 83.4±6.7 µM	Toledo Marante 2003
HL-60	MTT	IC ₅₀ 93.5±3.8 µM	Bačkorova 2010
HT-29	MTT	IC ₅₀ >200 µM	Bačkorova 2010
Jurkat	MTT	IC ₅₀ 181.6±4.4 µM	Bačkorova 2010
KB	?	<i>na</i>	König 1999
MCF-7	MTT	IC ₅₀ >200 µM	Bačkorova 2010
P388	MTT	<i>na</i>	Perry 1999
SK-BR-3	MTT	IC ₅₀ >200 µM	Bačkorova 2010
T47D	test ze znakowaną tymidyną	<i>na</i>	Kristmundsdottir 2005
U937	MTT	IC ₅₀ >100 µM	Toledo Marante 2003

linie zwierzęce: białaczka P388

linie ludzkie: białaczka (HL60, U937, Jurkat), nowotwór krtani KB, nowotwór piersi (T47D, MCF-7, SK-BR-3), nowotwór jajnika A2780, nowotwór jelita grubego (HT-29, HCT-116 p53-/- i p53+/+)

linie prawidłowe: hepatocyty szczurze, komórki nerki małpy BS-C-1, ludzkie keratynocyty HaCaT

MTT – test redukcji soli tetrazoliowych, LDH - test z dehydrogenazą mleczanową

na - nieaktywny

5.2.9. Wywoływanie alergii kontaktowej

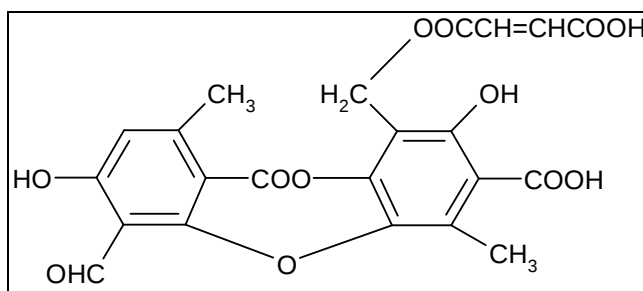
Stinchi i wsp. opisuje 12 przypadków alergii kontaktowej na porosty. Po wykonaniu testów, sześciu pacjentów wykazało pozytywną reakcję na atranorynę. Wśród tych pacjentów trzy osoby miały kontakt z drzewami leśnymi i roślinami (farmer, dwóch ogrodników), a u trzech kolejnych, przy braku kontaktu z roślinami, uczulenie pochodziło od stosowanych kosmetyków, zawierających substancje porostowe, w tym atranorynę [Stinchi 1997].

5.3. Kwas fumaroprotocetrarowy

Kwas fumaroprotocetrarowy został wyizolowany po raz pierwszy przez Hessego w roku 1904 [Su 2003]. Jest słabo zbadanym metabolitem, mimo jego częstej obecności w niektórych gatunkach porostów, w ilościach dochodzących nawet do kilkunastu procent suchej masy, oraz stosunkowo prostej izolacji z materiału roślinnego. Nieliczne doniesienia na temat jego aktywności biologicznej i farmakologicznej sugerują, że związek ten w większości przypadków wykazuje słabe działanie lub jest nieaktywny.

5.3.1. Własności fizykochemiczne

Kwas fumaroprotocetrarowy – pochodna β -orcynolu: wodorofumaran ((7- karboksy-4-formylo-3,8-dihydroksy-1,6-dimetylo-11-okso-11H-dibenzo(b,e)(1,4)dioksepin-9ylo) metylu), o wzorze sumarycznym $C_{22}H_{16}O_{12}$; syn. Kwas fimbriatowy [Culberson 1979]. Bezpostaciowa, bezbarwna substancja o temperaturze topnienia $250-260^{\circ}\text{C}$ [Culberson 1979]. Wzór strukturalny kwasu fumaroprotocetrarowego przedstawia Rycina 11.



Rycina 11. Wzór strukturalny kwasu fumaroprotocetrarowego

Związek ten dobrze rozpuszcza się w acetonie, słabiej w metanolu [Pereira 1994], słabo w eterze dietylowym, bardzo słabo w chloroformie [Maia 2002] i w wodzie [Archer 1981]. Do celów badania aktywności biologicznej i farmakologicznej *in vitro* niektórzy autorzy wskazują na 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstrynę jako optymalny rozpuszczalnik [Kristmundsdottir 2005].

W obrazie widma $^1\text{H-NMR}$ kwasu fumaroprotocetrarowego widać charakterystyczne sygnały przy δ_{H} 2.44 i 2.46 ppm, odpowiadające grupom metylowym w pozycji 8 i 8'. Ponadto widoczne są dwa sygnały dla protonów aromatycznych w pozycjach 2' i 3' przy δ_{H} 6.65 i 6.85 ppm, sygnał dla protonu grupy aldehydowej przy δ_{H} 10.58 ppm oraz dla protonu grupy karboksylowej przy δ_{H} 12.50 ppm [Su 2003]. W obrazie widma $^{13}\text{C-NMR}$ sygnały przy 21.11 i 14.50 ppm wskazują na grupy metylowe odpowiednio w pozycji 8 i 8', natomiast przy 191.45 ppm na grupę aldehydową [Su 2003].

5.3.2. Rozpowszechnienie w porostach

Kwas fumaroprotocetrarowy rozpowszechniony jest wyłącznie w porostach. Jednak Zain wykazał, że niektóre gatunki *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*) mogą syntezować in vitro kwas fumaroprotocetrarowy pod wpływem dodatku do pożywki oliwy z oliwek [Zain 2009]. Kwas fumaroprotocetrarowy występuje najczęściej w rodzajach *Cladonia*, *Cetraria*, *Parmelia* a także *Usnea*.

W warunkach in vitro opisano syntezę kwasu fumaroprotocetrarowego przez unieruchomione komórki *Cladonia verticillaris*, z wykorzystaniem dodawanego do podłoża hodowlanego mononukleotydu flawinowego (FMN) i octanu [Fontaniella 2000].

Zestawienie rodzajów porostowych, w których opisano występowanie kwasu fumaroprotocetrarowego przedstawia Tabela 20.

Tabela 20. Rozpowszechnienie kwasu fumaroprotocetrarowego w porostach

RODZINA	RODZAJ	CYTOWANIE
<i>Cladoniaceae</i>	<i>Cladonia</i>	Culberson 1979 Ranković 2008 Yilmaz 2004 Santos 2004 Su 2003 Archer 1981 Maia 2002 Nybakken 2010 Piercey-Normore 2007 Spier 2007
<i>Lecideaceae</i>	<i>Lecidea</i>	Culberson 1979
<i>Stereocaulaceae</i>	<i>Stereocaulon</i>	Culberson 1979 Kristmundsdottir 2005
<i>Lecanoraceae</i>	<i>Lecanora</i>	Culberson 1979
<i>Parmeliaceae</i>	<i>Cetraria</i>	Culberson 1979 Gudjonsdottir 1997 Freysdottir 2008
	<i>Parmelia</i>	Culberson 1979 Krivoshchekova 1983 Syers 1969
	<i>Platismatia</i>	Culberson 1979
<i>Usneaceae</i>	<i>Alectoria</i>	Culberson 1979
	<i>Usnea</i>	Culberson 1979 Lohezic Le Devehat 2007
<i>Physciaceae</i>	<i>Rinodina</i>	Culberson 1979
<i>Rocellaceae</i>	<i>Dendrographa</i>	Culberson 1979

5.3.3. Warunki ekstrakcji, izolacji i identyfikacji

W celu uzyskania kwasu fumaroprotocetrarowego wykorzystywano jako źródła porosty z różnych gatunków, w postaci sproszkowanej [Yilmaz 2004, Lohezic Le Devehat 2007, Su

2003, Bezivin 2004] lub tylko rozdrobnionej [Ranković 2008, Santos 2004, Krivoshchekova 1983, Pereira 1994]. Materiał roślinny ekstrahowano najczęściej w aparacie Soxhleta [Ranković 2008, Lohezic Le Devehat 2007, Santos 2004, Krivoshchekova 1983, Bezivin 2004], stosowano również ekstrakcję w temperaturze pokojowej, czasem z jednoczesnym użyciem ultradźwięków w początkowej fazie ekstrakcji [Yilmaz 2004, Su 2003, Pereira 1994, Gertig 1961]. Jako rozpuszczalniki wykorzystywano najczęściej aceton i metanol [Ranković 2008, Su 2003, Yilmaz 2004, Gertig 1961]. lub wykorzystywano ekstrakcję rozpuszczalnikami następującymi po sobie: chloroform → aceton, heksan → chloroform, heksan → aceton, eter dietylowy → aceton → metanol, heksan → eter dietylowy → aceton → metanol → woda [Lohezic Le Devehat 2007, Santos 2004, Krivoshchekova 1983, Bezivin 2004, Pereira 1994].

Izolacja kwasu fumaroprotocetrarowego była prowadzona z zastosowaniem chromatografii kolumnowej lub cienkowarstwowej chromatografii preparatywnej, na żelu krzemionkowym zwykłym lub z dodatkiem znacznika fluorescencyjnego [Ranković 2008], w fazach ruchomych zestawionych w Tabeli 22. W pojedynczych przypadkach wykorzystano preparatywną wysokosprawną chromatografię cieczową HPLC [Pereira 1994]. Często badany związek wypadał jako osad podczas ochładzania wyciągów, był wówczas poddawany kilkukrotnej rekrystalizacji w celu oczyszczenia [Ranković 2008, Santos 2004, Su 2003, Krivoshchekova 1983, Bezivin 2004].

Uzyskany związek identyfikowano metodami chromatograficznymi, najczęściej TLC poprzez kochromatografię z substancją referencyjną, rzadziej HPLC, a także pomiarem temperatury topnienia czy metodami spektralnymi – IR, UV, ^1H -, ^{13}C -NMR, MS.

Zestawienie warunków ekstrakcji, izolacji i identyfikacji kwasu fumaroprotocetrarowego przedstawia Tabela 21. Zestawienie faz ruchomych, wykorzystywanych podczas izolacji i identyfikacji kwasu fumaroprotocetrarowego przedstawia Tabela 22.

Tabela 21. Zestawienie warunków ekstrakcji, izolacji i identyfikacji kwasu furmaroprocetrarowego

MATERIAŁ ROŚLINNY	EKSTRAKCJA, ROZPU SZ-CZALNIK	IZOLACJA	IDENTYFI-KACJA	CYTOWA-NIE
<i>Cladonia convoluta</i> sproszkowany	aparatus Soxhletheksan→aceton	osad wypadający podczas ochładzania wyciągu, rekry-stalizacja z acetonu	¹ H-NMR,	Bezivin 2004
<i>Cladonia verticillaris</i>	aparatus Soxhlethchloroform→aceton	osad wypadający podczas ochładzania wyciągu	TLC, HPLC, UV, IR, MS, NMR	Santos 2004
<i>Usnea articulata</i> sproszkowany	aparatus Soxhletheksan→eter diety-lowy→aceton→metanol→woda	CC, pTLC (SP: żel krzemionkowy, MP: heksan- metanol 1:1 do 0:1; toluen-octan etylu-kwas mrów-kowy 139:83:8)	¹ H-NMR, ESIMS, HRE-SIMS	Lohezic Le Devehat 2007
<i>Cladonia foliacea</i> sproszkowany	aceton, temperatura poko-jowa, ultradźwięki	pTLC (żel krzemion-kowy 60 F ₂₅₄ , MP: toluen-dioksan-lodowaty kwas octowy 36:9:1, hek-san-eter dietylowy-kwas mrówkowy 24:8:4)	TLC, tempera-tura topnienia, IR	Yilmaz 2004
<i>Parmelia birulae</i>	aparatus Soxhletheksan→chloroform	osad wypadający podczas ochładzania wyciągu, kry-stalizacja z benzenu	temperatura topnienia, ¹ H-, ¹³ C-NMR, MS	Krivoshche-kova 1983
<i>Cladonia furcata</i>	aparatus Soxhlethmetanol, aceton	pTLC (SP: żel krze-mionkowy zwykły i F ₂₅₄ , MP: toluen-dioksan-kwas octowy 90:25:4), rekry-stalizacja	IC, MS, ¹ H-NMR	Ranković 2008
<i>Cladonia furcata</i> sproszkowany	metanol, temperatura pokojowa	elucja: woda→ ben-zyna lekka→octan etylu, rekry-stalizacja mieszaniną chloro-form-metanol 2:1	temperatura topnienia, TLC, UV, ¹ H-, ¹³ C-NMR, MS-MS	Su 2003
<i>Usnea fasciata</i>	eter dietylowy→aceton→ metanol temperatura poko-jowa	RP-HPLC (SP: RP18, MP: metanol-woda-kwas octowy 80:19:0.5, temperatu-ra 22°C, λ=254 nm)	HPLC	Pereira 1994
<i>Cetraria islandica</i> sproszkowany	aceton, temperatura pokojowa	elucja eterem etylo-wym i acetonem, osad wypadający podczas ochładzania frakcji	-	Gertig 1961

CC – chromatografia kolumnowa; pTLC - preparatywna chromatografia cienkowarstwowa; HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa; SP – faza stacjonarna; MP – faza ruchoma

Tabela 22. Zestawienie faz ruchomych stosowanych podczas izolacji i identyfikacji kwasu fumaroprotocetrarowego

faza ruchoma	cytowanie
heksan- metanol 1:1 do 0:1	Lohezic Le Devehat 2007
toluen-octan etylu-kwas mrówkowy 139:83:8	Lohezic Le Devehat 2007
toluen-dioksan-lodowaty kwas octowy 36:9:1	Yilmaz 2004
heksan-eter dietylowy-kwas mrówkowy 24:8:4	Yilmaz 2004
toluen-dioksan-kwas octowy 90:25:4	Ranković 2008

5.3.4. Badania ilościowe

Analiza ilościowa kwasu fumaroprotocetrarowego w różnych gatunkach była prowadzona wyłącznie z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC [Maia 2002, Gudjonsdottir 1997, Freysdottir 2008, Archer 1981, Nybakken 2010]. Zestawienie metod i warunków przeprowadzania analizy ilościowej przedstawia Tabela 23.

Zawartość kwasu fumaroprotocetrarowego w poszczególnych gatunkach jest trudna do porównania, ze względu na podawanie ilości tego związku w różnych jednostkach. Można jednak przyjąć, że zawartość ta mieściła się w przedziale od 0.11% w *Cladonia merochlorophea* [Archer 1981] do 11.5% w *Cetraria islandica* [Gudjonsdottir 1997]. W obrębie zbadanych gatunków z rodzaju *Cladonia* zawartość kwasu fumaroprotocetrarowego mieściła się w granicach od 0.11% w *Cladonia merochlorophea* do 5.40% w *Cladonia subcervicornis ssp. verticillata* [Archer 1981]. Warto zauważyć, że znaczna większość gatunków, w których określono ilościowo zawartość kwasu fumaroprotocetrarowego, należy do rodzaju *Cladonia*, jedynym wyjątkiem jest *Cetraria islandica*, zawierająca zresztą wyjątkowo dużo badanego związku. Zestawienie zawartości kwasu fumaroprotocetrarowego w różnych gatunkach przedstawia Tabela 24.

Tabela 23. Zestawienie warunków analizy ilościowej kwasu fumaroprotocetrarowego

METODA	WARUNKI ANALIZY	CYTOWANIE
HPLC	kolumna: C ₁₈ (250x4.6 mm, 10 µm) MP: metanol-woda-kwas octowy 80:19.5:0.5 detekcja: λ= 254 nm.	Maia 2002
HPLC RP	kolumna: RP-8 (250x4 mm I.D., 10 µm) MP: 90% roztwór acetonitrylu w wodzie z dodatkiem 1% roztworu 0.03 M kwasu ortofosforowego temperatura: 28° C detekcja: λ=210 nm	Gudjonsdottir 1997 Freysdottir 2008
HPLC RP	kolumna: RP-8 (250x4 mm I.D., 10 µm) MP: metanol-0.05% wodny roztwór kwasu malonowego 4:1 detekcja: λ=255 nm	Archer 1981
HPLC	kolumna: ODS (60x4.6 mm) MP: mieszanina 0.25% roztworu kwasu ortofosforowego i 1.5% tetrahydrofuranu w wodzie (A) oraz 100% metanolu (B), w gradiencie początkowo 30% B, po 15 minutach wzrost do 70% B i w kolejnych 15 minutach do 100% B, następnie izokratycznie 100% B przez 5 minut temperatura: 25°C detekcja: λ=245 nm (diode array)	Nybakken 2006 Nybakken 2010

SP – faza stacjonarna; MP – faza ruchoma

Tabela 24. Zestawienie zawartości kwasu fumaroprotocetrarowego w różnych gatunkach

GATUNEK	IŁOŚĆ	CYTOWANIE
<i>Cetraria islandica</i>	26.3-115.0 mg/g śladowe ilości	Gudjonsdottir 1997 Freysdottir 2008
<i>Cladina dendroides</i>	27.5—44.5% wyciągu	Maia 2002
<i>Cladonia merochlorophea</i>	0.11-0.67%	Archer 1981
<i>Cladonia arbuscula</i>	2.13±0.19 mg/g	Nybakken 2010
<i>Cladonia chlorophea</i>	0.54-4.14%	Archer 1981
<i>Cladonia cryptochlorophea</i>	0.31-2.38%	Archer 1981
<i>Cladonia rangiferina</i>	3.20±0.28 mg/g	Nybakken 2010
<i>Cladonia subcervicornis ssp. verticillata</i>	1.18-5.40%	Archer 1981

5.3.5. Wpływ czynników na zawartość kwasu fumaroprotocetrarowego w porostach

W kilku pracach opisano wpływ różnych czynników na zawartość kwasu fumaroprotocetrarowego w porostach [Gudjonsdottir 1997, Maia 2002, Freysdottir 2008, Archer 1981]. W warunkach laboratoryjnych badano wpływ naświetlania promieniami UV na stymulację syntezy kwasu fumaroprotocetrarowego w materiale porostowym [Nybakken 2006]. Określano optymalne miejsce zbioru porostów w celu pozyskania materiału o największej zawartości badanego związku [Gudjonsdottir 1997]. Kilka prac dotyczy próby określenia optymalnego rozpuszczalnika do ekstrakcji kwasu fumaroprotocetrarowego z materiału roślinnego [Maia 2002, Gudjonsdottir 1997, Freysdottir 2008]. Ciekawe badania przeprowadził Archer, porównując zawartość kwasu fumaroprotocetrarowego w różnych częściach pędów [Archer 1981].

a) wpływ promieniowania UV

Nybakken i wsp. określali wpływ naświetlania promieniowaniem UV na stymulację syntezy kwasu fumaroprotocetrarowego w *Cladonia arbuscula*, *C. rangiferina* i *C. stellaris* w warunkach laboratoryjnych. Plechy poddawano przez 4 tygodnie naświetlaniu światłem widzialnym (warunki kontrolne) przez 18 h dziennie, bądź światłem widzialnym i dodatkowo UV-B przez 3 h 15 min. Po zakończeniu eksperymentu materiał roślinny wysuszono i poddano ekstrakcji acetonem. Wyciągi analizowano pod kątem zawartości kwasu fumaroprotocetrarowego metodą HPLC (warunki - Tabela 23). W żadnym z badanych gatunków poddanych działaniu UV-B nie zaobserwowano statystycznie istotnego wzrostu ilości kwasu fumaroprotocetrarowego w odniesieniu do warunków kontrolnych [Nybakken 2006].

b) wpływ lokalizacji zbioru

Gudjonsdottir i Ingolfsdottir określały metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej zawartość kwasu fumaroprotocetrarowego w próbkach *Cetraria islandica*, zbieranych w 17 różnych lokalizacjach na Islandii (rejon północnowschodni, północnozachodni, wschodni, południowy i zachodni). Materiał roślinny został wysuszony i sproszkowany, a następnie ekstrahowany acetonem w aparacie Soxhleta. Zagęszczone do sucha ekstrakty były rozpuszczane w fazie ruchomej (warunki - Tabela 23.). Wykonana krzywa wzorcowa w zakresie stężeń 0.220-1.1 µg/ml miała przebieg liniowy, a współczynnik korelacji wynosił 0.9965. Zawartość kwasu fumaroprotocetrarowego ($R_t=2.3$ min) w badanych próbkach wahała się w zakresie 26.3-115.0 mg/g, w zależności od lokalizacji. Najwyższą zawartość badanego związku zaobserwowano w próbkach pochodzących z lokalizacji południowej, a najniższą z północnowschodniej. Warto jednak zauważyć, że w innej próbce surowca z tej samej, południowej lokalizacji ilość badanego związku była trzykrotnie niższa (33.3 mg/g). Wyniki nie pozwoliły autorom na wyciągnięcie wniosków dotyczących zależności pomiędzy zawartością badanego związku a geograficznym położeniem miejsca zbioru. Z jednej z lokalizacji zebrano materiał roślinny na przestrzeni 3 miesięcy, jednak wyniki analizy porównawczej nie wskazały na istotne różnice w zawartości kwasu fumaroprotocetrarowego pomiędzy próbkami [Gudjonsdottir 1997].

c) warunki ekstrakcji

Maia i wsp. określali zawartość kwasu fumaroprotocetrarowego w *Cladina dendroides* metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconą fazą. Materiał roślinny macerowano w eterze dietylowym i następnie ekstrahowano kolejno chloroformem oraz acetonem. Zagęszczone ekstrakty były rozpuszczane w metanolu. Analizę przeprowadzano według warunków przedstawionych w Tabeli 23. Największą zawartość tego związku zaobserwowano dla wyciągu acetonowego (44.5%), mniejszą dla wyciągu eterowego (27.5%), natomiast w wyciągu chloroformowym nie wykazano jego obecności. Czasy retencji wynosiły 2.133 min dla wzorca oraz 2.483 i 2.216 min dla kwasu fumaroprotocetrarowego obecnego odpowiednio w wyciągu eterowym i acetonowym [Maia 2002].

Autorzy islandzcy określali zawartość kwasu fumaroprotocetrarowego w *Cetraria islandica* przy użyciu metody HPLC. W przypadku zastosowania acetonu jako rozpuszczalnika, zawartość badanego związku wynosiła 26.3-115.0 mg/g [Gudjonsdottir 1997], natomiast wyciąg wodny zawierał jedynie śladowe ilości tego związku [Freysdottir 2008].

d) części rośliny

Metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconą fazą Archer określał zawartość kwasu fumaroprotocetrarowego w kilku australijskich gatunkach rodzaju *Cladonia*: *C. merochlorophea*, *C. cryptochlorophea*, *C. chlorophea* i *C. subcervicornis ssp. verticillata*, porównując tę zawartość w różnych częściach pędów (dolnej, środkowej, górnej itp.). Materiał roślinny ekstrahowano przez gotowanie w metanолоwym roztworze butylowanego hydroksytoluenu przez 10 min. Analizę przeprowadzano według warunków przedstawionych w Tabeli 23. Wyniki analizy porównawczej zawartości kwasu fumaroprotocetrarowego w obrębie pędów wskazują na największą kumulację tego związku w górnych częściach (0.67-5.40%), a najmniejszą w dolnych częściach pędów (0.11-1.18%) [Archer 1981].

5.3.6. Aktywność biologiczna i farmakologiczna

5.3.6.1. Aktywność przeciwbakteryjna

Aktywność przeciwbakteryjną kwasu fumaroprotocetrarowego zbadano w warunkach *in vitro* wobec szeregu szczepów bakterii zarówno Gram dodatnich (*Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*), jak i Gram ujemnych (*Aeromonas*, *Escherichia*, *Proteus*). Zestawienie aktywności przeciwbakteryjnej kwasu fumaroprotocetrarowego przedstawione są w Tabeli 25.

Kwas fumaroprotocetrarowy wykazał zróżnicowaną, od wysokiej [Ranković 2008, Yilmaz 2004] poprzez umiarkowaną [Yilmaz 2004] do słabej [Yilmaz 2004] aktywność przeciwbakteryjną wobec zarówno Gram dodatnich, jak i Gram ujemnych szczepów. Wobec niektórych szczepów aktywność ta była niekiedy różna, lub nawet przeciwna. Szczególnie widoczne jest to w przypadku *Staphylococcus aureus*, gdzie według niektórych autorów badany związek posiada aktywność umiarkowaną [Yilmaz 2004] lub wysoką [Ranković 2008].

Tabela 25. Aktywność przeciwbakteryjna kwasu fumaroprotocetrarowego

SZCZEP	AKTYWNOŚĆ	CYTOWANIE
<i>Aeromonas hydrophila</i>	MIC 150 µg	Yilmaz 2004
<i>Bacillus cereus</i>	MIC 4.6 µg	Yilmaz 2004
<i>Bacillus mycoides</i>	MIC 0.062 mg/ml	Ranković 2008
<i>Bacillus subtilis</i>	MIC 0.062 mg/ml MIC 4.6 µg	Ranković 2008 Yilmaz 2004
<i>Enterobacter cloacae</i>	MIC 0.062 mg/ml	Ranković 2008
<i>Escherichia coli</i>	MIC 0.062 mg/ml	Ranković 2008
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MIC 0.031 mg/ml	Ranković 2008
<i>Listeria monocytogenes</i>	MIC 4.6 µg	Yilmaz 2004
<i>Proteus vulgaris</i>	MIC 37.5 µg	Yilmaz 2004
<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC 0.062 mg/ml MIC 37.5 µg	Ranković 2008 Yilmaz 2004
<i>Streptococcus faecalis</i>	MIC 150 µg	Yilmaz 2004

MIC – minimalne stężenie hamujące

5.3.6.2. Aktywność przeciwgrzybicza

Aktywność przeciwgrzybiczą kwasu fumaroprotocetrarowego zbadano wobec szeregu szczepów, będących zarówno patogenami ludzkimi (*Candida* i in.) jak i roślinnymi (*Botrytis* i in.), a także wobec gatunków niepatogennych (*Saccharomyces* i in.). Badany związek charakteryzował się zróżnicowaną aktywnością, od wysokiej [Ranković 2008], poprzez umiarkowaną [Yilmaz 2004], aż do braku aktywności [Piovano 2002]. Wobec *Candida albicans* aktywność ta według różnych autorów jest wysoka [Ranković 2008], umiarkowana [Yilmaz 2004] lub związek był nieaktywny [Piovano 2002]. Co ciekawe, w dwóch skrajnych przypadkach aktywności była ona badana tą samą metodą, zatem trudno jednoznacznie określić przyczynę aż takich różnic. Zestawienie aktywności przeciwgrzybiczej kwasu fumaroprotocetrarowego przedstawia Tabela 26.

Tabela 26. Aktywność przeciwgrzybicza kwasu fumaroprotocetrarowego

SZCZEP	AKTYWNOŚĆ	CYTOWANIE
<i>Aspergillus flavus</i>	MIC 0.25 mg/ml <i>na</i>	Ranković 2008 Piovano 2002
<i>Aspergillus fumigatus</i>	MIC 0.25 mg/ml	Ranković 2008
<i>Aspergillus niger</i>	<i>na</i>	Piovano 2002
<i>Botrytis cinerea</i>	MIC 0.125 mg/ml	Ranković 2008
<i>Candida albicans</i>	MIC 0.125 mg/ml MIC 18.7 µg <i>na</i>	Ranković 2008 Yilmaz 2004 Piovano 2002
<i>Candida glabrata</i>	MIC 18.7 µg	Yilmaz 2004
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>na</i>	Piovano 2002
<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>na</i>	Piovano 2002
<i>Fusarium oxysporum</i>	MIC 0.25 mg/ml	Ranković 2008
<i>Microsporium canis</i>	<i>na</i>	Piovano 2002
<i>Microsporium gypseum</i>	<i>na</i>	Piovano 2002
<i>Mucor mucedo</i>	MIC 0.25 mg/ml	Ranković 2008
<i>Paecilomyces variotti</i>	MIC 0.125 mg/ml	Ranković 2008
<i>Penicillium purpurescens</i>	MIC 0.25 mg/ml	Ranković 2008
<i>Penicillium verrucosum</i>	MIC 0.25 mg/ml	Ranković 2008
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>na</i>	Piovano 2002
<i>Trichoderma harsianum</i>	MIC 0.25 mg/ml	Ranković 2008
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>na</i>	Piovano 2002
<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>na</i>	Piovano 2002

MIC – minimalne stężenie hamujące; *na* – nieaktywny

5.3.6.3. Działanie jako deterent pokarmowy

Nybakken i wsp. badali rolę kwasu fumaroprotocetrarowego jako potencjalnego deterentu pokarmowego. Plechy *Cladonia arbuscula* i *C. rangiferina* podawano jako paszę nornicom. Plechy porostów, poddane lub nie poddane wcześniejszej maceracji w acetonie w celu wymycia części substancji porostowych, podawano zwierzętom w formie nierozdrobnionej lub zmielonej. Uzyskane wyciągi acetonowe analizowano jakościowo i ilościowo pod kątem obecności i zawartości kwasu fumaroprotocetrarowego. Nie zaobserwowano istotnych różnic w wybieraniu przez nornice pokarmu o zmniejszonej zawartości związków porostowych, co świadczy o braku działania badanego związku jako deterentu pokarmowego [Nybakken 2010].

5.3.6.4. Aktywność antyoksydacyjna

W badaniach nad aktywnością antyoksydacyjną kwas fumaroprotocetrarowy wykazał umiarkowane własności w teście DPPH, powodując 20% zahamowanie wytwarzania wolnych rodników przy stężeniu 3000 µM. W tym samym eksperymencie mierzono także zdolność kwasu fumaroprotocetrarowego do wymiatania wolnych rodników nadtlenowych. Badany związek charakteryzował się wysoką zdolnością do wymiatania wolnych rodników, wartością IC₅₀ równą 566 µM przewyższając substancję referencyjną (kwercetyna, IC₅₀ 754 µM) [Lohezic Le Devehat 2007].

5.3.6.5. Aktywność immunomodulująca

Wpływ kwasu fumaroprotocetrarowego na komórki układu odpornościowego w warunkach *in vitro* został opisany w dwóch doniesieniach. Badany związek znacząco wpływał na uwalnianie tlenu azotu przez makrofagi [Freysdottir 2008], natomiast nie powodował pobudzenia sekrecji interleukin ani ekspresji antygenów w monocytach [Santos 2004].

W badaniach na makrofagach izolowanych z myszy zaobserwowano umiarkowaną aktywność kwasu fumaroprotocetrarowego, w stężeniu 100 µg/ml, stymulującą uwalnianie nadtlenu wodoru i tlenu azotu przez te komórki. Badany związek stymulował uwalnianie tlenu azotu w ilości 75 µmol, podczas gdy substancja referencyjna (lipopolisacharyd z *Escherichia coli*) w ilości 65 µmol. W przypadku stymulowania produkcji nadtlenu wodoru, kwas fumaroprotocetrarowy uwalniał 33.08 nmol, podczas gdy substancja referencyjna (zymosan) 275.41 nmol [Santos 2004].

W badaniach na ludzkich komórkach dendrytycznych, pochodzących od monocytów, określano wpływ kwasu fumaroprotocetrarowego na sekrecję interleukin (IL-10 i IL-12p40), jak również na ekspresję antygenów CD86 i CD209 na powierzchni tych komórek. Badany związek nie powodował indukowania sekrecji interleukin, nie wpływał również na ekspresję antygenów w badanym zakresie stężeń 0.01-1 µg/ml [Freysdottir 2008].

5.3.6.6. Aktywność przeciwzapalna

Kwas fumaroprotocetrarowy wykazał *in vitro* słabą aktywność wobec cyklooksygenazy 1 i 2, powodując zahamowanie tych enzymów odpowiednio o 22 i 37%, przy stężeniu 100 µg/ml [Su 2003].

5.3.7. Aktywność cytotoksyczna

Nieliczne badania opisują aktywność cytotoksyczną kwasu fumaroprotocetrarowego, określaną wobec zwierzęcych i ludzkich linii komórek nowotworowych i prawidłowych [Correche 2004, Kristmundsdottir 2005, Bezivin 2004]. Kwas fumaroprotocetrarowy charakteryzował się słabą aktywnością wobec zwierzęcych komórek nowotworowych [Bezivin 2004], natomiast wobec linii ludzkich aktywność ta była bardzo słaba ($IC_{50} > 100$ µg/ml) [Bezivin 2004, Correche 2004] lub związek był nieaktywny [Kristmundsdottir 2005]. Zestawienie aktywności cytotoksycznej kwasu fumaroprotocetrarowego przedstawia Tabela 27.

Tabela 27. Aktywność cytotoksyczna kwasu fumaroprotocetarowego.

LINIA	METODA	AKTYWNOŚĆ	CYTOWANIE
3LL	MTT	IC ₅₀ 75.9 µg/ml	Bezivin 2004
Du145	MTT	IC ₅₀ >100 µg/ml	Bezivin 2004
hepatocyty szczurze	LDH	IC ₅₀ >150 µg/ml	Correche 2004
K562	MTT	IC ₅₀ >100 µg/ml	Bezivin 2004
L1210	MTT	IC ₅₀ 82.3 µg/ml	Bezivin 2004
MCF7	MTT	IC ₅₀ >100 µg/ml	Bezivin 2004
Panc-1	test ze znakowaną tymidyną	<i>na</i>	Kristmundsdottir 2005
T47D	test ze znakowaną tymidyną	<i>na</i>	Kristmundsdottir 2005
U251	MTT	IC ₅₀ >100 µg/ml	Bezivin 2004

linie ludzkie: białaczka K562, nowotwór piersi (T47D, MCF7), nowotwór trzustki Panc-1, nowotwór prostaty Du145, glejak U251

linie zwierzęce: białaczka L1210, nowotwór płuc 3LL

linie prawidłowe: hepatocyty szczurze, komórki nerki małpy BSC-1, ludzkie keratynocyty HaCaT

metody: LDH – test z dehydrogenazą mleczanową, MTT – test redukcji soli tetrazoliowych

na – nieaktywny

6. Cel pracy

Porosty są interesującą i wciąż słabo przebadaną grupą, zwłaszcza pod kątem aktywności farmakologicznej czy biologicznej. Porosty rodzaju *Cladonia* (chrobotek) należą do gatunków szeroko rozpowszechnionych, także na terenie Polski (kilkadziesiąt gatunków), stąd łatwość w pozyskiwaniu surowca. Prace nad rodzajem *Cladonia* były prowadzone w Katedrze Farmakognozji w latach 80-tych, gdzie w teście *Allium* wykazano wstępne właściwości antymitotyczne kwasu usninowego. Stąd wynikło zainteresowanie przedstawicielami tego rodzaju porostów i kwasem usninowym oraz pomysł na kontynuowanie i poszerzenie tych badań.

Wybrane do badań aromatyczne metabolity porostowe różnią się między sobą strukturą. Kwas usninowy jest pochodną dibenzofuranu, kwas fumaroprotocetrarowy jest depsydonem, natomiast atranorynę zalicza się do depsydów. Opisana dotychczas w literaturze naukowej aktywność biologiczna metabolitów porostowych dotyczy głównie kwasu usninowego, dla którego wykazano w badaniach *in vitro* silną aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec patogennych bakterii i grzybów, aktywność cytotoksyczną oraz wspomnianą wyżej aktywność antymitotyczną. Podobną, choć słabszą aktywność, opisano dla pozostałych związków: kwasu fumaroprotocetrarowego i atranoryny.

Podstawowym zamierzeniem projektu była izolacja kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego z krajowych gatunków rodzaju *Cladonia* oraz określenie wpływu tych metabolitów na komórki nowotworowe i prawidłowe. Realizację tego zamierzenia podzielono na kilka etapów:

1. analiza jakościowa i ilościowa 6 gatunków rodzaju *Cladonia*: *C. arbuscula*, *C. uncialis*, *C. subulata*, *C. furcata*, *C. gracilis* i *C. macilenta*, pod kątem występowania w nich wybranych metabolitów wtórnych
2. porównawcza analiza jakościowa i ilościowa gatunków zebranych w Polsce i na Islandii (*Cladonia arbuscula*, *C. uncialis*)
3. optymalizacja warunków ekstrakcji badanych związków z materiału roślinnego
4. wyselekcjonowanie gatunków o najwyższej zawartości tych związków i ich izolacja
5. określenie aktywności cytotoksycznej wyizolowanych metabolitów oraz ich wpływu na morfologię, cytoszkielet i aktywność migracyjną ludzkich komórek nowotworowych i prawidłowych

II. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

7. MATERIAŁ I METODY

7.1. Stosowane materiały, odczynniki i aparatura

A. Chromatografia cienkowarstwowa, preparatywna i kolumnowa

fazy stacjonarne:

płytki chromatograficzne, pokryte żel krzemionkowym 60, 20x20 cm, Merck

płytki do chromatografii preparatywnej, pokryte żel krzemionkowym G, grubość warstwy 500 mikronów, 20x20 cm, Analtech, Sigma

żel do chromatografii kolumnowej, rozmiar cząstek 0.040-0.063 mm, Merck

fazy ruchome:

toluen - lodowaty kwas octowy 170:30

chloroform - metanol - kwas mrówkowy 97:5:1

odczynnik wywołujący:

25% metanolowy roztwór kwasu siarkowego (VI)

rozpuszczalniki i odczynniki:

chloroform cz.d.a., Chempur

metanol cz.d.a., Chempur

heksan cz., Chempur

aceton cz.d.a., Chempur

toluen cz., Chempur

kwas mrówkowy cz., 98-100%, Sigma-Aldrich

lodowaty kwas octowy cz., 99.5%, Chempur

kwas siarkowy cz., 95%, Chempur

B. Wysokosprawna chromatografia cieczowa

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 H₃PO₄ (v/v) , B: acetonitryl (A:B 15:85)

rozpuszczalniki i odczynniki:

acetonitryl HPLC, Chempur

kwas ortofosforowy cz., 85%, Chempur

chloroform HPLC, stabilizowany etanolem, Chempur

aceton HPLC, J.T. Baker

C. Wzorce

kwask usninowy, 98% , Sigma

atranoryna (SH – secondary HPLC), Chromadex

kwask fumaroprotocetrarowy (RG – reagent grade), Chromadex

D. Analiza spektralna:

chloroform-D¹ deuteration degree min. 99,8% for NMR spectroscopy, MERCK

dimethyl sulfoxide-d₆ , 99,9 %, spectrophotometric grade, Sigma

E. Pożywki do hodowli komórkowych:

dla linii HTB 140:

DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium) high glucose, Sigma (glukoza 4,5 g/l)

dla linii HSF:

DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium) low glucose, Sigma (glukoza 1 g/l)

dla linii Du145:

DMEM F12 (Dulbeco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12) , Sigma

F. Odczynniki do hodowli komórkowych:

sól fizjologiczna PBS z jonami wapnia i magnezu (Phosphate Buffered Saline with calcium chloride and magnesium chloride), Sigma

sól fizjologiczna PBS bez jonów wapnia i magnezu (Phosphate Buffered Saline without calcium chloride and magnesium chloride), Sigma

bydlęca surowica płodowa (foetal bovine serum), Sigma

antybiotyki: penicilin-streptomycin-neomycin solution stabilised, Sigma

0,25 % roztwór trypsyny z EDTA, Sigma

0.4% roztwór błękitu trypanu, Sigma

dwuacetonowy roztwór dwuocetanu fluoresceiny, Koch Light Laboratories

0,5 mg/ml roztworu bromku etydyny, Sigma

3,7% roztwór formaldehydu, Polskie Odczynniki Chemiczne

0,1 % roztwór Triton X-100, Polskie Odczynniki Chemiczne

0,5 mg/ml roztwór falloidyny znakowanej tetraizotiocyanianem rodamin (TRITC), Sigma

zestaw do oznaczania apoptozy: Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Immunogen

G. Materiały do hodowli komórkowych:

naczynia hodowlane 25 i 75 cm², Polgen

próbówki jednorazowe 15 ml oraz 50 ml, Polgen

płytki wielodołkowe (6, 12,24-dołkowe), Polgen

szalki Petriego ø 40 mm, Polgen

H. Aparatura badawcza

- chromatograf ciekłowy Dionex, z detektorem PDA 100 UV-VIS, pompą P 680, termostatem TCC 100, autosamplerem ASI 100; program sterujący: CHROMELEON® 6.60
- inkubator do hodowli komórkowych Lab-Line, z atmosferą 5% CO₂
- mikroskop kontrastowo-fazowy Leitz Orthoplan z przystawką do epifluorescencji, z dołączonymi fotopowielaczami
- mikroskop odwrócony kontrastowo-fazowy Leica DMIRE2 z dołączonym fotopowielaczem oraz z przystawką do fluorescencji, wyposażony w kamerę o wysokiej rozdzielczości, połączony z komputerem wyposażonym w kartę akwizycji obrazu z zainstalowanym odpowiednim programem (Leica FW 4000).
- odwrócony mikroskop kontrastowo-fazowy Olympus IMT-2 wyposażony w kamerę CCD Hitachi KP-161, połączony z komputerem z zainstalowanym odpowiednim oprogramowaniem.
- Aparat NMR: Bruker AVANCE 400 (Bruker Biospin GmbH, Karlsruhe, Germany)
- aparat Koefflera do pomiaru temperatury topnienia

7.2. Surowiec do badań

Materiał do badań stanowiło 6 gatunków porostów z rodzaju *Cladonia* (chrobotek): *Cladonia arbuscula* (chrobotek leśny), *C. gracilis* (ch. wysmukły), *C. furcata* (ch. widlasty), *C. macilenta ssp. floerkeana* (ch. Floerkego), *C. subulata* (ch. rogokształtny), *C. uncialis* (ch. gwiazdkowaty). Zbioru surowców dokonano w Borach Tucholskich w lipcu i sierpniu 2008 (*C. arbuscula*, *C. gracilis*, *C. furcata*, *C. macilenta ssp. floerkeana*, *C. subulata*, *C. uncialis*) oraz w Alftanes na Islandii w lipcu 2008 (*C. arbuscula*, *C. uncialis*). Tożsamość gatunków została potwierdzona przez dr Michała Węgrzyna z Instytutu Botaniki UJ. Próbk/okazy zielnikowe badanych gatunków przechowywane są w herbarium Katedry Farmakognozji UJ CM. Porównanie wyglądu plech gatunków polskich i islandzkich na przykładzie *Cladonia arbuscula* przedstawia Rycina 12.

Zebrane plechy porostów oczyszczono, wysuszono w zaciemnionym pomieszczeniu a następnie przechowywano w kartonowych pudełkach, bez dostępu światła.



Rycina 12. *Cladonia arbuscula* zebrana na Islandii (z lewej) i w Polsce (fot. własna)

7.3. Analiza jakościowa

7.3.1. Ekstrakcja surowca

Na wadze technicznej odważono około 2 g rozdrobnionych surowców, które następnie przeniesiono do bibułowych gilz. Gilzy umieszczano w aparacie Soxhleta i ekstrahowano wyczerpująco rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności: heksanem, chloroformem, acetonem i metanolem, susząc surowiec przy każdej zmianie rozpuszczalnika. Uzyskane wyciągi zagęszczono do sucha i wykorzystano do przeprowadzenia wstępnej analizy jakościowej.

7.3.2. Analiza jakościowa z zastosowaniem TLC

Warunki:

faza stacjonarna: płytka chromatograficzna Kieselgel 60

faza ruchoma: toluen – lodowaty kwas octowy 170:30 [Orange 2001]

wzorce: kwas usninowy, atranoryna, kwas fumaroprotocetrarowy

odczynniki wywołujący: 25% metanolowy roztwór kwasu siarkowego (VI)

Wykonanie:

Na płytkę chromatograficzną naniesiono kapilarką pasmowo przygotowane wyciągi z badanych gatunków oraz chloroformowe (kwas usninowy, atranoryna) lub acetonowe (kwas fumaroprotocetrarowy) roztwory substancji wzorcowych. Chromatogram rozwijano w fazie ruchomej.

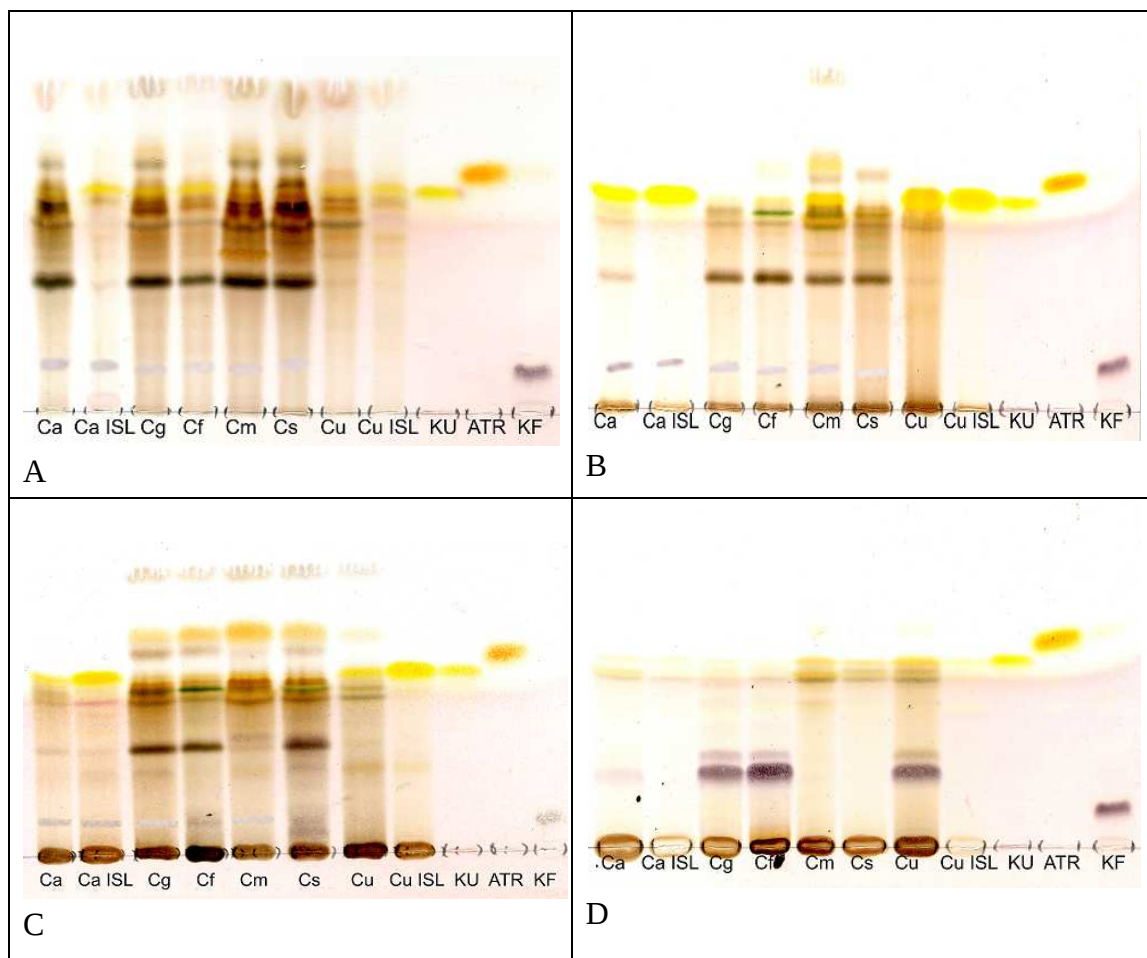
Po rozwinięciu chromatogram suszono, obserwowano w świetle dziennym, a następnie wywoływano. Po wywołaniu chromatogram obserwowano w świetle widzialnym oraz w świetle UV 254 i 365nm.

Wyniki:

Na chromatogramie (Rycina 13) zaobserwowano plamy odpowiadające kolorem i wartością R_f plamom substancji wzorcowych:

- a) kwasu usninowego (R_f 0.57), plama barwy żółtej w świetle widzialnym, w świetle UV wygaszająca fluorescencję, po wywołaniu nasilona żółta barwa w świetle widzialnym, niewidoczna w świetle UV - dla wyciągów heksanowych, chloroformowych, acetonowych i metanolowych z *Cladonia arbuscula*, *C. uncialis*, *C. macilenta ssp floerkana*, *C. gracilis* i *C. furcata* oraz z obydwu gatunków islandzkich
- b) kwasu fumaroprotocetrarowego (R_f 0.15), plama niewidoczna w świetle widzialnym ani UV, po wywołaniu barwy niebiesko-fioletowej w świetle widzialnym i niewidoczna w świetle UV - dla ekstraktów heksanowych, chloroformowych i acetonowych *Cladonia macilenta ssp floerkana*, *C. furcata*, *C. arbuscula*, *C. gracilis*, *C. subulata* oraz z *C. arbuscula* zebranej na Islandii. W wyciągach metanolowych zaobserwowano plamy o zgodnej barwie lecz różniące się wartością R_f od wzorca.
- c) atranoryny (R_f 0.67), plama niewidoczna w świetle widzialnym ani UV, po wywołaniu barwy pomarańczowo-żółtej w świetle widzialnym i niewidoczna w świetle UV - zaobserwowano plamy o podobnej barwie, lecz różniące się wartością R_f we wszystkich wyciągach z *C. macilenta ssp. floerkeana*, wyciągach heksanowych i acetonowych z *Cladonia gracilis* i *C. subulata* oraz wyciągu acetonowym z *C. furcata*

Rycina 13. Chromatogramy wyciągów heksanowych (A), chloroformowych (B), acetonowych (C) i metanolowych (D) ze wszystkich badanych gatunków polskich i islandzkich wraz z wzorcami kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego



wyciągi: Ca - *Cladonia arbuscula* zebrana w Polsce, Ca ISL - *C. arbuscula* zebrana na Islandii, Cg - *C. gracilis*, Cf - *C. furcata*, Cm - *C. macilenta ssp. floerkeana*, Cs - *C. subulata*, Cu - *C. uncialis* zebrana w Polsce, Cu ISL - *C. uncialis* zebrana na Islandii; wzorce: KU - kwas usninowy, ATR - atranoryna, KF - kwas fumaroprotocetrarowy; faza ruchoma: toluen – lodowaty kwas octowy 170:30, odczynnik wywołujący: 25% MeOH r-r H_2SO_4

7.3.3. Analiza jakościowa z zastosowaniem HPLC

Warunki:

faza stacjonarna: kolumna C-18 (5 μ m, 250 x 4.6 mm), prekolumna C-18 (5 μ m, 10 x 4mm)

temperatura kolumny: 22°C

objętość nastrzyku: 20 μ l

długość fali: 240 nm (KU, ATR), 210 nm (KFUM)

faza ruchoma: A: woda z 1% roztworem 0.1N H_3PO_4 (v/v), B: acetonitryl, A:B 15:85 [Ji 2005]

prędkość przepływu: 1 ml/min

czas analizy: 20 min. (KU, ATR), 10 min. (KFUM)

wzorzec: kwas usninowy, atranoryna, kwas fumaroprotocetrarowy

Wykonanie:

Z przygotowanych uprzednio wyciągów pobrano strzykawką 1,5 ml i przesączono przez sączi membranowe Titan 2 HPLC filter – Nylon Membrane o średnicy porów 0,45 μm , bezpośrednio do wialśów. Uzyskane próbki analizowano w warunkach opisanych powyżej.

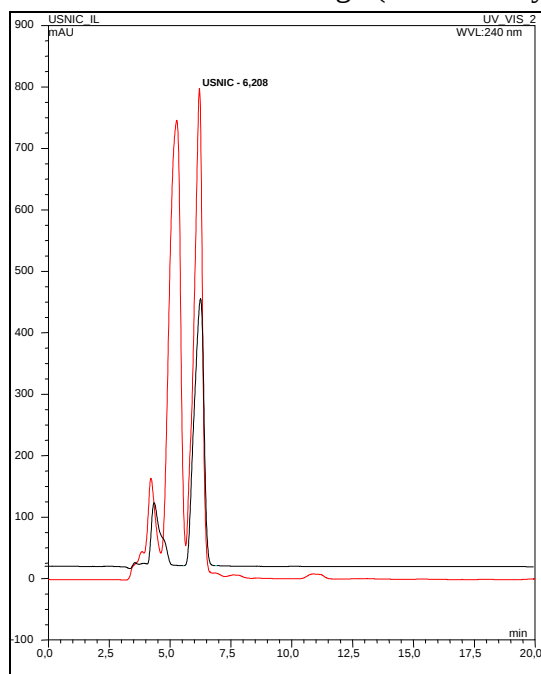
Wyniki:

Na chromatogramie zaobserwowano pik o czasie retencji odpowiadającym czasom retencji substancji wzorcowych:

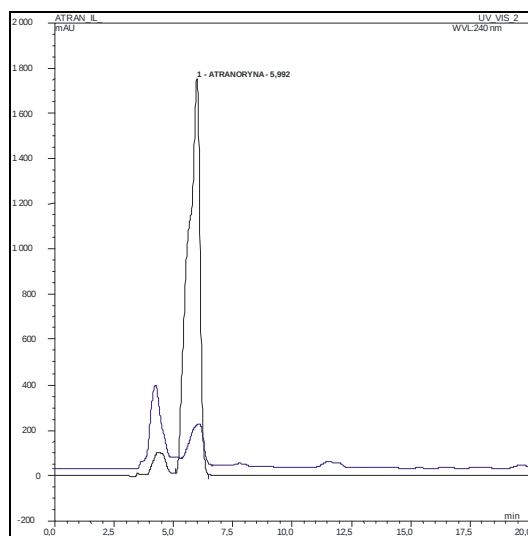
- a) kwasu usninowego (Rt 6.21) - we wszystkich rodzajach wyciągów z *Cladonia arbuscula*, *C. uncialis*, *C. macilenta ssp floerkana* oraz *C. gracilis*
- b) atranoryny (Rt 5.89) - we wszystkich rodzajach wyciągów z *Cladonia arbuscula*, *C. gracilis*, *C. subulata* oraz *C. macilenta ssp. floerkeana*
- c) kwasu fumaroprotocetrarowego (Rt 6.08) - we wszystkich rodzajach wyciągów z *Cladonia arbuscula*, *C. gracilis*, *C. furcata*, *C. subulata* oraz *C. macilenta ssp. floerkeana*

Przykładowy chromatogram dla wyciągu chloroformowego z *Cladonia macilenta ssp. floerkeana* wraz z wzorcem kwasu usninowego przedstawia Ryc 14, dla wyciągu chloroformowego z *Cladonia subulata* wraz z wzorcem atranoryny Ryc 15, dla wyciągu acetonowego z *Cladonia subulata* wraz z wzorcem kwasu fumaroprotocetrarowego Ryc 16.

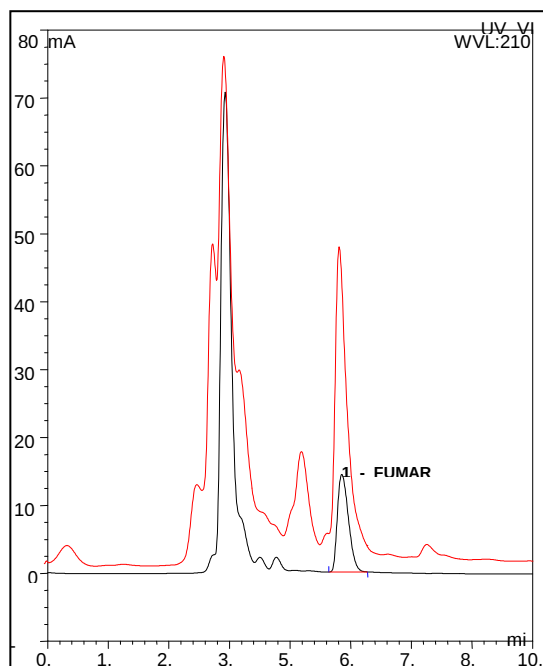
Rycina 14. Chromatogram wyciągu chloroformowego z *Cladonia macilenta ssp. floerkeana* (kolor czerwony) wraz z wzorcem kwasu usninowego (kolor czarny).



Rycina 15. Chromatogram wyciągu chloroformowego z *Cladonia subulata* (kolor niebieski) wraz z wzorcem atranoryny (kolor czarny)



Rycina 16. Chromatogram wyciągu acetonowego z *Cladonia subulata* (kolor czerwony) wraz z wzorcem kwasu fumaroprotocetarowego (kolor czarny)



7.4. Analiza ilościowa z zastosowaniem HPLC

Warunki:

faza stacjonarna: kolumna C-18 (5µm, 250 x 4.6 mm), prekolumna C-18 (5µm, 10 x 4mm)

temperatura kolumny 22°C

objętość nastrzyku: 20µl

długość fali: 240 nm (KU, ATR), 210 nm (KFUM)

faza ruchoma: A: woda z 1% roztworem 0.1N H₃PO₄ (v/v), B: acetonitryl, A:B 15:85 [Ji 2005]

prędkość przepływu: 1 ml/min

czas analizy: 20 min. (KU, ATR), 10 min. (KFUM)

wzorzec: kwas usninowy, atranoryna, kwas fumaroprotocetrarowy

7.4.1. Krzywa wzorcowa

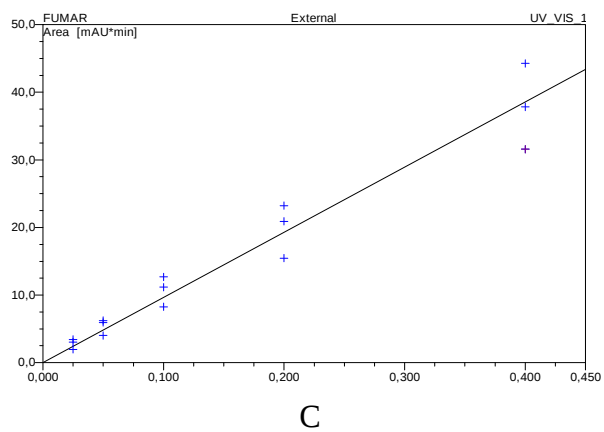
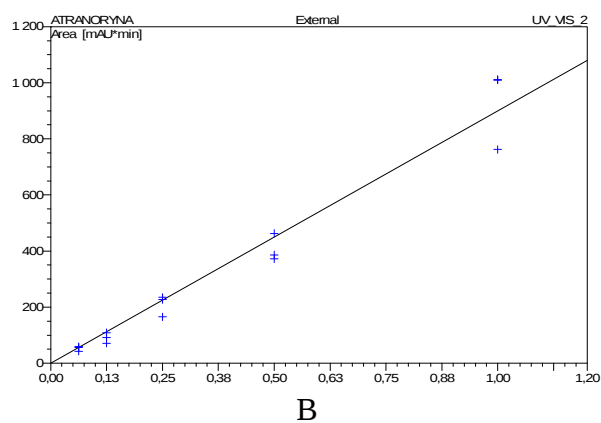
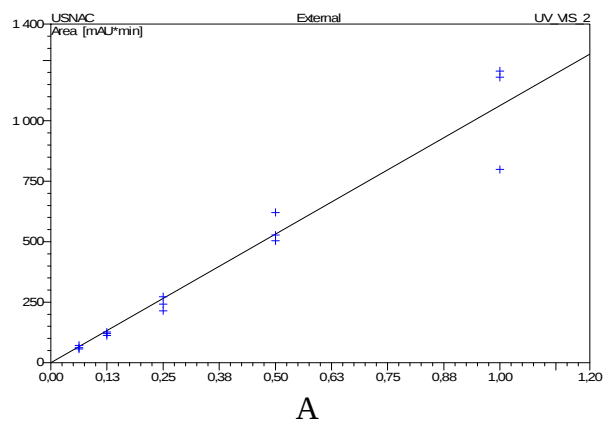
Wykonanie:

Odważono dokładnie około 5 mg wzorcowego kwasu usninowego, przeniesiono do kolbki miarowej i rozpuszczono w 5 ml chloroformu czystości HPLC. Następnie sporządzono szereg rozcieńczeń z roztworu wyjściowego, uzyskując następujące stężenia: 0.5, 0.25, 0.125 i 0.0625 mg/ml. Analogicznie przygotowano roztwory dla atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego (rozpuszczalnik - aceton czystości HPLC). Z przygotowanych rozcieńczeń pobrano strzykawką 1,5 ml otrzymanych roztworów i przesączono przez sączki membranowe Titan 2 HPLC filter – Nylon Membrane o średnicy porów 0,45 µm, bezpośrednio do wialsów. Użyte próbki analizowano w warunkach opisanych powyżej. Każda próbka analizowana była trzykrotnie.

Wyniki:

Otrzymano krzywą wzorcową dla kwasu usninowego (Rycina 17 A), atranoryny (Rycina 17 B) oraz kwasu fumaroprotocetrarowego (Rycina 17 C). Współczynniki korelacji dla tych krzywych wynosiły odpowiednio 97.9617, 98.5801 i 97.4518.

Rycina 17. Krzywe wzorcowe wykonane dla kwasu usninowego (A), atranoryny (B) i kwasu fumaroprotocetareowego (C)



7.4.2. Optymalizacja procesu ekstrakcji

W celu uzyskania optymalnych warunków ekstrakcji wybranych metabolitów (kwasu usninowego, atranoryny, kwasu fumaroprotocetrarowego) z materiału porostowego, wzięto pod uwagę trzy czynniki:

- a) stopień rozdrobnienia surowca: materiał roślinny mielono w młynku elektrycznym na proszek lub rozdrabniano w moździerzu na niewielkie fragmenty,
- b) metoda ekstrakcji: rozpuszczalnikami następującymi kolejno po sobie, z użyciem tej samej próbki surowca, lub osobnej próbki surowca dla każdego z rozpuszczalników,
- c) polarność stosowanego rozpuszczalnika: heksan, chloroform, aceton, metanol

ad. a) stopień rozdrobnienia surowca

Wykonanie:

Na wadze analitycznej odważono dokładnie około 5 g surowca (*C. arbuscula*) zmielonego i rozdrobnionego. Odważone surowce przeniesiono do bibułowych gilz, umieszczono w aparacie Soxhleta i ekstrahowano wyczerpująco rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności (heksan, chloroform, aceton, metanol), susząc surowiec przy każdej zmianie rozpuszczalnika. Otrzymane wyciągi zagęszczono i przeniesiono ilościowo do kolbek miarowych o objętości 10 ml. Tak przygotowane wyciągi przechowywano w temperaturze 4°C do czasu analizy.

Suche wyciągi rozpuszczono w 10 ml chloroformu (analiza kwasu usninowego i atranoryny) lub acetonu (analiza kwasu fumaroprotocetrarowego) czystości HPLC. Pobrano strzykawką 1,5 ml otrzymanych roztworów i przesączono przez sączoneki membranowe Titan 2 HPLC filter – Nylon Membrane o średnicy porów 0,45 µm, bezpośrednio do wialśów. Uzyskane próbki analizowano w warunkach opisanych powyżej. Każda próbka analizowana była trzykrotnie.

Wyniki:

Porównanie zawartości kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego w wybranym surowcu (*Cladonia arbuscula*) o różnym stopniu rozdrobnienia przedstawia Tabela 28.

Tabela 28. Zawartość procentowa kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego w surowcu *Cladonia arbuscula* o różnym stopniu rozdrobnienia.

SUBSTANCJA	ZAWARTOŚĆ [%]	
	w surowcu sproszkowanym	w surowcu rozdrobnionym
kwas usninowy	2.340±0.387	3.020±0.492
atranoryna	0.511±0.021	0.002±0.0001
kwas fumaroprotocetrarowy	0.538±0.025	0.710±0.041

Przy wartościach podano błąd standardowy średniej

ad. b) metoda ekstrakcji

Wykonanie:

Na wadze analitycznej odważono dokładnie około 5 g zmielonego surowca (*C. gracilis*). Odważone surowce przeniesiono do bibułowych gilz, umieszczono w aparacie Soxhleta i ekstrahowano wyczerpująco rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności (heksan, chloroform, aceton, metanol), susząc surowiec przy każdej zmianie rozpuszczalnika lub dla każdego rozpuszczalnika stosując nową partię surowca. Otrzymane wyciągi zagęszczono i przeniesiono ilościowo do kolbek miarowych o objętości 10 ml. Tak przygotowane wyciągi przechowywano w temperaturze 4°C do czasu analizy.

Suche wyciągi rozpuszczono w 10 ml chloroformu (analiza kwasu usninowego i atranoryny) lub acetonu (analiza kwasu fumaroprotocetrarowego) czystości HPLC. Pobrano strzykawką 1,5 ml otrzymanych roztworów i przesączono przez sączone 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.

Wyniki:

Ilościowe porównanie zawartości kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego w wybranym surowcu (*Cladonia gracilis*) ekstrahowanym rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności następującymi kolejno po sobie oraz stosowanymi osobno przedstawia Tabela 29.

Tabela 29. Zawartość procentowa kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego w surowcu *Cladonia gracilis* ekstrahowanym różnymi metodami.

SUBSTANCJA	ZAWARTOŚĆ [%]	
	w surowcu ekstrahowanym metodą 1	w surowcu ekstrahowanym metodą 2
kwas usninowy	0.036±0.013	0.152±0.036
atranoryna	n.d.	0.025±0.009
kwas fumaroprotocetrarowy	0.05±0.016	0.08±0.023

metoda 1 - ekstrakcja z użyciem osobnej próbki surowca dla każdego z rozpuszczalników

metoda 2 - ekstrakcja rozpuszczalnikami następującymi kolejno po sobie, z użyciem tej samej próbki surowca

n.d. - nie wykrywalny

Przy wartościach podano błąd standardowy średniej

ad. c) polarność rozpuszczalnika

Wykonanie:

Na wadze analitycznej odważono dokładnie około 5 g zmielonych surowców (*Cladonia arbuscula*, *C. gracilis*, *C. furcata*, *C. macilenta ssp. floerkeana*, *C. subulata*, *C. uncialis*). Odważone surowce przeniesiono do bibułowych gilz, umieszczono w aparacie Soxhleta i ekstrahowano wyczerpująco rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności (heksan, chloroform, aceton, metanol), susząc surowiec przy każdej zmianie rozpuszczalnika. Otrzymane wyciągi zagęszczono i przeniesiono ilościowo do kolbek miarowych o objętości 10 ml. Tak przygotowane wyciągi przechowywano w temperaturze 4°C do czasu analizy.

Suche wyciągi rozpuszczono w 10 ml chloroformu (analiza kwasu usninowego i atranoryny) lub acetonu (analiza kwasu fumaroprotocetrarowego) czystości HPLC. Pobrano strzykawką 1,5 ml otrzymanych roztworów i przesączono przez sączki 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.

Wyniki:

Ilościowe porównanie zawartości kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego we wyciągach heksanowych, chloroformowych, acetonowych i metanolowych ze wszystkich badanych gatunków polskich przedstawia Tabela 30.

Tabela 30. Zawartość kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego w wyciągach heksanowych, chloroformowych, acetonowych i metanolowych ze wszystkich badanych gatunków.

GATUNEK	ZWIĄZEK	ZAWARTOŚĆ [mg/ml]			
		w wyciągu heksanowym	w wyciągu chloroformowym	w wyciągu acetonowym	w wyciągu metanolowym
<i>Cladonia arbuscula</i>	KU	0.5130±0.0222	1.6772±0.1672	0.4276±0.0349	0.0711±0.0097
	ATR	0.3459±0.077	1.9117±0.0099	0.2509±0.0754	0.0466±0.0152
	KFUM	1.6399±0.1858	8.8200±2.7658	1.2131±0.0380	0.02013±0.0047
<i>Cladonia gracilis</i>	KU	0.1063±0.0079	0.0295±0.0050	0.0371±0.0007	0.0055±0.0009
	ATR	0.0549±0.0171	0.0216±0.0056	0.0488±0.012	0.0013±0.0004
	KFUM	0.1761±0.0376	0.0513±0.0128	0.1591±0.0238	0.0155±0.0055
<i>Cladonia furcata</i>	KU	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	ATR	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	KFUM	0.2358±0.0682	0.1142±0.0252	0.0555±0.0147	0.0144±0.0109
<i>Cladonia macilenta</i> <i>ssp. floerkeana</i>	KU	0.4473±0.0254	0.5339±0.0342	0.0770±0.0107	0.0042±0.0001
	ATR	0.2509±0.0795	0.3946±0.0805	0.0610±0.008	0.0049±0.0007
	KFUM	1.0648±0.2255	2.6199±0.4927	0.3378±0.0368	0.0344±0.0114
<i>Cladonia subulata</i>	KU	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	ATR	0.0032±0.0002	0.0019±0.0006	0.0010±0.0002	0.0004±0.0001
	KFUM	0.0464±0.0558	0.1449±0.0783	0.2967±0.1601	0.1375±0.0360
<i>Cladonia uncialis</i>	KU	0.3625±0.0017	1.4480±0.1268	0.5683±0.0007	0.0933±0.0142
	ATR	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	KFUM	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. - nie wykrywalny; KU - kwas usninowy, ATR - atranoryna, KFUM - kwas fumaroprotocetrarowy

Przy wartościach podano błąd standardowy średniej

7.4.3. Analiza ilościowa kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego

Do dalszej analizy wybrano metodę ekstrakcji z surowca zmielonego (atranoryna) lub rozdrobnionego w mózdzierzu (kwas usninowy, kwas fumaroprotocetrarowy), rozpuszczalnikami następującymi po sobie według wzrastającej polarności, z wykorzystaniem tej samej próbki surowca. Dla każdego z gatunków stosowano ekstrakcję z użyciem wszystkich czterech rozpuszczalników.

Wykonanie:

Na wadze analitycznej odważono dokładnie około 5 g odpowiednio rozdrobnionych plech wszystkich badanych gatunków. Odważone surowce przeniesiono do bibułowych gilz, umieszczono w aparacie Soxhleta i ekstrahowano wyczerpująco rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności (heksan, chloroform, aceton, metanol), susząc surowiec przy każdej zmianie rozpuszczalnika. Otrzymane wyciągi zagęszczono i przeniesiono ilościowo do kolbek miarowych o objętości 10 ml. Tak przygotowane wyciągi przechowywano w temperaturze 4°C do czasu analizy.

Suche wyciągi rozpuszczono w 10 ml chloroformu czystości HPLC (analiza kwasu usninowego i atranoryny) lub acetonu czystości HPLC (analiza kwasu fumaroprotocetrarowego). Pobrano strzykawką 1,5 ml otrzymanych roztworów i przesączono przez sączone membranowe Titan 2 HPLC filter – Nylon Membrane o średnicy porów 0,45 µm, bezpośrednio do wialśów. Uzyskane próbki analizowano w warunkach opisanych powyżej. Każda próbka analizowana była trzykrotnie.

Wyniki:

Wyniki analizy ilościowej kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego we wszystkich badanych gatunkach, ekstrahowanych kolejno rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności, przedstawione są w Tabeli 31

Tabela 31. Zawartość procentowa kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego we wszystkich badanych gatunkach polskich i islandzkich

GATUNEK		ZAWARTOŚĆ [%]		
		kwas usninowy	atranoryna	kwas fumaroprotocetrarowy
<i>Cladonia arbuscula</i>	PL	0.538±0.025	0.511±0.019	2.34±0.412
	IS	0.698±0.041	n.d.	1.16±0.214
<i>Cladonia gracilis</i>		0.036±0.003	0.025±0.002	0.08±0.018
<i>Cladonia furcata</i>		n.d.	n.d.	0.08±0.019
<i>Cladonia macilenta ssp. floerkeana</i>		0.212±0.012	0.142±0.017	0.81±0.127
<i>Cladonia subulata</i>		n.d.	0.0013±0.0001	0.125±0.005
<i>Cladonia uncialis</i>	PL	0.494±0.025	n.d.	n.d.
	IS	1.052±0.134	n.d.	n.d.

n.d. - nie wykrywalny; PL - gatunek zebrany w Polsce, IS - gatunek zebrany na Islandii

Przy wartościach podano błąd standardowy średniej

7.5. Izolacja wybranych metabolitów porostowych

7.5.1. Izolacja kwasu usninowego

Wykonanie:

Odważono około 50 g rozdrobnionego surowca o największej zawartości kwasu usninowego (*C. uncialis*) i przeniesiono do bibułowej gilzy, którą umieszczono w aparacie Soxhletha i ekstrahowano wyczerpująco heksanem a następnie, po wysuszeniu surowca, chloroformem. Uzyskane wyciągi pozostawiono aż do wypadnięcia osadu w postaci żółtych igieł. Osad odsączono i przemywano kilkakrotnie etanolem. Tożsamość substancji, wstępnie zidentyfikowanej jako kwas usninowy (TLC, HPLC), potwierdzano przy pomocy metod spektralnych.

Wyniki:

Uzyskano 87 mg substancji w postaci żółtych igieł. Kochromatografia TLC i HPLC z wzorcem wskazała, że otrzymaną substancją jest najprawdopodobniej kwas usninowy - zarówno zabarwienie plamy, jak i wartość R_f (TLC) oraz czas retencji (HPLC) były zgodne z substancją wzorcową. Wyizolowany związek charakteryzował się temperaturą topnienia 201-203°C, zgodną z danymi literaturowymi [Culberson 1979].

7.5.1.1. Analiza spektralna kwasu usninowego

Analizę spektralną ^1H - i ^{13}C -NMR przeprowadzono dzięki współpracy z Wydziałem Farmacji Uniwersytetu Islandzkiego w Reykjavíku. Próbkę do badań rozpuszczano w deuterowanym chloroformie.

Wyniki:

Analiza spektralna wykonanych widm ^1H - i ^{13}C -NMR wykazała zgodność z danymi literaturowymi [König 1999, Rashid 1999, Campanella 2002].

Zestawienie sygnałów ^{13}C -NMR dla wyizolowanego związku z danymi literaturowymi dla kwasu usninowego przedstawia Tabela 31. Graficzne przyporządkowanie sygnałów dla poszczególnych atomów węgla przedstawia Rycina 18. Widmo ^{13}C -NMR dla wyizolowanej substancji przedstawia Rycina 19

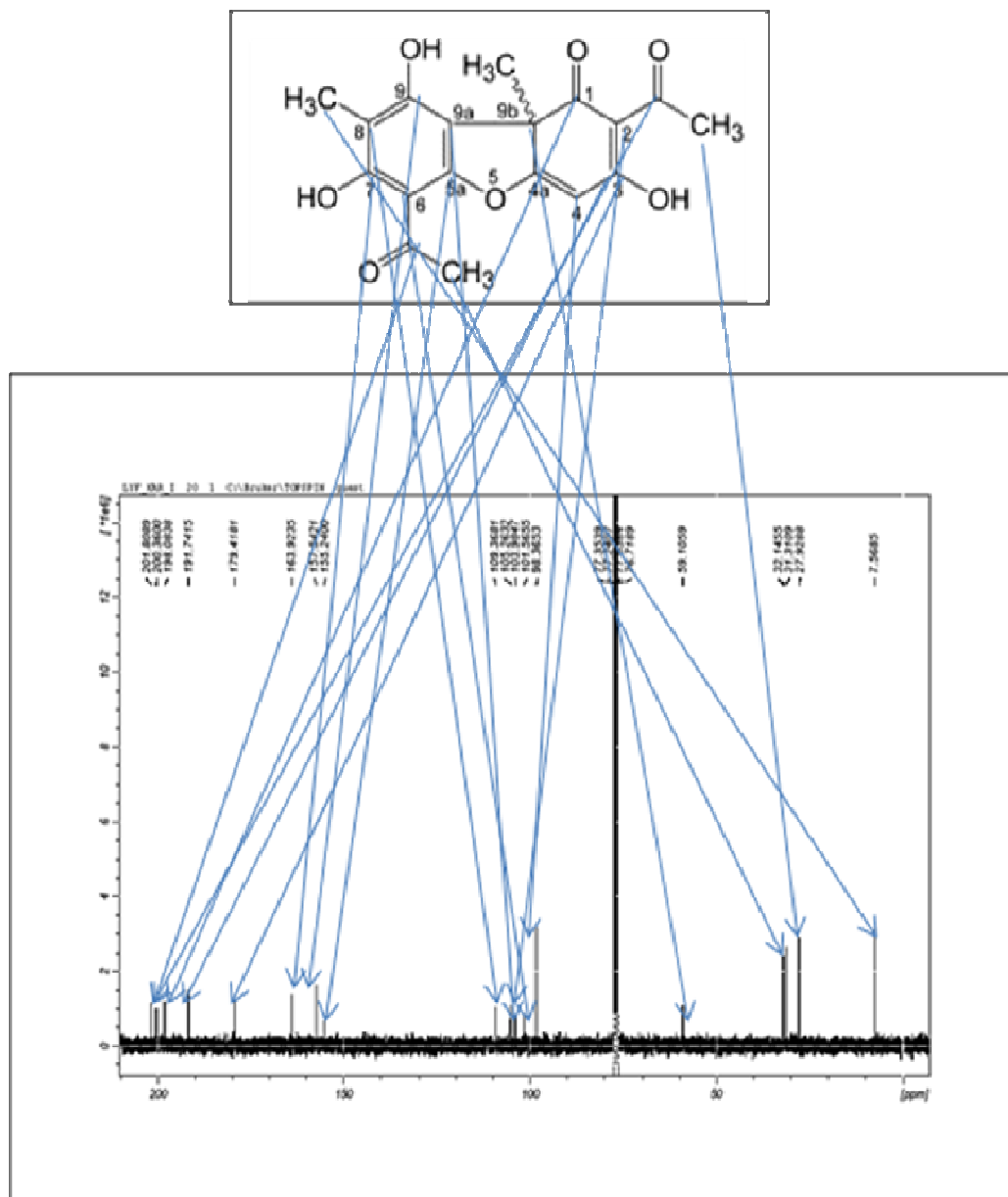
Zestawienie sygnałów ^1H -NMR dla wyizolowanego związku z danymi literaturowymi dla kwasu usninowego przedstawia Tabela 33. Graficzne przyporządkowanie sygnałów dla poszczególnych atomów wodoru przedstawia Rycina 20. Widmo ^1H -NMR dla wyizolowanej substancji przedstawia Rycina 21

Na podstawie danych chromatograficznych, spektralnych oraz wyglądu substancji i jej temperatury topnienia stwierdzono, że wyizolowanym związkiem jest kwas usninowy.

Tabela 32. Zestawienie sygnałów ^{13}C -NMR dla wyizolowanego związku z danymi literaturowymi dla kwasu usninowego.

numer atomu węgla	kwas usninowy wzor- cowy [König 1999] δ [ppm]	kwas usninowy wyizolowany δ [ppm]
1	198.1	198.08
2	105.3	104.00
3	191.8	191.74
4	98.4	98.65
5	178.4	179.42
6	155.2	155.24
7	101.6	101.57
8	163.9	163.92
9	109.4	109.37
10	157.6	157.54
11	104.0	105.26
12	59.1	59.11
13	32.2	32.1455
14	201.8	201.81
15	27.9	27.93
16	7.6	7.57
17	200.4	200.36
18	31.3	31.31

Rycina 18. Graficzne przyporządkowanie sygnałów ^{13}C -NMR dla poszczególnych atomów węgla wyizolowanego kwasu usninowego.



Rycina 19. Widmo ^{13}C -NMR wyizolowanego kwasu usninowego

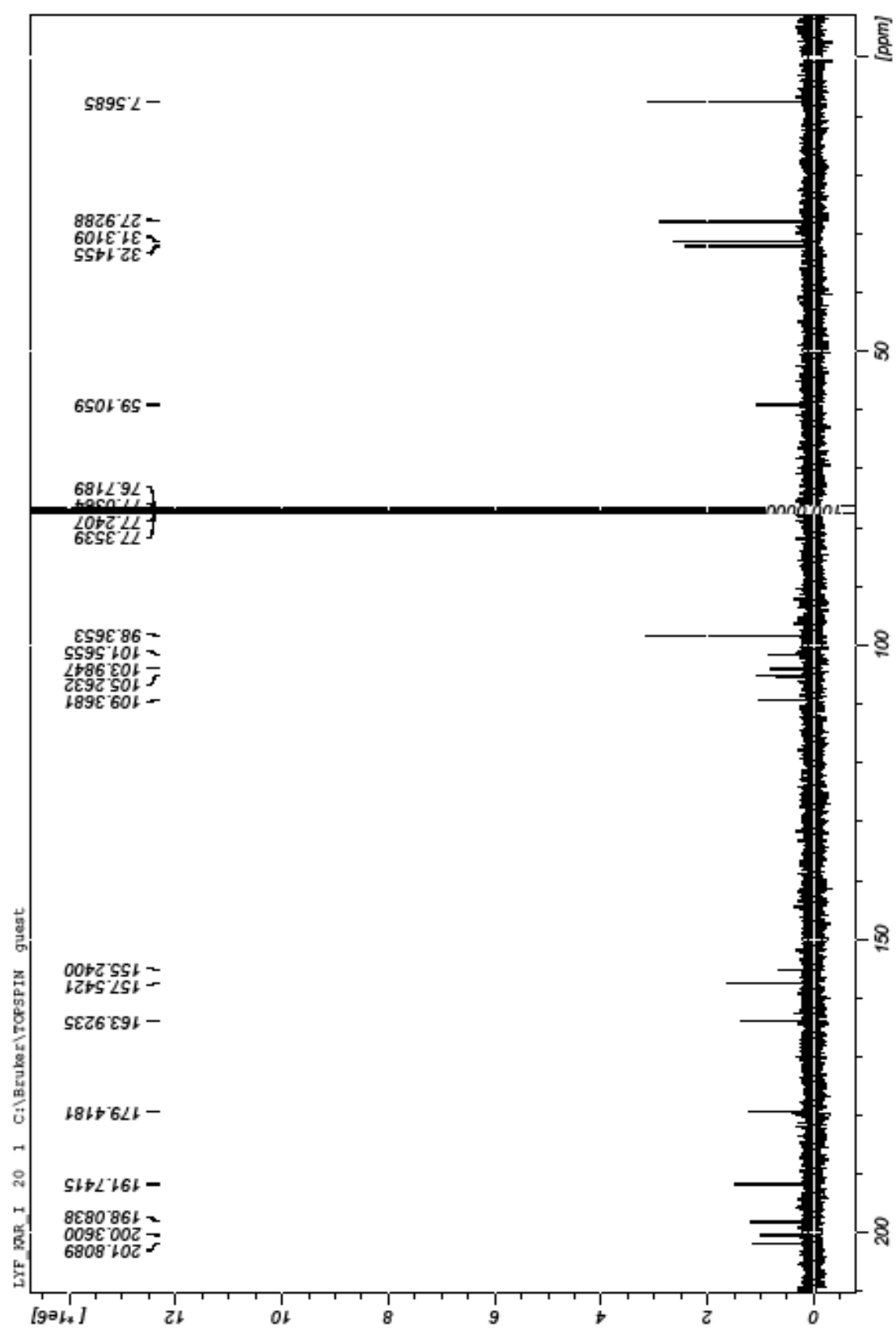
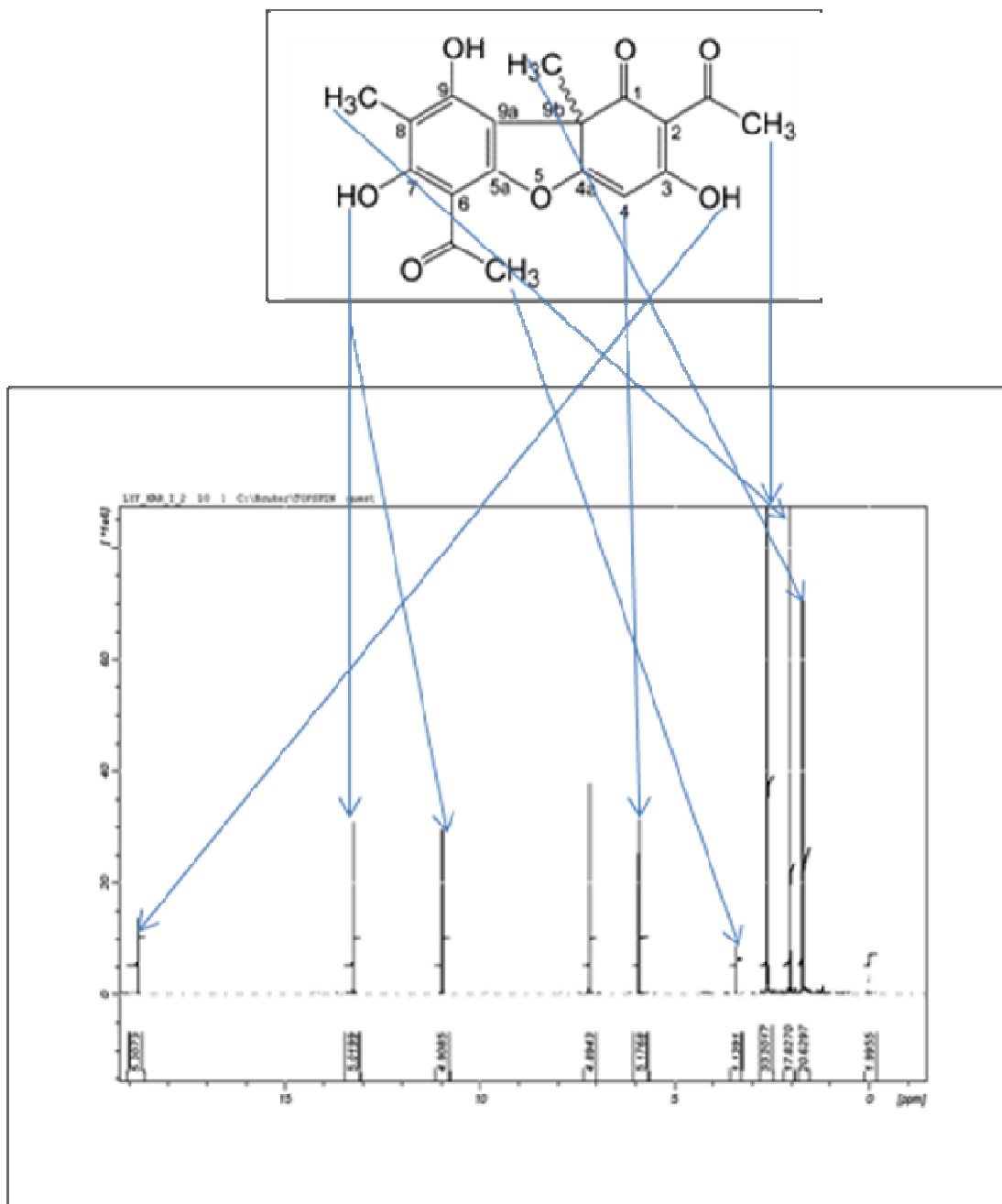


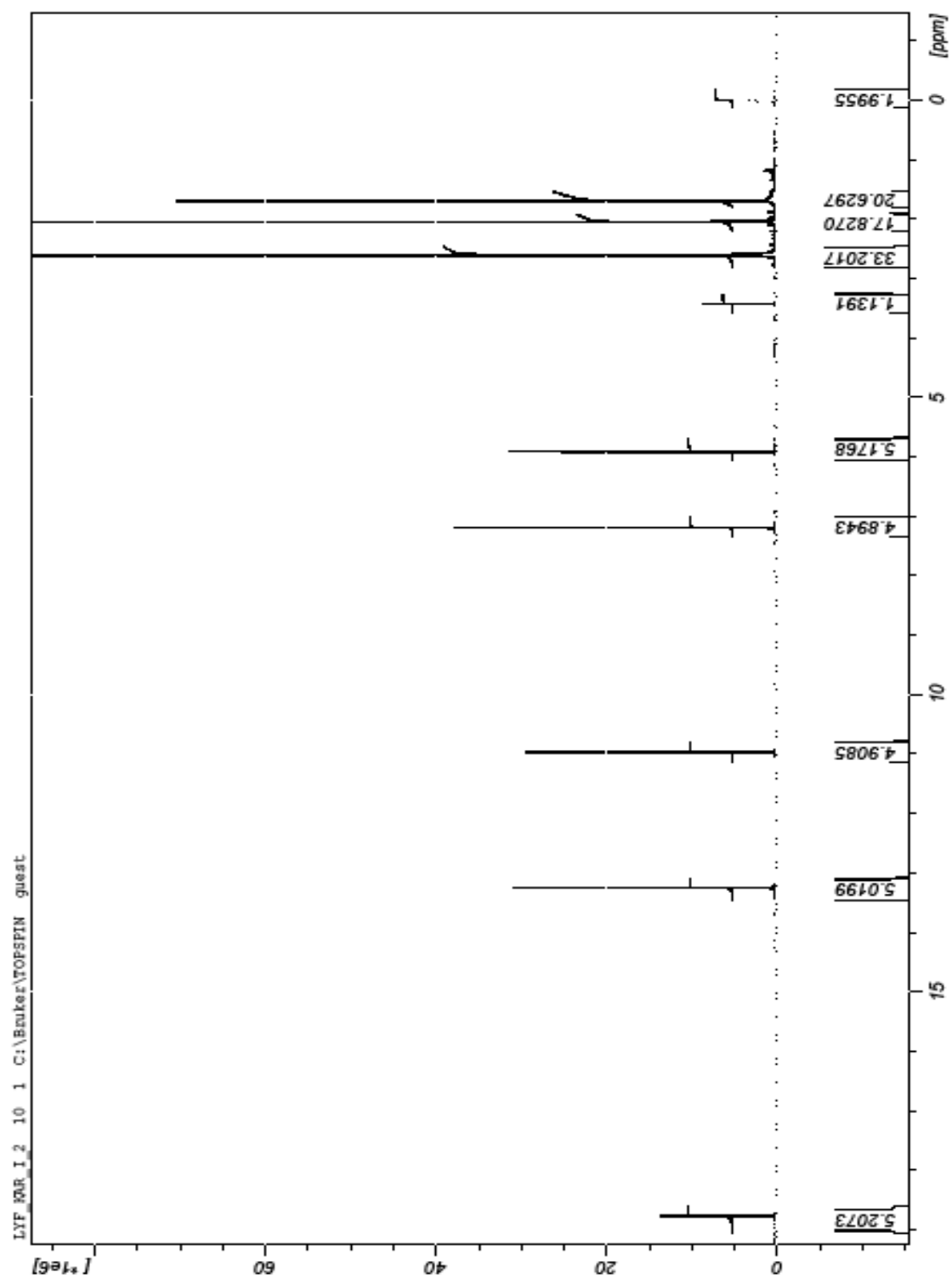
Tabela 33. Zestawienie sygnałów ^1H -NMR dla wyizolowanego związku z danymi literaturowymi dla kwasu usninowego

atom wodoru	kwas usninowy wzor- cowy [König 1999] δ [ppm]	kwas usninowy wyizolowany δ [ppm]
3H, Me-13	1.75	1.69
3H, Me-12	2.10	2.04
3H, Me-15	2.66	2.60
3H, Me-18	2.67	2.61
1H, H-4	5.92	5.91
1H, C-9-OH	11.02	10.96
1H, C-7-OH	13.31	13.25
1H, C-3-OH	18.84	18.77

Rycina 20. Graficzne przyporządkowanie sygnałów ^1H -NMR dla poszczególnych atomów wodoru wyizolowanego kwasu usninowego.



Rycina 21. Widmo ^1H -NMR wyizolowanego kwasu usninowego



7.5.2. Izolacja atranoryny

Wykonanie:

Odważono 50 g zmielonego surowca o największej zawartości atranoryny (*C. macilenta ssp. floerkeana*) i przeniesiono do bibułowej gilzy, którą umieszczono w aparacie Soxhleta i ekstrahowano wyczerpująco heksanem a następnie, po wysuszeniu surowca, chloroformem. W obrazie TLC wyciągu chloroformowego zaobserwowano plamę, odpowiadającą kolorem i wartością R_f atranorynie.

Wyciąg chloroformowy oczyszczano metodą cienkowarstwowej chromatografii preparatywnej, na płytkach szklanych pokrytych żelem krzemionkowym, w fazie ruchomej toluen-kwas octowy 170:30. Zagęszczony wyciąg наносzono pasmowo na płytki chromatograficzne. Po rozwinięciu i wysuszeniu chromatogramów, paski żelu, zawierające atranorynę zdejmowano, przenoszono do osobnych zlewek, trzykrotnie eluowano chloroformem i zlewano nadsącz, który następnie sączono przez sączki twarde. Frakcje z poszczególnych chromatogramów, zawierające atranorynę, łączono ze sobą na podstawie obrazu TLC.

Wyniki:

W wyniku izolacji uzyskano 5 mg bezpostaciowej, bezbarwnej substancji. Kochromatografia TLC z wzorcem wskazała, że otrzymaną substancja jest najprawdopodobniej atranoryna - zarówno zabarwienie plamy, jak i jej R_f były zgodne z substancją wzorcową. Podobnie kochromatografia HPLC wskazała na zgodność czasów retencji wzorca atranoryny i wyizolowanej substancji. Wyizolowany związek charakteryzował się temperaturą topnienia 189-195°C, zgodną z danymi literaturowymi [Culberson 1979].

Ze względu na bardzo małą wydajność izolacji oraz niewielką zawartość atranoryny w materiale roślinnym, nie udało się uzyskać więcej substancji. Stąd też podjęto decyzję o potwierdzeniu tożsamości wyizolowanej substancji jedynie za pomocą metod chromatograficznych (TLC, HPLC), z pominięciem analizy spektralnej.

Na podstawie danych chromatograficznych, oraz wyglądu i temperatury topnienia stwierdzono, że wyizolowaną substancją jest najprawdopodobniej atranoryna, jednak zawierała ona domieszki innych substancji.

7.5.3. Izolacja kwasu fumaroprotocetrarowego

Wykonanie:

Odważono 50 g rozdrobnionego surowca o największej zawartości kwasu fumaroprotocetrarowego (*C. macilenta ssp. floerkeana*). Surowiec ekstrahowano 200 ml metanolu w temperaturze pokojowej przez 24 h. Następnie rozpuszczalnik zdekantowano i zagęszczono do sucha na wyparce próżniowej. Suchą pozostałość rozpuszczono w 100 ml gorącej wody. Po ostudzeniu wodny roztwór trzykrotnie ekstrahowano w rozdzielaczu heksanem a następnie octanem etylu.

Uzyskaną frakcję octanową oczyszczano metodą cienkowarstwowej chromatografii preparatywnej, na ręcznie przygotowanych płytkach szklanych pokrytych żelem krzemionkowym, w fazie ruchomej chloroform-metanol-kwas mrówkowy 97:5:1. Frakcję octanową наносzono pasmowo na płytki chromatograficzne. Po rozwinięciu i wysuszeniu chromatogramów,

paski żelu, zawierające kwas fumaroprotocetrarowy zdejmowano, przenoszono do osobnych zlewek, trzykrotnie eluowano acetonem i zlewano nadsącz, który następnie sączono przez sączki twarde. Frakcje z poszczególnych chromatogramów, zawierające kwas fumaroprotocetrarowy, łączono ze sobą na podstawie obrazu TLC.

Wyniki:

W wyniku izolacji uzyskano 80 mg bezpostaciowej, bezbarwnej substancji. Kochromatografia TLC z wzorcem wskazała, że otrzymaną substancją jest najprawdopodobniej kwas fumaroprotocetrarowy - zarówno zabarwienie plamy, jak i jej R_f były zgodne z substancją wzorcową. Podobnie kochromatografia HPLC wykazała zgodność czasów retencji wzorcowego kwasu fumaroprotocetrarowego i otrzymanej substancji. Wyizolowany związek charakteryzował się temperaturą topnienia 249-252 °C, zgodną z danymi literaturowymi [Culberson 1979].

7.5.3.1. Analiza spektralna kwasu fumaroprotocetrarowego

Analizę spektralną ^1H - i ^{13}C -NMR przeprowadzono dzięki współpracy z Wydziałem Farmacji Uniwersytetu Islandzkiego w Reykjavíku. Próbkę do badania rozpuszczano w deuterowanym dimetylosulfotlenku.

Wyniki:

Analiza spektralna wykonanego widma ^1H -NMR wykazała zgodność z danymi literaturowymi [Su2003].

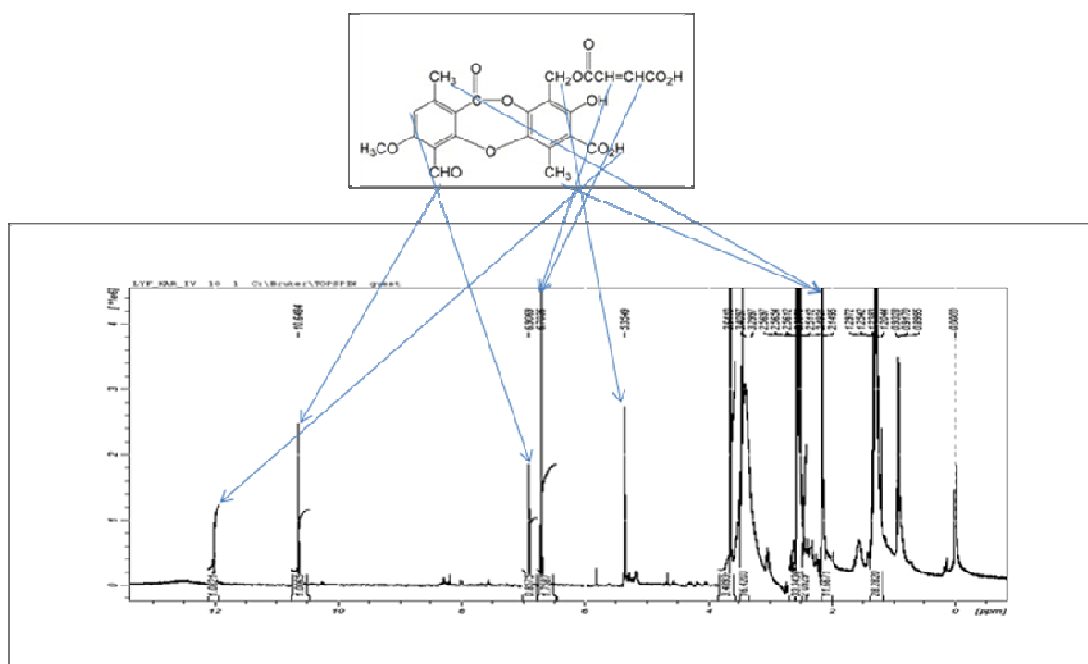
Zestawienie sygnałów ^1H -NMR dla wyizolowanego związku z danymi literaturowymi dla kwasu usninowego przedstawia Tabela 34. Graficzne przyporządkowanie sygnałów dla poszczególnych atomów wodoru przedstawia Rycina 22. Widmo ^1H -NMR dla wyizolowanej substancji przedstawia Rycina 23.

Na podstawie danych chromatograficznych, spektralnych, oraz wyglądu i temperatury topnienia stwierdzono, że wyizolowaną substancją jest kwas fumaroprotocetrarowy.

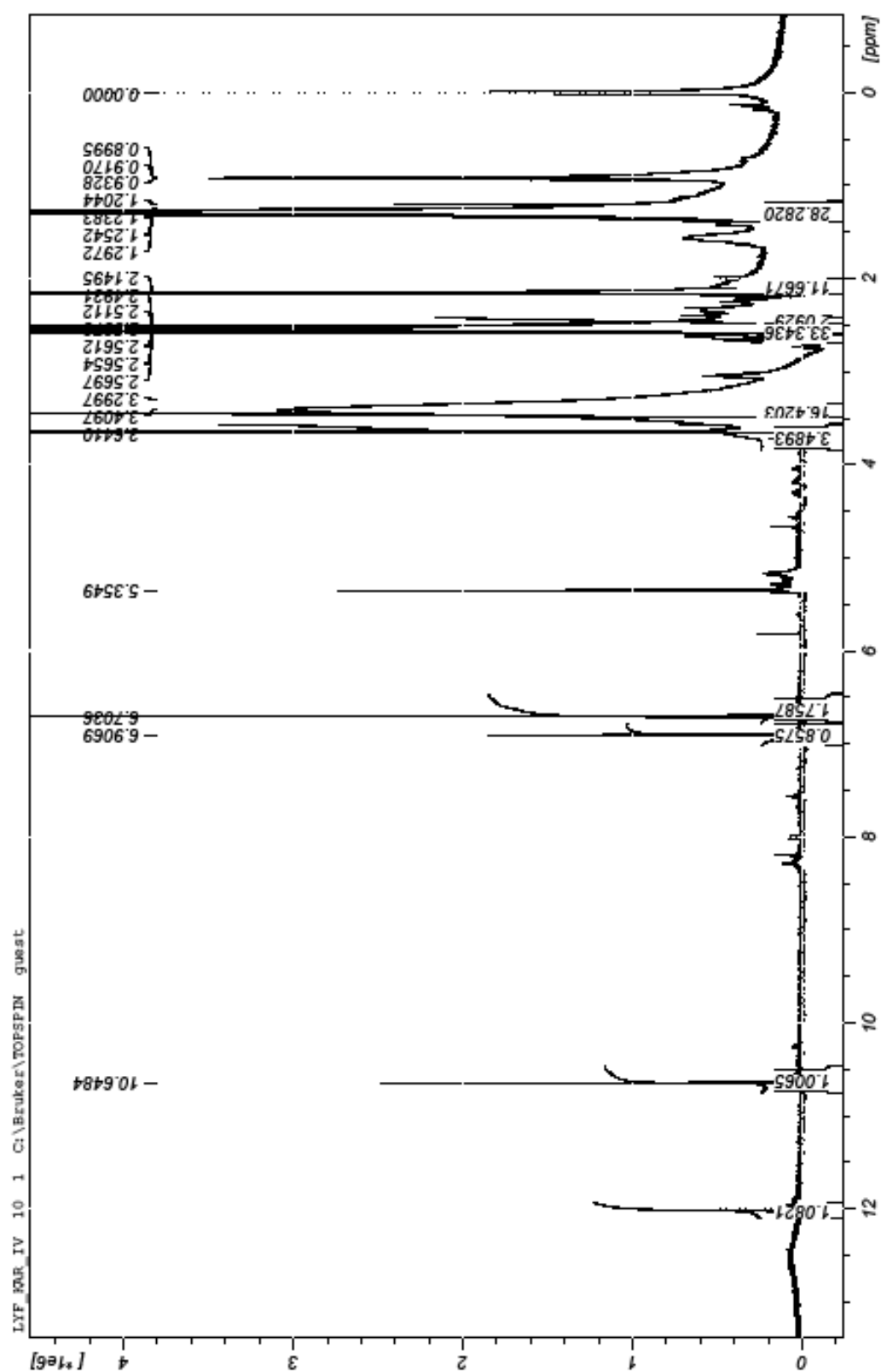
Tabela 34. Zestawienie sygnałów ^1H -NMR dla wyizolowanego związku z danymi literaturowymi dla kwasu fumaroprotocetrarowego

Atom wodoru	Kwas fumaroprotocetrarowy wzorcowy [Su 2003] δ [ppm]	Kwas fumaroprotocetrarowy wyizolowany δ [ppm]
1H, COOH	12.50	Brakuje
1H, Ar-OH lub COOH	11.97	11.80
1H, CHO	10.58	10.64
1H, H-5	6.85	6.90
2H, H-2" i H-3"	6.65	6.70
2H, H ₂ -9'	5.31	5.35
3H, Me-8	2.44	2.49
3H, Me-8'	2.46	2.41

Rycina 22. Graficzne przyporządkowanie sygnałów ^1H -NMR dla poszczególnych atomów wodoru wyizolowanego kwasu usninowego.



Rycina 23. Widmo ^1H -NMR dla wyizolowanego kwasu fumaroprotocetrarowego



7.6. Aktywność biologiczna

7.6.1. Przygotowanie hodowli komórkowych do badań

Badania aktywności biologicznej wyizolowanych (kwas usninowy, kwas fumaroprotocetrarowy) lub komercyjnie zakupionych (atranoryna) metabolitów porostowych przeprowadzono na następujących liniach komórkowych:

- a) ludzkie komórki czerniaka linii HTB 140
- b) ludzkie komórki nowotworu prostaty linii Du 145
- c) fibroblasty skóry ludzkiej HSF

Komórki hodowano w naczyniach hodowlanych, w odpowiednich dla nich pożywkach (patrz spis odczynników), w inkubatorze w temperaturze 37°C i atmosferze zawierającej 5% CO₂ oraz stałą wilgotnością. Wszystkie pożywki wzbogacone były dodatkiem 10% surowicy bydlęcej oraz antybiotykami. Płyn hodowlany zmieniano co 2 dni na świeży.

W momencie utworzenia przez komórki warstwy określanej jako monolayer komórki poddawano pasażowaniu. W tym celu płyn znad komórek zlewano a komórki przepłukiwano dwukrotnie ciepłym roztworem PBS bez dodatku jonów. Po zlaniu PBS komórki traktowano 1 ml trypsyny przez około 1 minutę, aż do oderwania się komórek od ścian naczynia. Następnie dodawano taką samą ilość płynu hodowlanego, odpowiedniego dla danej linii komórkowej i tak przygotowaną zawiesinę komórek przenoszono do probówki wirówkowej i wirowano przez 10 minut przy 1000 obrotów/minutę. Po odwirowaniu zlewano nasącz a komórki zawieszano w 1 ml odpowiedniego płynu hodowlanego, delikatnie je rozpipetowując. Komórki liczono w hemocytometrze Bürkera i wysiewano do naczyń hodowlanych, na płytki wielodołkowe lub szalki Petriego w zadanych gęstościach.

7.6.2. Przygotowanie roztworów do badań

Na wadze analitycznej odważono dokładnie około 10 mg kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego. Odważone substancje przeniesiono ilościowo do probówek typu eppendorf o objętości 1.5 ml i dodano po 1 ml acetonu. Następnie otrzymane roztwory rozcieńczono dziesięciokrotnie, dodając 100 µl badanego roztworu do 900 µl płynu hodowlanego, uzyskując tym samym stężenie 1mg/ml. Analogicznie przygotowano roztwór samego rozpuszczalnika (aceton).

7.6.3. Wpływ badanych związków na żywotność komórek

Wykonanie:

Komórki z naczyń hodowlanych poddawano pasażowaniu i wysiewano na płytki 24-dołkowe w gęstości 4000/cm². Po upływie 24 h od wysiania komórek zmieniano płyn hodowlany na świeży z dodatkiem badanych substancji w stężeniach 5, 10, 25, 50 µg/ml (kwas usninowy) lub 5, 10, 20, 30 µg/ml (atranoryny, kwas fumaroprotocetrarowy) lub bez dodatku badanych substancji (kontrola pozytywna). Przeprowadzono również badanie dla roztworu rozpusz-

czalnika (aceton). Komórki inkubowano z badanymi substancjami przez 24 i 48 h. Po tym czasie żywotność komórek określano dwiema metodami: testem z błękitem trypanu (TB) oraz testem z wykorzystaniem diocjanu fluoresceiny i bromku etydyny (FDA/EtBr). Komórki liczone pod odwróconym mikroskopem jasnego pola (TB) lub mikroskopem kontrastowo-fazowym z przystawką do epifluorescencji (FDA/EtBr), określając ilość żywych komórek na 100 w polu widzenia. Każde doświadczenie powtarzano trzykrotnie.

Wyniki:

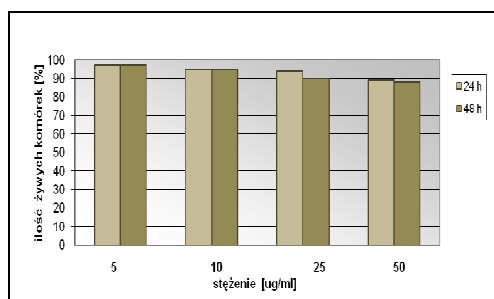
Wpływ kwasu usninowego na żywotność komórek HTB140, Du145 oraz HSF przedstawia Tabela 35 oraz Rycina 24. Wpływ atranoryny na żywotność komórek HTB140, Du145 oraz HSF przedstawia Tabela 36 oraz Rycina 25. Wpływ kwasu fumaroprocettrarowego na żywotność komórek HTB140, Du145 oraz HSF przedstawia Tabela 37 oraz Rycina 26.

Tabela 35. Wpływ kwasu usninowego na żywotność komórek HTB-140, Du145 i HSF

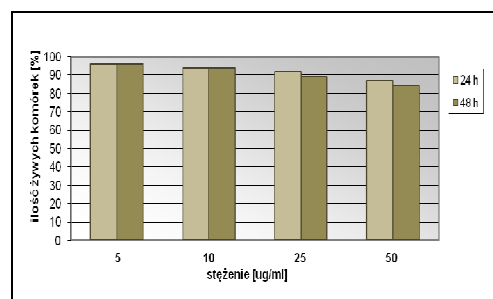
STĘŻENIE [µg/ml]	ŚREDNIA LICZBA ŻYWYCH KOMÓREK [%]					
	HTB-140		Du145		HSF	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
0	99.0 ±0.9	98.7 ±0.9	98.7 ±1.1*	98.7 ±0.9	99.1 ±0.8	99.0 ±1.0
5	97.1 ±1.2	97.2 ±1.0	96.2 ±1.2	96.7 ±0.9	97.7 ±1.1	97.0 ±0.7
10	95.3 ±2.8*	95.5 ±1.7*	94.2 ±1.4*	93.7 ±1.3*	96.1 ±0.9*	94.8 ±1.1*
25	89.3 ±3.6*	92.3 ±0.9*	92.3 ±1.4*	89.2 ±1.9*	93.9 ±0.9*	92.3 ±0.9*
50	88.2 ±2.3*	86.6 ±4.7*	87.5 ±2.2*	84.1 ±2.7*	92.0 ±1.2*	88.1 ±1.3*

Przy wartościach podano błąd standardowy średniej. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) oznaczone są *

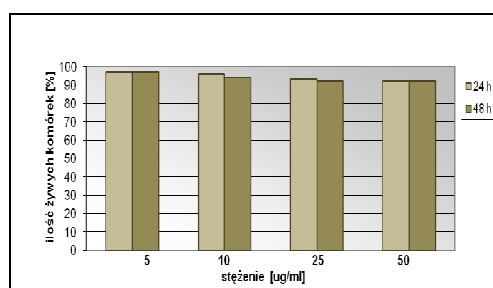
Rycina 24. Wpływ kwasu usninowego na żywotność komórek HTB140 (A), Du145 (B) i HSF (C)



A



B



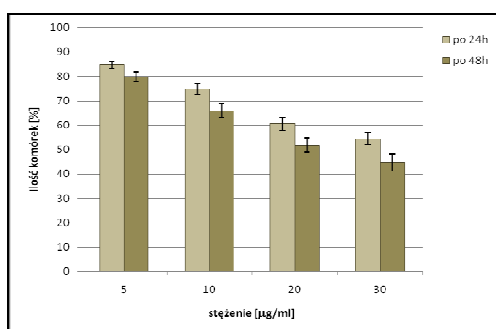
C

Tabela 36. Wpływ atranoryny na żywotność komórek HTB140, Du145 oraz HSF

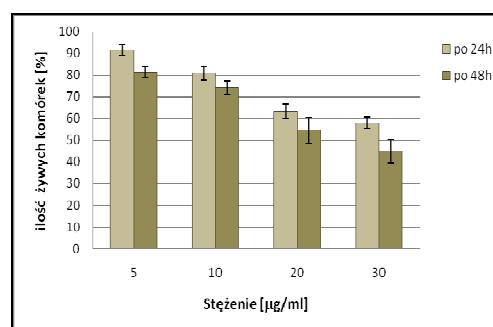
stężenie [μg/ml]	ŚREDNIA LICZBA ŻYWYCH KOMÓREK [%]					
	HTB-140		Du145		HSF	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
0	99.0 ±0.9	98.7 ±0.9	98.7 ±1.1	98.7 ±0.9	99.1 ±0.8	99.0 ±1.0
5	84.67±2.16*	79.83±2.86*	91.50±3.22*	81.33±3.08*	98.50±1.97	98.00±2.28
10	74.83±2.64*	66.00±3.03*	81.00±3.56*	74.17±5.93*	96.50±2.59*	94.33±2.58*
20	60.50±2.88*	51.83±4.35*	63.17±5.96*	54.50±4.75*	93.50±2.26*	92.00±1.79*
30	54.5±2.43*	44.67±3.20*	58.00±4.22*	45.00±4.98*	91.33±2.07*	90.33±1.37*

Przy wartościach podano błąd standardowy średniej. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) oznaczone są *

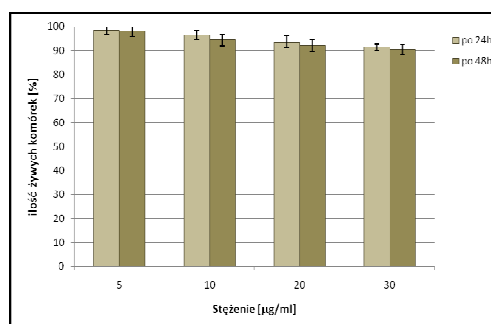
Rycina 25. Wpływ atranoryny na żywotność komórek HTB-140 (A), Du145 (B) i HSF (C)



A



B



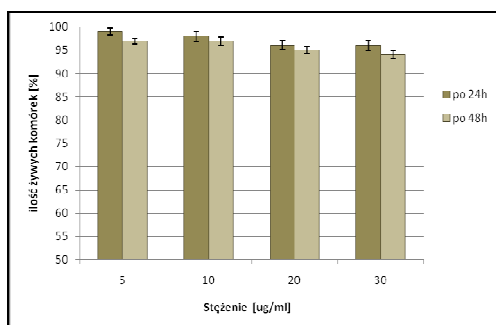
C

Tabela 37. Wpływ kwasu fumaroprotocetrarowego na żywotność komórek HTB140, Du145 i HSF

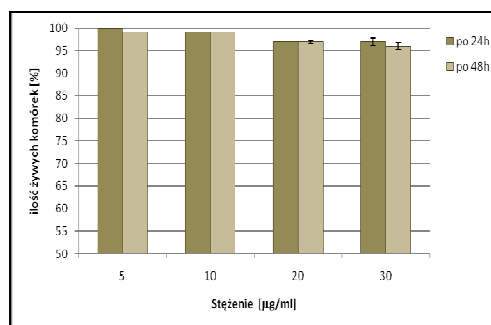
stężenie [µg/ml]	ŚREDNIA LICZBA ŻYWYCH KOMÓREK [%]					
	HTB-140		Du145		HSF	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
0	99.0 ±0.9	98.7 ±0.90	98.7 ±1.10	98.70 ±0.90	99.10 ±0.80	99.00 ±1.00
5	99.00±1.10	97.00±0.90	100.00±0.00	99.00±0.41	100.00±1.10	100.00±0.90
10	98.00±1.00	97.00±0.80	99.00±0.82	99.00±0.82	100.00±1.00	100.00±0.80
20	96.00±0.56*	95.00±0.57*	97.00±1.55*	97.00±1.37*	99.00±0.55	99.00±0.55
30	96.00±1.09*	94.00±1.00*	97.00±1.97*	96.00±1.75*	99.00±1.09	99.00±1.00

Przy wartościach podano błąd standardowy średniej. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) oznaczone są *

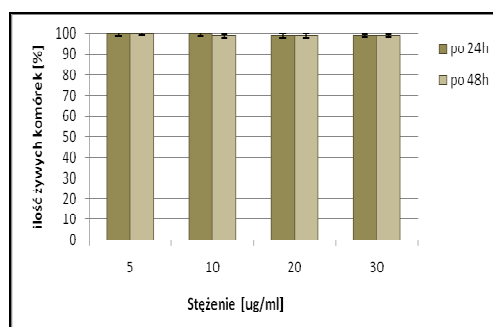
Rycina 26. Wpływ kwasu fumaroprotocetrarowego na żywotność komórek HTB140 (A), Du145 (B) i HSF (C)



A



B



C

7.6.4. Wpływ badanych związków na proliferację komórek

Wykonanie:

Komórki z naczyń hodowlanych poddawano pasażowaniu i wysiewano na płytki 24-dółkowe w gęstości 4000/cm². Po upływie 24 h od wysiania komórek zmieniano płyn hodowlany na świeży z dodatkiem badanych substancji w stężeniach 10, 25 i 50 µg/ml lub bez dodatku badanych substancji (kontrola pozytywna). Komórki inkubowano z badanymi substancjami przez 24, 48 i 72 h. Po tym czasie komórki odrywano od ścianek dołka przy pomocy roztworu trypsyny i określano ilość komórek w hemocytometrze Bürkera. Każde doświadczenie powtarzano trzykrotnie.

Wyniki:

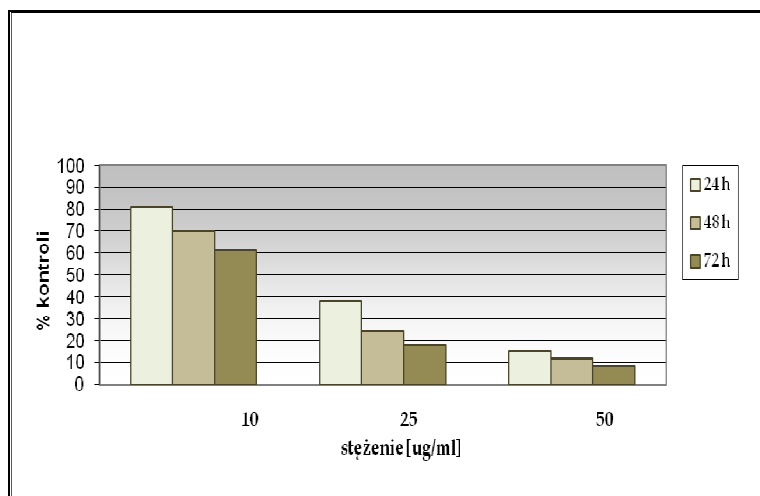
Wpływ kwasu usninowego na proliferację komórek HTB140, Du145 i HSF przedstawia Tabela 38 oraz Rycina 27. Wpływ atranoryny na proliferację komórek HTB140, Du145 i HSF przedstawia Tabela 39 oraz Rycina 28. Wpływ kwasu fumaroprotocetrarowego na proliferację komórek HTB140, Du145 i HSF przedstawia Tabela 40 oraz Rycina 29

Tabela 38. Wpływ kwasu usninowego na proliferację komórek HTB-140, Du145 i HSF

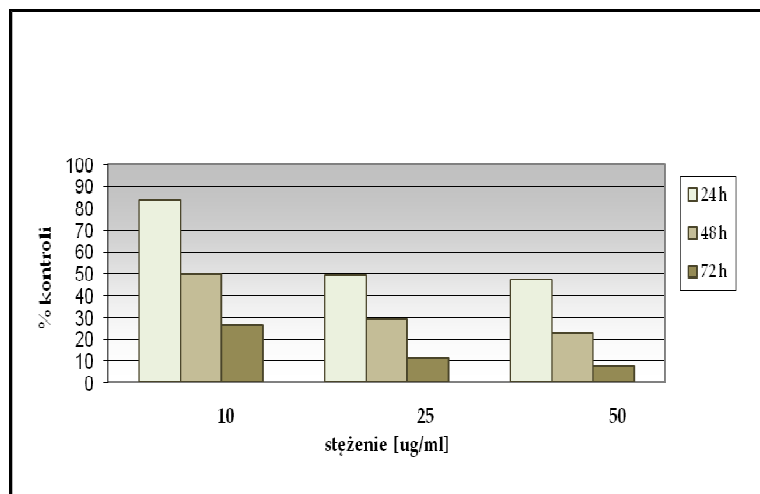
stężenie [µg/ml]	HTB140 średnia liczba komórek/dolek			Du145 średnia liczba komórek/dolek			HSF średnia liczba komórek/dolek		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
0	23849±2144	35088±3397	60376±1865	25905±2048	53043±1839	66612±1376	14186±1126	19942±431	23643±1064
10	19326±3391*	24740±547*	36870±1343*	21793±1424*	26110±1126*	31798±1516*	11102±2521*	14803±2601*	16447±1163*
25	9046±2494*	8429±769*	11033±1362*	12952±1533*	15419±1700*	15317±2355*	6579±1163*	8224±1400*	9046±2326*
50	3701±2398*	4180±839*	4797±888*	7401±1424*	5962±676*	5345±1040*	4112±1163*	5345±1685*	5757±1875*

Przy wartościach podano błąd standardowy średniej. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) oznaczone są *

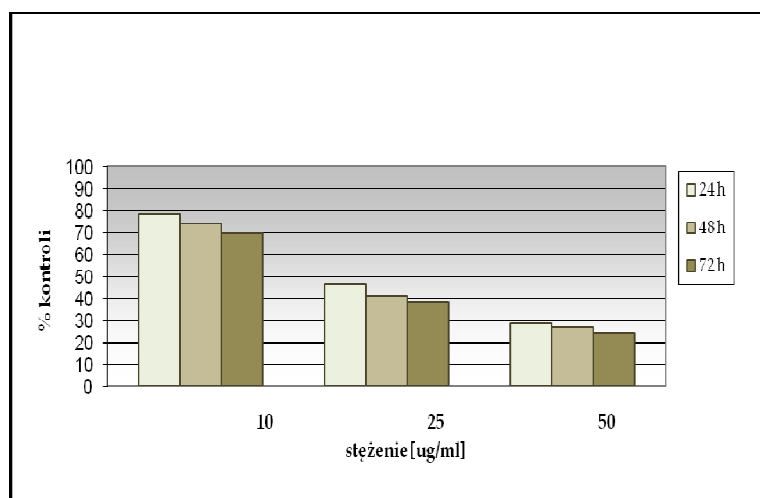
Rycina 27. Wpływ kwasu usninowego na proliferację komórek HTB-140 (A), Du145 (B) i HSF (C)



A



B



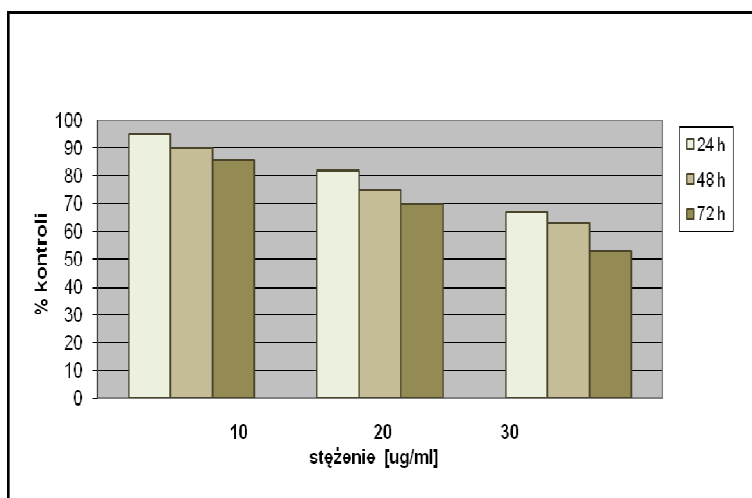
C

Tabela 39. Wpływ atranoryny na proliferację komórek HTB-140, Du145 i HSF

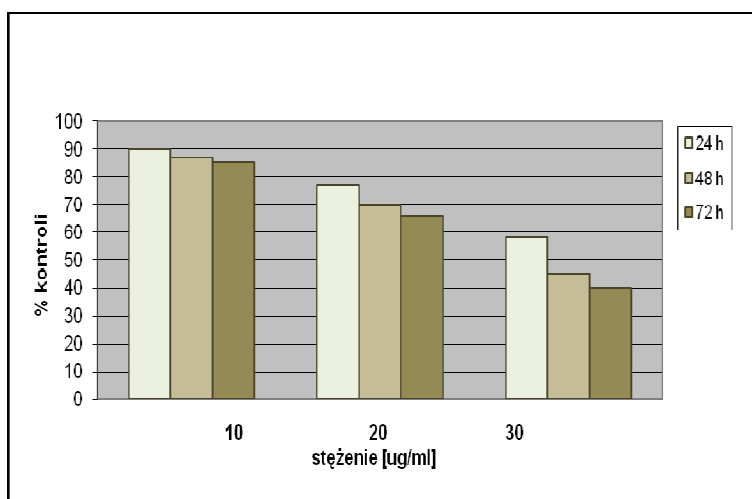
stężenie [µg/ml]	HTB140 średnia liczba komórek/dolek			Du145 średnia liczba komórek/dolek			HSF średnia liczba komórek/dolek		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
0	9148±638	16036 ±1035	23540±1588	10690±737	29399±1717	79975±4878	9662±787	12129±1034	20764±1410
10	8690±596	14432±1081	20244±1384*	9621±820	25577±1199*	67978±4025*	9457±822	11307±1031	19325±1254
20	7501±393*	12027 ±847*	16478±1439*	8231±514*	20579±1479*	52783±2662*	8840±785*	10485±751*	17886±1145*
30	6129±421*	10102 ±606*	12476±991*	6841± 499*	14699±831*	36788±2379*	8018±749*	9868±886*	16858±1317*

Przy wartościach podano błąd standardowy średniej. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) oznaczone są *

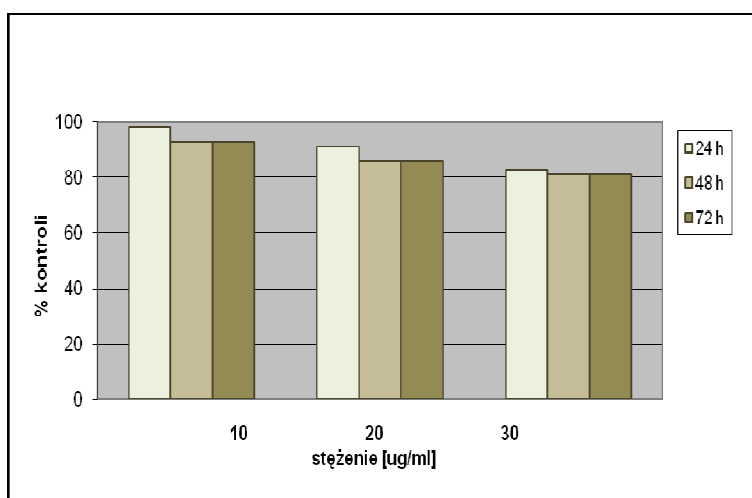
Rycina 28. Wpływ atranoryny na proliferację komórek HTB140 (A), Du145 (B) i HSF (C)



A



B



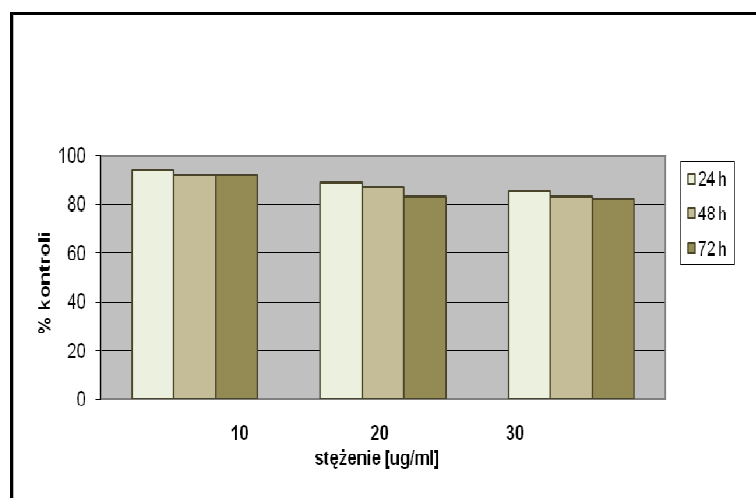
C

Tabela 40. Wpływ kwasu fumaroprotocetarowego na proliferację komórek HTB-140, Du145 i HSF

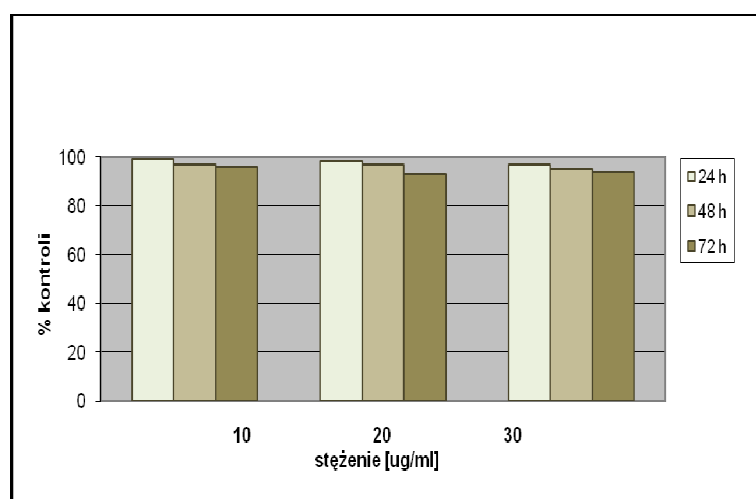
stężenie [µg/ml]	HTB140 średnia liczba komórek/dolek			Du145 średnia liczba komórek/dolek			HSF średnia liczba komórek/dolek		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
0	10896±226	31729±1434	59142±1828	24259±2614	62503±5977	113075±9765	6510±400	12198±668	17749±1164
10	10279±450	29331±1636	54413±1062*	24100±2613	62088±4553	109889±8223	6304±379	11855±870	17269±1330
20	9662±238*	27480±1895	49273±2151*	23701±2589	61060±4193	106188±10460	5962±409	11239±785	16652±1074
30	9320±319*	26452±1774*	48382±2247*	23541±2709	60649±3448	106085±8272	5688±432	10759±598	16310±1240

Przy wartościach podano błąd standardowy średniej. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) oznaczone są *

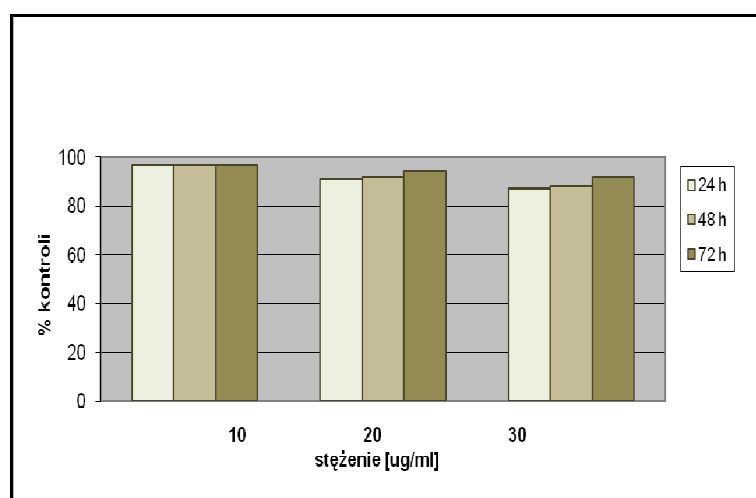
Rycina 29. Wpływ kwasu fumaroprotocetrarowego na proliferację komórek HTB140 (A), Du145 (B) i HSF (C)



A



B



C

7.6.5. Wpływ badanych związków na morfologię komórek

Badanie zmian morfologii komórek przeprowadzono przy współpracy z Zakładem Biologii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ.

Wykonanie:

Komórki z naczyń hodowlanych poddawano pasażowaniu i wysiewano na płytki 12-dolłkowe w gęstości 6000/cm². Po upływie 24 h od wysiania komórek zmieniano płyn hodowlany na świeży z dodatkiem badanych substancji w stężeniach 10 i 25 µg/ml lub bez dodatku badanych substancji (kontrola pozytywna). Komórki inkubowano z badanymi substancjami przez 48 h a następnie obserwowano pod mikroskopem kontrastowo-fazowym i zapisywano obrazy.

Wyniki:

Wpływ kwasu usninowego na morfologię komórek HTB-140, Du145 oraz HSF przedstawia Rycina 30, wpływ atranoriny - Rycina 31 B, C, a wpływ kwasu fumaroprotocetrarowego przedstawia Rycina 31 D, E.

7.6.6. Wpływ badanych związków na cytoszkielet aktynowy komórek

Badanie zmian w cytoszkiecie aktynowym przeprowadzono przy współpracy z Zakładem Biologii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ.

Wykonanie:

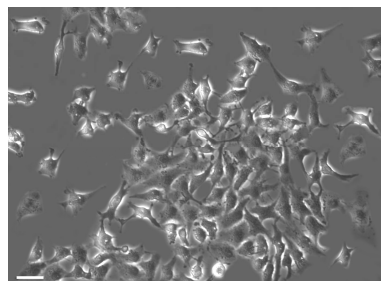
Komórki z naczyń hodowlanych poddawano pasażowaniu i wysiewano na płytki 12-dolłkowe, z umieszczonym na dnie mikroskopowym szkiełkiem nakrywkowym, w gęstości 8000/cm². Po upływie 24 h od wysiania komórek zmieniano płyn hodowlany na świeży z dodatkiem badanych substancji w stężeniach 10 i 25 µg/ml lub bez dodatku badanych substancji (kontrola pozytywna). Komórki inkubowano z badanymi substancjami przez 48 h. Następnie komórki przepłukiwano trzykrotnie roztworem PBS bez jonów wapnia i magnezu, utrwalano w 3.7% roztworze paraformaldehydu w temperaturze 37°C i powtórnie przepłukano roztworem PBS. W celu przeprowadzenia permabilizacji do utrwalonych komórek dodano 0.1% roztwór Tritonu X-100 i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie komórki barwiono falloidyną sprzężoną z izotiocyjanianem rodaminy (TRITC) o stężeniu 0.5 µg/ml przez 45 minut w temperaturze pokojowej, w komorach bez dostępu światła. Po inkubacji z barwnikiem szkiełka z komórkami przepłukiwano wodą destylowaną a następnie obserwowano pod odwróconym mikroskopem kontrastowo-fazowym z przystawką do epifluorescencji oraz w różnicowym kontraście interferencyjnym Nomarskiego i zapisywano obrazy.

Wyniki:

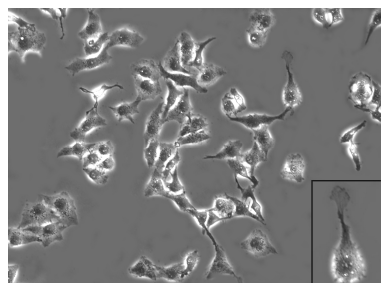
Wpływ kwasu usninowego na cytoszkielet aktynowy komórek HTB-140, Du145 oraz HSF przedstawia Rycina 32, wpływ atranoriny - Rycina 33.

Rycina 30. Wpływ kwasu usninowego na morfologię komórek HTB-140 (A - warunki kontrolne, D - inkubacja z 10 μ g/ml KU, G - inkubacja z 25 μ g/ml KU), Du145 (B - warunki kontrolne, E - inkubacja z 10 μ g/ml KU, H - inkubacja z 25 μ g/ml KU) oraz HSF (C - warunki kontrolne, F - inkubacja z 10 μ g/ml KU, I - inkubacja z 25 μ g/ml KU)

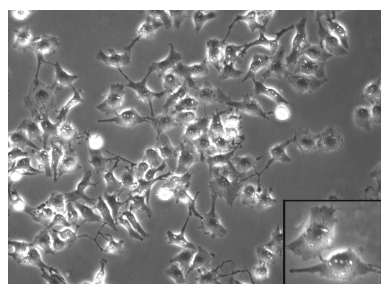
HTB-140



A

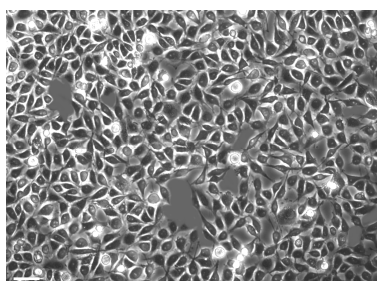


D

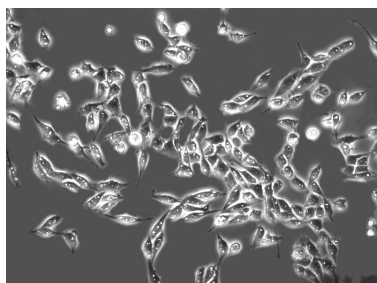


G

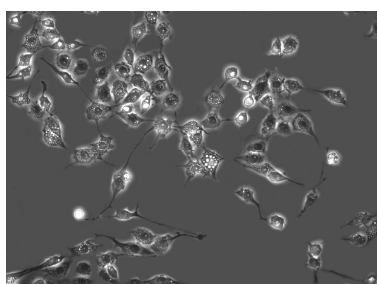
Du145



B

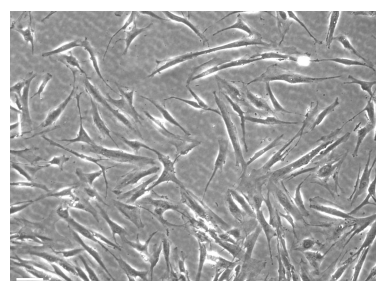


E

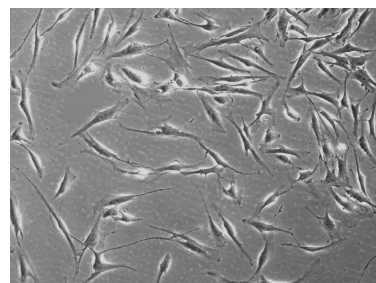


H

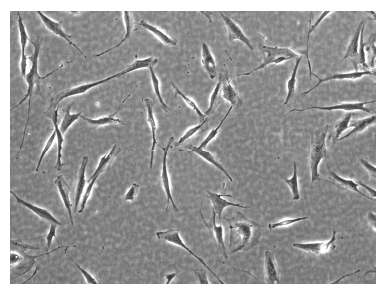
HSF



C

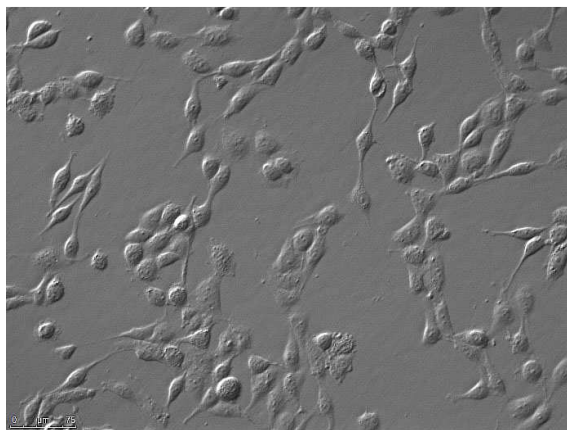


F

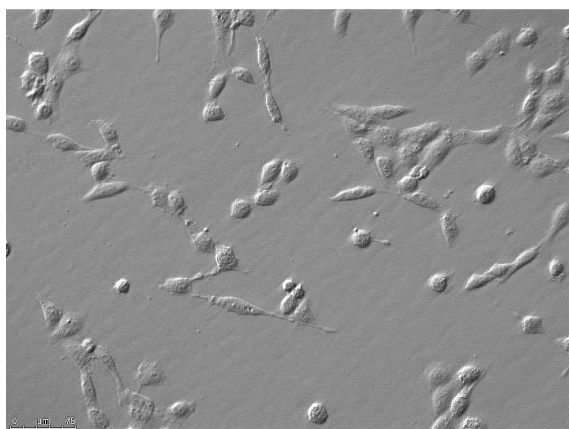


I

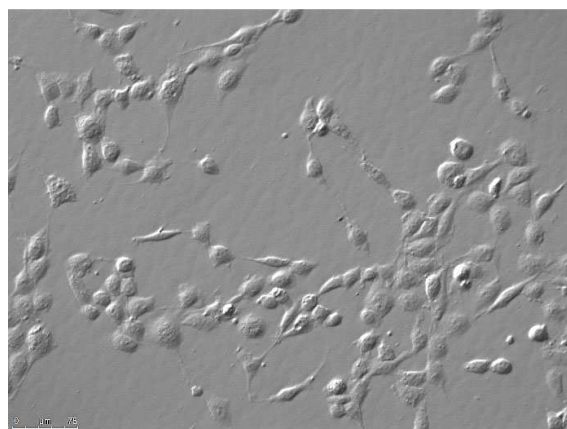
Rycina 31. Wpływ atranoryny (ATR) (A - warunki kontrolne, B - inkubacja z 10 μ g/ml ATR, C - inkubacja z 25 μ g/ml ATR) i kwasu fumaroprotocetrarowego (KF) (A - warunki kontrolne, D - inkubacja z 10 μ g/ml KF, E - inkubacja z 25 μ g/ml KF) na morfologię komórek Du145.



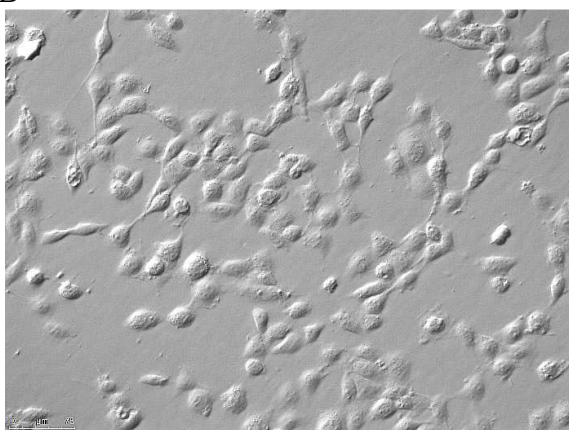
A



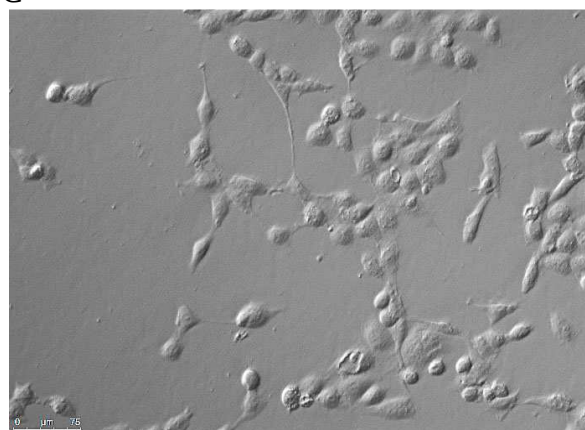
B



C

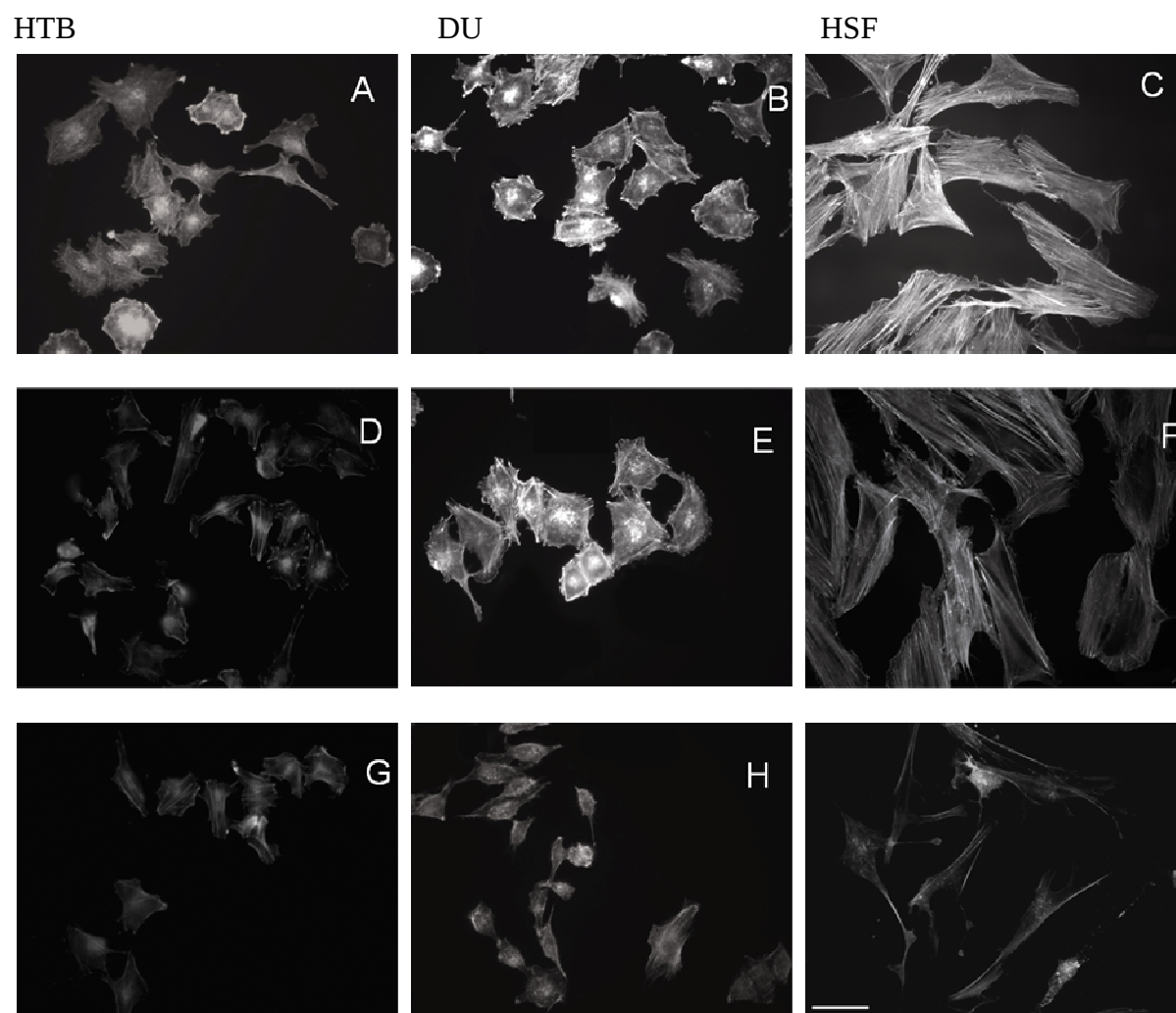


D

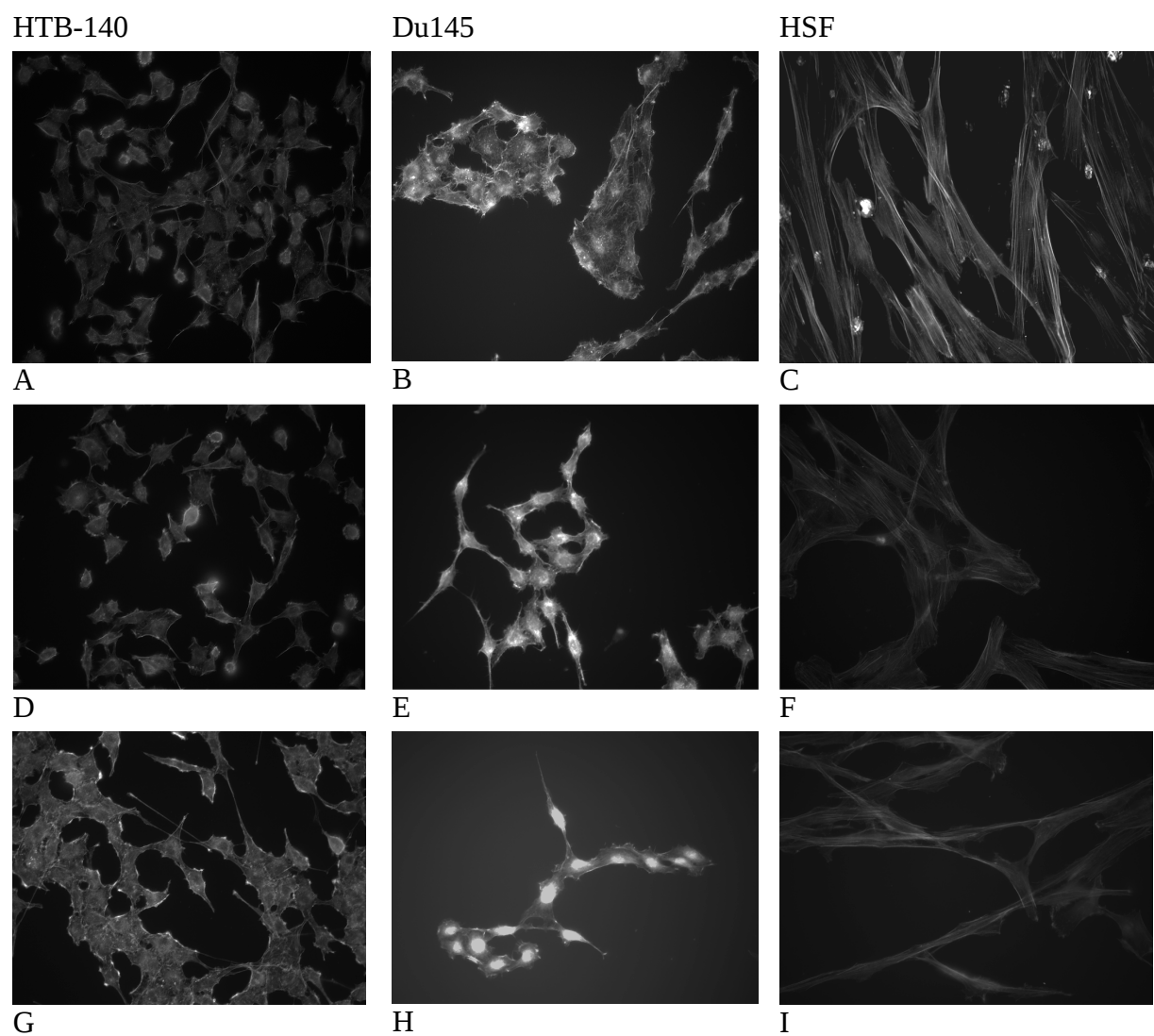


E

Rycina 32. Wpływ kwasu usninowego (KU) na cytoszkielet aktynowy komórek HTB-140 (A - warunki kontrolne, D - inkubacja z 10 μ g/ml KU, G - inkubacja z 25 μ g/ml KU), Du145 (B - warunki kontrolne, E - inkubacja z 10 μ g/ml KU, H - inkubacja z 25 μ g/ml KU) oraz HSF (C - warunki kontrolne, F - inkubacja z 10 μ g/ml KU, I - inkubacja z 25 μ g/ml KU)



Rycina 33. Wpływ atranoryny (ATR) na cytoszkielet aktynowy komórek HTB-140 (A - warunki kontrolne, D - inkubacja z 10 μ g/ml ATR, G - inkubacja z 25 μ g/ml ATR), Du145 (B - warunki kontrolne, E - inkubacja z 10 μ g/ml ATR, H - inkubacja z 25 μ g/ml ATR) oraz HSF (C - warunki kontrolne, F - inkubacja z 10 μ g/ml ATR, I - inkubacja z 25 μ g/ml ATR)



7.6.7. Wpływ badanych związków na aktywność migracyjną komórek nowotworowych

Badanie zmian aktywności migracyjnej komórek przeprowadzono przy współpracy z Zakładem Biologii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ.

Wykonanie:

Komórki z naczyń hodowlanych poddawano pasażowaniu i wysiewano do naczyń hodowlanych w gęstości $25000/\text{cm}^2$. Po upływie 24 h od wysiania komórek zmieniano płyn hodowlany na świeży z dodatkiem badanych substancji w stężeniu $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ lub bez dodatku badanych substancji (kontrola pozytywna). Rejestrację ruchu komórek przeprowadzano bezpośrednio po zmianie pożywki oraz 24 h po dodaniu badanego związku. Filmy nagrywano przez 420 minut, w temperaturze 37°C , przy użyciu odwróconego mikroskopu kontrastowo-fazowego, wyposażonego w kartę akwizycji obrazu oraz program VCR v.0.99. Odstęp między dwiema klatkami filmu wynosił 5 minut. Każdorazowo analizowano 45 komórek.

Filmy analizowano przy użyciu programu Migra v.1.1, umożliwiającego wyznaczenie trajektorii komórek w oparciu o zmiany ich położenia w kolejnych klatkach filmu. Położenie komórek było określane przez ręczne wyznaczenie centroidu (środką komórki) i zapisywane w pamięci komputera. Dla każdej komórki wyznaczano 84 kolejne położenia.

Pliki zawierające współrzędne ruchu analizowano w programie Mathematica, który umożliwia ilościowe wyznaczenie następujących parametrów, określających ruch komórek:

- całkowita długość przemieszczenia komórki (μm) - odległość mierzona z punktu początkowego ruchu komórki do jej końcowej pozycji,
- całkowita długość trajektorii ruchu komórki (μm) - suma prostoliniowych odcinków drogi jakie przebyła komórka w każdym odstępie czasowym pomiędzy kolejnymi klatkami filmu,
- średnia prędkość przemieszczenia ($\mu\text{m}/\text{min}$) - liczona z całkowitej długości przemieszczenia komórki w czasie,
- średnia prędkość ruchu ($\mu\text{m}/\text{min}$) - liczona z całkowitej długości drogi przebytej przez komórkę w określonym czasie,
- współczynnik efektywności ruchu (CME) - stosunek długości przemieszczenia do całkowitej długości trajektorii ruchu komórki.

Ruch komórek przedstawiano na wykresach kołowych, w których początek każdej trajektorii umieszczony jest w punkcie przecięcia osi wykresu.

Wyniki:

Wpływ kwasu usninowego na migrację komórek HTB-140 i Du145 przedstawia Rycina 34, wpływ atranoryny - Rycina 35. Parametry ruchu dla komórek HTB140 i Du 145 pod wpływem kwasu usninowego przedstawione są w Tabeli 41, dla komórek pod wpływem atranoryny Tabeli 42 i Tabeli 43.

Rycina 34. Wpływ kwasu usninowego (KU) na migrację komórek Du145 (A - warunki kontrolne, B - inkubacja z 10 μ g/ml KU, C - 24h preinkubacja z 10 μ g/ml KU) i HTB-140 (D - warunki kontrolne, E - inkubacja z 10 μ g/ml KU)

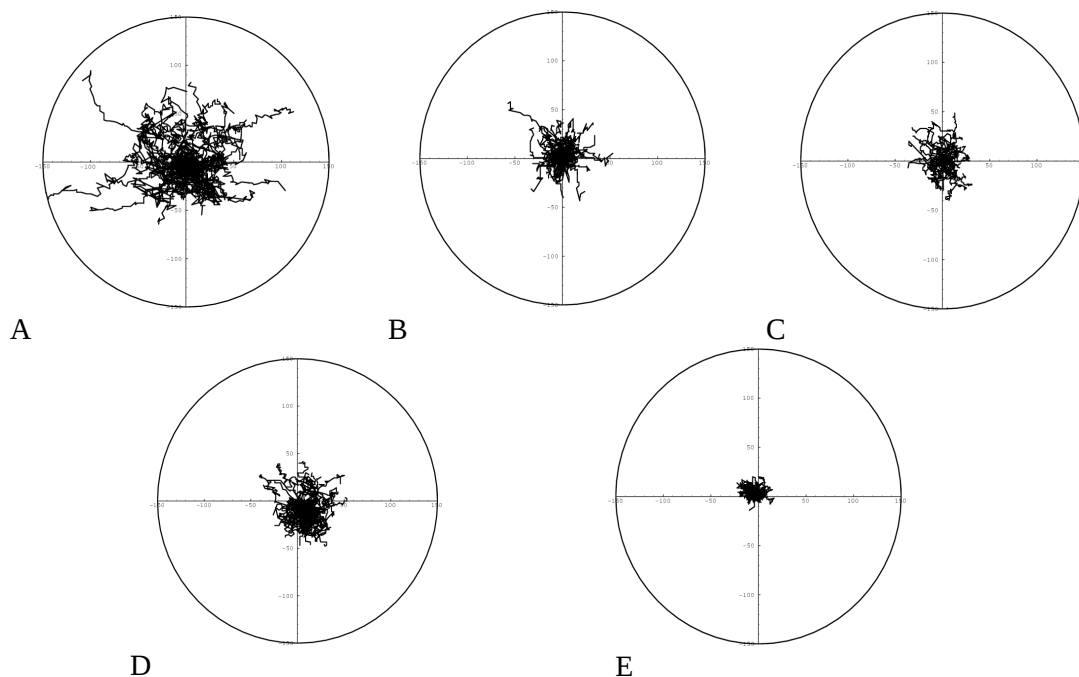


Tabela 41. Parametry ruchu komórek Du145 i HTB-140 pod wpływem kwasu usninowego.

Parametr ruchu	STĘŻENIE KWASU USNINOWEGO [μ g/ml]				
	0		10		10 (po 24h)
	Du145	HTB-140	DU145	HTB-140	Du145
Średnia droga całkowita [μ m]	243.28 $\pm$ 7.75	144.92 $\pm$ 4.53	92.67 $\pm$ 4.32*	65.57 $\pm$ 4.92 *	77.58 $\pm$ 6.76*
Średnia prędkość ruchu liczona z drogi [μ m/min]	0.57 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.05	0.15 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.02
Średnie przemieszczenie całkowite [μ m]	58.78 $\pm$ 5.97	33.50 $\pm$ 1.66	24.58 $\pm$ 2.04*	10.18 $\pm$ 0.76*	17.65 $\pm$ 1.46*
Średnia prędkość ruchu liczona z przemieszczenia [μ m/min]	0.14 $\pm$ 0.06	0.079 $\pm$ 0.003	0.06 $\pm$ 0.01	0.024 $\pm$ 0.007	0.04 $\pm$ 0.01
Średni współczynnik efektywności ruchu (CME)	0.216 $\pm$ 0.02	0.244 $\pm$ 0.015*	0.279 $\pm$ 0.02*	0.186 $\pm$ 0.03*	0.374 $\pm$ 0.03*

Przy wartościach podano błąd standardowy średniej. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) oznaczone są *

Rycina 35. Wpływ atranoryny (ATR) na migrację komórek Du145 (A - warunki kontrolne, B - inkubacja z 10µg/ml ATR, C - 24h preinkubacja z 10µg/ml ATR) i HTB-140 (A - warunki kontrolne, B - inkubacja z 10µg/ml ATR, C - 24h preinkubacja z 10µg/ml ATR)

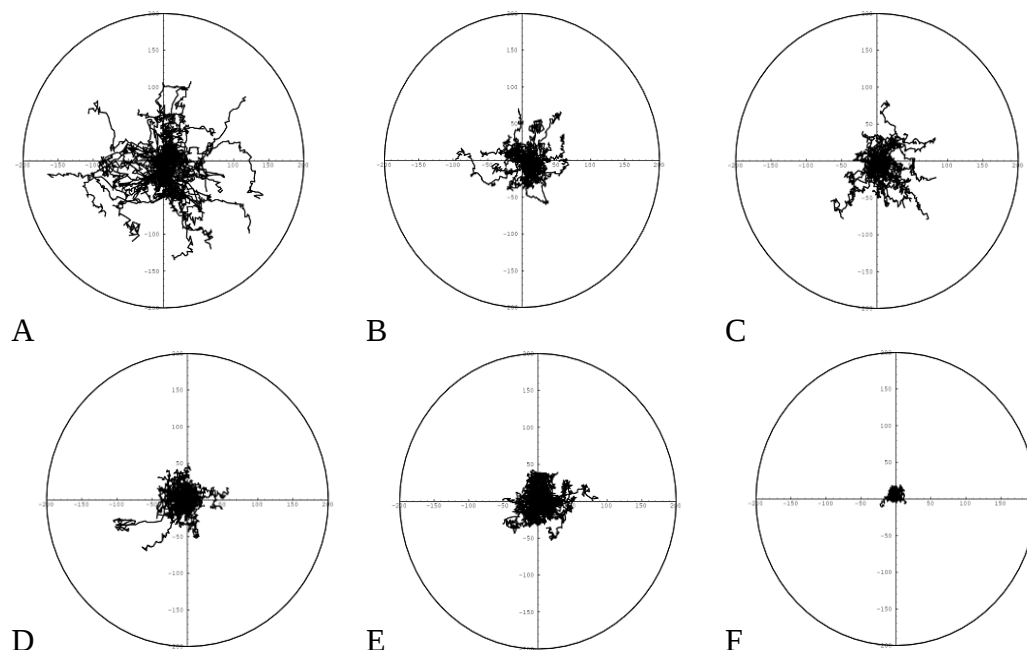


Tabela 42. Parametry ruchu komórek Du145 pod wpływem atranoryny.

Parametr ruchu	STĘŻENIE ATRANORYNY [µg/ml]		
	0	10	10 (po 24h)
Średnia droga całkowita [µm]	352.94 ± 7.91	203.58 ± 6.02*	216.4 ± 4.62*
Średnia prędkość ruchu liczona z drogi [µm/min]	0.84 ± 0.018	0.48 ± 0.014	0.51 ± 0.011
Średnie przemieszczenie całkowite [µm]	70.58 ± 5.95	31.34 ± 2.72*	37.15 ± 3.62*
Średnia prędkość ruchu liczona z przemieszczenia [µm/min]	0.17 ± 0.014	0.07 ± 0.006	0.09 ± 0.009
Średni współczynnik efektywności ruchu (CME)	0.21 ± 0.018	0.15 ± 0.012*	0.17 ± 0.016*

Przy wartościach podano błąd standardowy średniej. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) oznaczone są *

Tabela 43. Parametry ruchu komórek HTB-140 pod wpływem atranoryny.

Parametr ruchu	STĘŻENIE ATRANORYNY [$\mu\text{g/ml}$]		
	0	10	10 (po 24 h)
Średnia droga całkowita [μm]	324.53 ± 6.85	$239.68 \pm 6.76^*$	$110.43 \pm 4.81^*$
Średnia prędkość ruchu liczona z drogi [$\mu\text{m/min}$]	0.77 ± 0.016	0.57 ± 0.016	0.26 ± 0.011
Średnie przemieszczenie całkowite [μm]	29.04 ± 2.05	28.33 ± 2.62	$8.78 \pm 0.60^*$
Średnia prędkość ruchu liczona z przemieszczenia [$\mu\text{m/min}$]	0.07 ± 0.004	0.07 ± 0.006	0.02 ± 0.002
Średni współczynnik efektywności ruchu (CME)	0.09 ± 0.007	$0.12 \pm 0.010^*$	0.09 ± 0.008

Przy wartościach podano błąd standardowy średniej. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) oznaczone są *

7.6.8. Wpływ badanych związków na morfologię jąder komórkowych

Badanie zmian morfologii jąder komórkowych przeprowadzono przy współpracy z Zakładem Biologii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ.

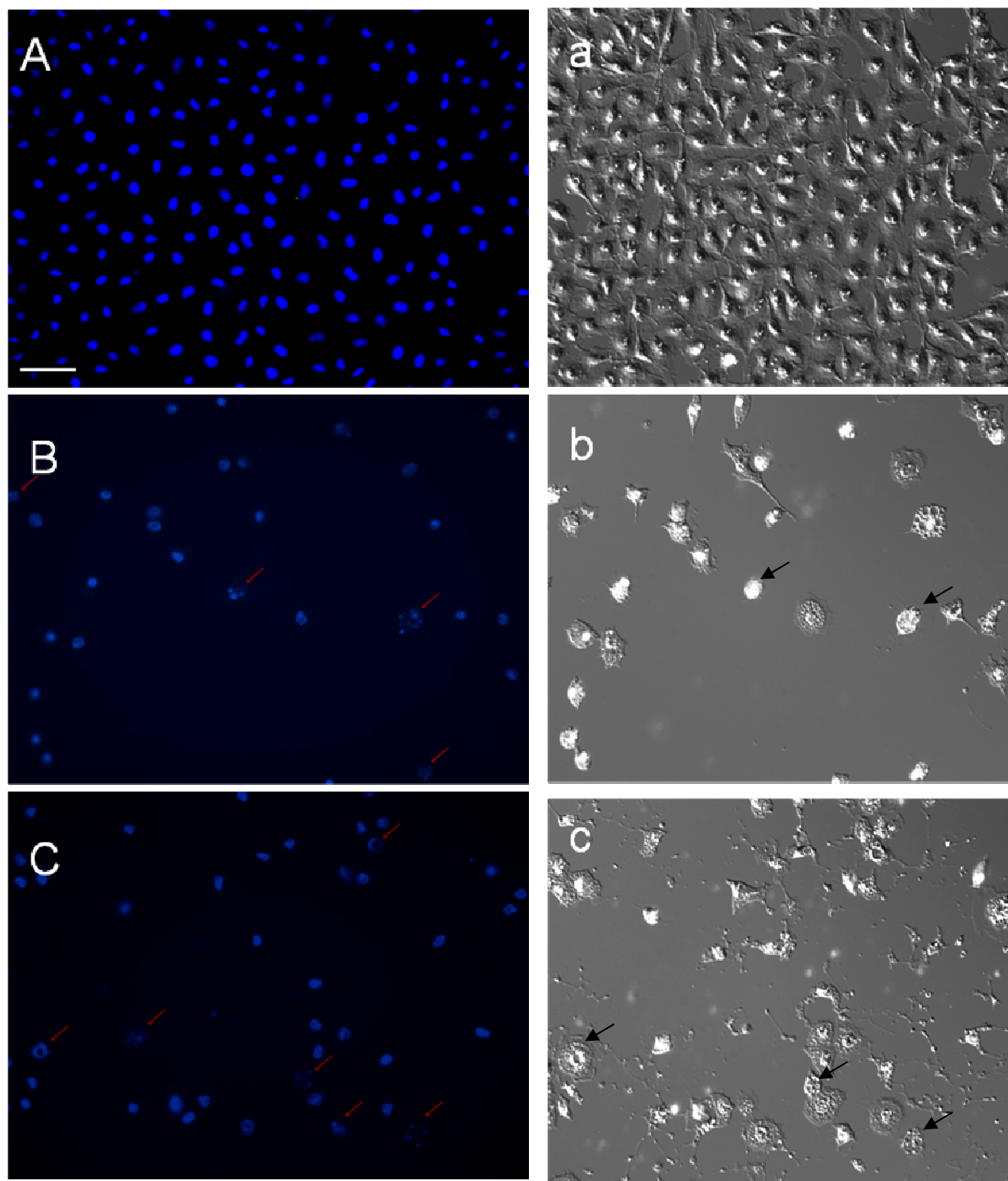
Wykonanie:

Komórki z naczyń hodowlanych pasażowano i wysiewano na płytki 12-dołkowe, z umieszczonym na dnie mikroskopowym szkiełkiem nakrywkowym, w gęstości $4000/\text{cm}^2$. Po upływie 24 h zmieniano płyn hodowlany na świeży z dodatkiem badanych substancji w stężeniach 10 i 25 $\mu\text{g/ml}$ lub bez dodatku badanych substancji (kontrola pozytywna). Komórki inkubowano z badanymi substancjami przez 72 h. Następnie komórki przepłukiwano trzykrotnie roztworem PBS bez jonów wapnia i magnezu, utrwalano w 3.7% roztworze paraformaldehydu w temperaturze 37°C i powtórnie przepłukano roztworem PBS. Do utrwalonych komórek dodano 0.1% roztwór Tritonu X-100 i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie komórki barwiono barwnikiem Hoechst w komorach bez dostępu światła. Po inkubacji z barwnikiem szkiełka z komórkami przepłukiwano wodą destylowaną a następnie obserwowano pod odwróconym mikroskopem kontrastowo-fazowym z przystawką do epifluorescencji i zapisywano obrazy.

Wyniki:

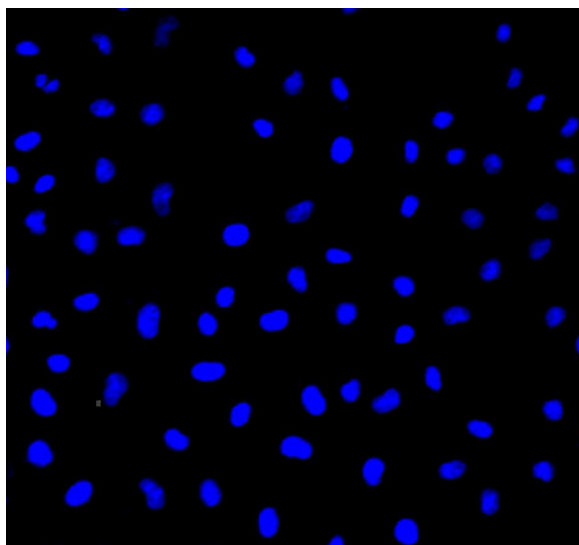
Wpływ kwasu usninowego na morfologię jąder komórek Du145 przedstawia Rycina 36, wpływ atranoryny - Rycina 37.

Rycina 36. Wpływ kwasu usninowego (KU) na morfologię jąder komórek Du145 (A, a - warunki kontrolne, D, d - inkubacja z 10 μ g/ml KU, G, g - inkubacja z 25 μ g/ml KU)

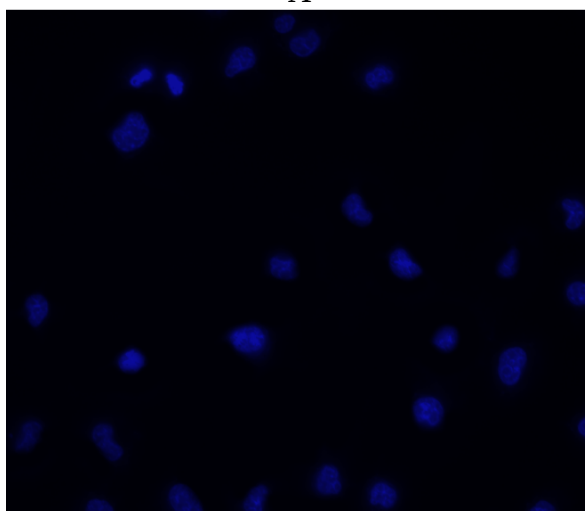


strzałki wskazują jądra komórkowe z widocznymi początkami procesu apoptozy (ciałka apoptotyczne)

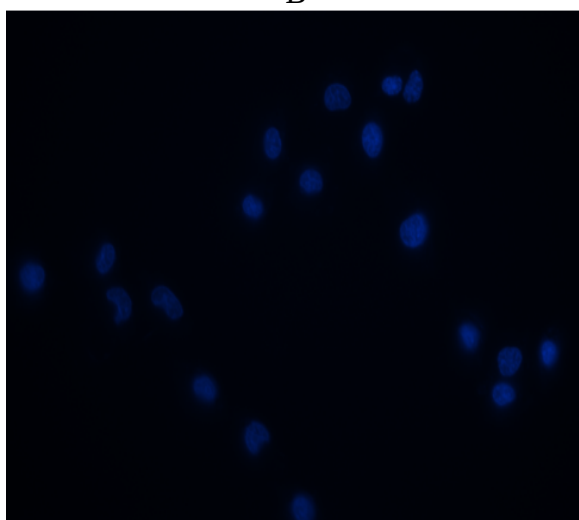
Rycina 37. Wpływ atranoryny (ATR) na morfologię jąder komórek Du145 (A - warunki kontrolne, B - inkubacja z 20 $\mu\text{g/ml}$ ATR, C - inkubacja z 30 $\mu\text{g/ml}$ ATR)



A



B



C

7.6.9. Wpływ badanych związków na indukcję procesu apoptozy w komórkach

Badanie indukowania procesu apoptozy w komórkach przeprowadzono przy współpracy z Zakładem Immunologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ.

Wykonanie:

Komórki Du-145 hodowano w płynie DMEM F12 z 10% FBS i antybiotykiem, wysiano na szalkę w gęstości 10000/cm². Po upływie 24 h od wysiania komórek zmieniano płyn hodowlany na świeży z dodatkiem badanej substancji w stężeniach 10 i 25 µg/ml lub bez dodatku badanej substancji (kontrola pozytywna).

Komórki inkubowano w obecności kwasu usninowego przez 48 h. Następnie komórki przepłukano PBS bez jonów wapnia i magnezu, poddano trypsynizacji i odwirowano. Po zakończeniu wirowania komórki zawieszono w PBS, rozpipetowano i zawieszono w buforu wiążącego w gęstości 1x10⁶ komórek/ml. Z zawiesiny pobrano 100 µl, przeniesiono do próbki o objętości 5 ml, a następnie dodano 5 µl aneksyny V znakowanej FITC. Komórki inkubowano przez 15 minut w ciemności, następnie dodano 400 µl bufora wiążącego i analizowano za pomocą cytometru przepływowego.

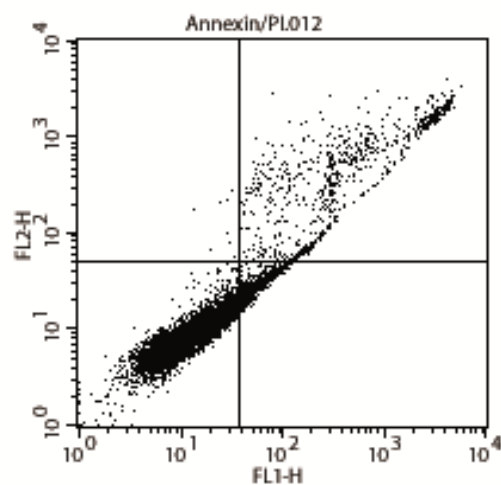
Wyniki:

Wpływ kwasu usninowego na stymulację procesu apoptozy w komórkach Du-145 przedstawia Tabela 44 i Rycina 38.

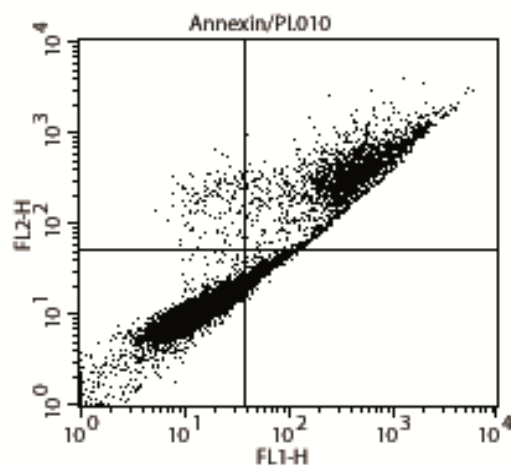
Tabela 44. Wpływ kwasu usninowego na stymulację procesu apoptozy w komórkach Du145

stężenie kwasu usninowego [µg/ml]	ilość komórek [%]		
	komórki żywe	komórki nekrotyczne	komórki apoptotyczne
kontrola	84.93	0.11	14.96
10	65.39	1.35	33.26
25	43.20	0.41	56.39

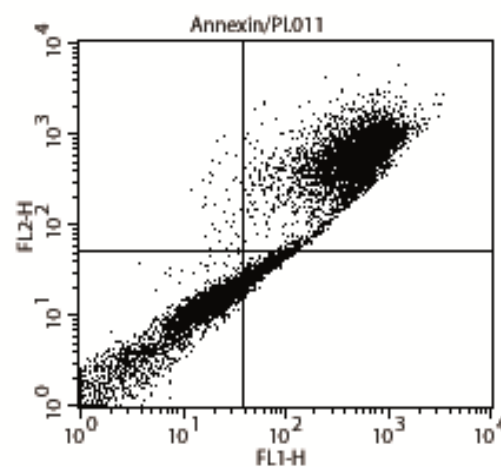
Rycina 38. Wpływ kwasu usninowego (KU) na stymulację procesu apoptozy w komórkach Du145 (A - warunki kontrolne, B - inkubacja z 10 μ g/ml KU, C - inkubacja z 25 μ g/ml KU)



A



B



C

7.7. Opracowanie wyników i analiza statystyczna

Wszystkie wyniki opracowano korzystając z programu Microsoft Excel 2003. Analizę statystyczną wykonano w programie Statistica. Dla sprawdzenia istotności statystycznej różnic z testów żywotności i proliferacji, a także zdolności ruchowej zastosowano test Mann-Whitneya dla dwóch niezależnych prób. Próg istotności α przyjmowano za równy 0,05.

8. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW

8.1. Wprowadzenie

Porosty czyli grzyby lichenizowane (*Fungi lichenisati*, *Lichenomycota*) są organizmami roślinnymi zbudowanymi z dwóch komponentów: cudzożywnego grzyba oraz samożywnego glonu, pozostających wobec siebie w zależności symbiotycznej. Są to organizmy bardzo rozpowszechnione na kuli ziemskiej, a ich pionierski charakter, małe wymagania środowiskowe oraz samożywność pozwoliły im na kolonizowanie obszarów trudno dostępnych dla roślin wyższych.

Znanych jest około 18 500 gatunków porostów [Boustie 2005], z czego około 1600 występuje w Polsce [Fałtynowicz 2003].

Człowiek wykorzystywał porosty od stuleci, w celach zarówno pozamedycznych, jak i leczniczych. Stanowiły one źródło pożywienia [Matwiejuk 2008, Bystrek 1987], były także wykorzystywane jako w przemyśle perfumeryjnym i kosmetycznym [Ghione 1988, Huneck 1999, Joulain 2009]. Znaczenie lecznicze porostów w chwili obecnej ogranicza się do ich zastosowania w schorzeniach dróg oddechowych.

Substancje występujące w porostach można podzielić na metabolity pierwotne i wtórne. Metabolity pierwotne spotykane w porostach - cukrowce, związki azotowe, kwasy karboksylowe czy witaminy - są również rozpowszechnione wśród innych roślin. Większość wtórnych metabolitów porostowych powstało biogenetycznie na drodze acetylopolimalonylowej i są to zazwyczaj struktury typowe dla porostów (tzw. kwasy porostowe), za wyjątkiem antrachinonów i naftochinonów, spotykanych również u roślin wyższych. Do charakterystycznych struktur porostowych należą także związki pochodzące ze szlaku kwasu szikimowego (pochodne kwasu pulwinowego), podczas gdy produkty przemian szlaku kwasu miewalonowego (karotenoidy, sterole, terpeny) to związki spotykane również w roślinach wyższych.

Jednym z ważniejszych rodzajów porostów występujących w Polsce jest chrobotek (*Cladonia*), obejmujący kilkadziesiąt gatunków. Porosty z tego rodzaju występują przede wszystkim w suchych lasach sosnowych, tworząc charakterystyczne zbiorowiska leśne noszące nazwę borów chrobotkowych (*Cladonio-Pinetum*), wchodzą także w skład zbiorowisk określanych jako murawy szczytlichowe (*Corynephoretum canescentis*).

Badania prowadzone dotychczas nad aktywnością różnych gatunków chrobotków wskazały przede wszystkim na ich aktywność przeciwdrobnoustrojową [Aslan 2006, Ingolfstodt 1985, Saenz 2006, Yilmaz 2004, Perry 1999, Halama 2004] oraz cytotoksyczną [Ingolfstodt 2000, Bezivin 2003, Perry 1999] i antymitotyczną [Oświecimska 1979].

Kwas usninowy, jeden z najlepiej zbadanych metabolitów porostowych, charakteryzuje się ciekawą aktywnością biologiczną i farmakologiczną, co zostało opisane w rozdziale 5.1.8. Związek ten był również badany pod kątem aktywności cytotoksycznej wobec szeregu linii zwierzęcych i ludzkich komórek nowotworowych i prawidłowych (Tabela 11), określano także jego wpływ na stymulację procesu apoptozy czy jeden z elementów cytoszkieletu komórkowego - mikrotubule. Atranoryna jest typowym metabolitem porostowym, występującym również, co ciekawe, w niektórych roślinach naczyniowych z rodzin *Ochnaceae*, *Dipterocarpaceae* czy *Fabaceae* [Nasser 2009, De Carvalho 2000, De Carvalho 2000 a, Mutai

2007]. W badaniach *in vitro* związek ten wykazywał aktywność biologiczną i farmakologiczną w różnych kierunkach, co zostało opisane szczegółowo w rozdziale 5.2.7. Związek ten był między innymi badany pod kątem aktywności cytotoksycznej, co przedstawiono w Tabeli 19, jak również określano jego wpływ na stymulację procesów apoptozy na kilku liniach komórek zwierzęcych i ludzkich [Correche 2004, Bačkorova 2010]. Ostatni z badanych metabolitów, kwas fumaroprotocetrarowy, jest najsłabiej przebadanym związkiem, co może wynikać z jego niskiej zazwyczaj aktywności biologicznej i farmakologicznej, którą opisano szczegółowo w rozdziale 5.3.6. Kwas fumaroprotocetrarowy był również badany pod kątem aktywności cytotoksycznej, co przedstawia Tabela 27.

8.2. Uzasadnienie celu i założeń pracy

Prace nad składem chemicznym i aktywnością przedstawicieli rodzaju *Cladonia* były prowadzone w Katedrze Farmakognozji w latach 80-tych, gdzie w teście *Allium* wykazano własności antymitotyczne kwasu usninowego. Stąd wynikło zainteresowanie gatunkami tego rodzaju i metabolitami wtórnymi porostów, oraz pomysł na kontynuowanie, a przede wszystkim poszerzenie tych badań. Celem pracy było określenie zawartości wybranych metabolitów: kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego w różnych gatunkach rodzaju *Cladonia*, wytypowanie gatunków o najwyższej ich zawartości a następnie izolacja tych związków. W ostatnim etapie pracy określano oddziaływanie wyizolowanych metabolitów na komórki nowotworowe i prawidłowe.

Do badań wybrano sześć gatunków z rodzaju *Cladonia*: *C. arbuscula*, *C. furcata*, *C. gracilis*, *C. macilenta ssp. floerkeana*, *C. subulata* oraz *C. uncialis*, kierując się przede wszystkim doniesieniami na temat ich składu chemicznego w taki sposób, aby zawierały one badane metabolity wtórne. Dodatkowym elementem tego etapu pracy było porównanie obecności i zawartości badanych związków w dwóch wybranych gatunkach - *Cladonia arbuscula* i *C. uncialis* - zebranych w Polsce i na Islandii. Według doniesień literaturowych, kwas usninowy występował w trzech gatunkach (*Cladonia arbuscula*, *C. macilenta ssp. floerkeana*, *C. uncialis*) [Gertig 1960, Culberson 1979, Oświecimska 1987], atranoryna w dwóch gatunkach (*Cladonia furcata*, *C. gracilis*) [Culberson 1979, Huneck 2004, Piercey-Normore 2007], natomiast kwas fumaroprotocetrarowy w czterech spośród sześciu badanych gatunków (*Cladonia furcata*, *C. arbuscula*, *C. gracilis*, *C. subulata*) [Culberson 1979, Huneck 2004]. Rozpowszechnienie badanych metabolitów w porostach różnych rodzajów występujących w Polsce badało do tej pory zaledwie kilku autorów [Gertig 1960, Grzycka 1979, Oświecimska 1987, Białońska 2005], większość z tych badań była prowadzona w latach 60, 70 i 80 ubiegłego wieku. Analiza ilościowa krajowych gatunków porostów pod kątem występowania kwasu usninowego i atranoryny została opisana zaledwie w dwóch pracach [Gertig 1960, Białońska 2005], natomiast nie ma takich danych dla kwasu fumaroprotocetrarowego. Zarówno badania jakościowe, jak i ilościowe, dotyczą rodzaju *Cladonia* jedynie w dwóch przypadkach [Gertig 1960, Oświecimska 1987], stąd też pomysł na zapoczątkowanie takich badań wśród różnych gatunków tego rodzaju, aby poszerzyć informacje na temat zarówno obecności, jak i ilości metabolitów wtórnych w tych gatunkach. Wyselekcjonowane gatunki o wysokiej zawartości badanych metabolitów mogą posłużyć jako źródła do ich pozyskiwania, w związku z tym

kolejnym celem pracy była optymalizacja warunków ekstrakcji oraz próba izolacji związków. Wyizolowane związki mogą być wykorzystane jako wzorce do badań chromatograficznych bądź też mogą być badane pod kątem różnej aktywności. Takie postępowanie jest niewątpliwie korzystne ekonomicznie, ze względu na trudności związane z ewentualnym zakupem substancji komercyjnie dostępnych oraz ich wysokim kosztem.

W badaniach skoncentrowano się na trzech wybranych metabolitach wtórnych: kwasie usninowym, atranorynie i kwasie fumaroprotocetrarowym. Każdy z tych związków należy strukturalnie do innej grupy chemicznej: kwas usninowy jest pochodną dibenzofuranu, natomiast atranoryna i kwas fumaroprotocetrarowy, pochodne β -orcynolu, są odpowiednio paradepsydem i depsydonem. Wybór tych właśnie związków wynikał między innymi z chęci poszerzenia wiadomości na temat ich obecności w polskich gatunkach chrabotków oraz określenia i porównania ich aktywności cytotoksycznej. Niewątpliwie na decyzji zaważył również fakt dostępności zakupu substancji wzorcowych, co wśród metabolitów porostowych jest rzadkością.

W badaniach użyto dwóch ludzkich linii komórek nowotworowych: czerniaka HTB40 oraz nowotworu prostaty Du145, a także linię prawidłowych fibroblastów skóry ludzkiej HSF. Żadne z przeprowadzonych badań nie dotyczyło wpływu kwasu usninowego na komórki linii czerniaka, stąd postanowiono wybrać ludzką linię tego nowotworu do badań w niniejszej pracy. W celu sprawdzenia selektywnego działania kwasu usninowego, w badaniach wykorzystano również linię prawidłowych fibroblastów skóry ludzkiej. Dodatkowo do badań wybrano ludzką linię nowotworu prostaty o wysokim stopniu złośliwości, na której co prawda opisano już działanie cytotoksyczne kwasu usninowego [Bezivin 2004, Bazin 2008] oraz kwasu fumaroprotocetrarowego [Bezivin 2004], jednak dla trzeciego z badanych metabolitów - atranoryny - wpływ taki nie został do tej pory określony. Ponadto, wobec żadnej z wybranych linii komórkowych nie określono dotąd wpływu badanych metabolitów na proliferację komórek, pomimo kilku doniesień o takiej aktywności kwasu usninowego [Kumar 1999 b, Burlando 2009, Einarsdottir 2010] czy atranoryny [Kumar 1999 b]. Kwas fumaroprotocetrarowy nie był do tej pory w ogóle badany pod kątem wpływu na proliferację komórek. Dodatkowo postanowiono poszerzyć spektrum badania oddziaływania metabolitów wtórnych na wybrane linie komórkowe o określenie ich wpływu na morfologię komórek i jąder komórkowych, cytoszkielet aktynowy i aktywność migracyjną, jak również stymulację procesu apoptozy. Taki zakres badań nie został dotąd opisany dla żadnego z badanych związków.

8.3. Analiza jakościowa

Pierwszym etapem prac była wstępna analiza jakościowa badanych surowców. Analizę przeprowadzano za pomocą metod chromatograficznych: chromatografii cienkowarstwowej TLC oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC, w obecności wzorców badanych substancji.

Do chromatografii cienkowarstwowej wykorzystano fazę ruchomą toluen-lodowaty kwas octowy 170:30, będącą standardową fazą używaną przy analizie metabolitów porostowych [Orange 2001]. Kwas usninowy był widoczny na chromatogramach w świetle widzialnym jako żółta plama o wartości R_f 0.57, w świetle UV 365 nm jako plama wygaszająca flu-

orescencję. Pozostałe analizowane metabolity - atranoryna i kwas fumaroprotocetrarowy - były widoczne dopiero po wywołaniu chromatogramów przy użyciu 25% metanolowego roztworu kwasu siarkowego (VI) i ich ogrzaniu. Atranoryna ujawniała się w postaci pomarańczowo-żółtej plamy o wartości R_f 0.67, natomiast na obecność kwasu fumaroprotocetrarowego wskazywała plama koloru fioletowo-niebieskiego o wartości R_f 0.15.

W obrazie chromatograficznym wyciągów heksanowych, chloroformowych i acetonowych z pięciu spośród badanych gatunków polskich (*Cladonia arbuscula*, *C. gracilis*, *C. macilenta* ssp. *floerkeana*, *C. furcata*, *C. uncialis*) oraz obydwu gatunków islandzkich (*C. arbuscula*, *C. uncialis*) zaobserwowano plamę odpowiadającą barwą i wartością R_f kwasowi usninowemu (Rycina 13). W przypadku wyciągów metanolowych, plamy odpowiadające kwasowi usninowemu zaobserwowano tylko w obrazie chromatograficznym wyciągów z *Cladonia macilenta* ssp. *floerkeana* oraz *C. uncialis* polskiej i islandzkiej (Rycina 13).

Analiza obrazu chromatograficznego pod kątem występowania atranoryny nie wskazała jednoznacznie na obecność tego związku w badanych wyciągach. Zaobserwowano plamy o podobnej barwie, lecz różniące się wartościami R_f , we wszystkich wyciągach z *C. macilenta* ssp. *floerkeana*, wyciągach heksanowych i acetonowych z *Cladonia gracilis* i *C. subulata* oraz wyciągu acetonowym z *C. furcata* (Rycina 13). Nie zaobserwowano obecności atranoryny w żadnym z gatunków islandzkich. Ze względu na podobieństwo barwy i wartości R_f atranoryny do kwasu usninowego i możliwość nakładania się plam obydwu związków, interpretacja uzyskanych wyników nie była jednoznaczna, stąd też konieczność przeprowadzenia analizy metodą HPLC.

Plamy o zabarwieniu i wartości R_f podobnej do wzorcowego kwasu fumaroprotocetrarowego zaobserwowano w obrazie chromatograficznym ekstraktów heksanowych, chloroformowych i acetonowych z *Cladonia macilenta* ssp. *floerkeana*, *C. furcata*, *C. arbuscula*, *C. gracilis*, *C. subulata* oraz z *C. arbuscula* zebranej na Islandii. W wyciągach metanolowych z tych surowców zaobserwowano plamy o zgodnej barwie lecz różniące się wartością R_f od wzorca, co może świadczyć o obecności pochodnej badanego związku lub związku o zbliżonej strukturze (Rycina 13).

Porównawcza analiza jakościowa wyciągów z surowców polskich i islandzkich wskazuje na wyraźne różnice w składzie. Jest to widoczne zwłaszcza w przypadku wyciągów heksanowych i chloroformowych z *Cladonia arbuscula*, oraz wszystkich rodzajów wyciągów z *C. uncialis*. Obraz chromatograficzny wyciągów z gatunków polskich wskazuje na większe zróżnicowanie w składzie, w porównaniu do gatunków islandzkich. Ponadto w wyciągu chloroformowym z *C. uncialis* zebranego na Islandii widać jedynie plamę kwasu usninowego, podczas gdy w tym samym wyciągu z gatunku polskiego kwasowi usninowemu towarzyszą również inne związki. Wskazuje to na swoistą specjalizację gatunków islandzkich w syntezowaniu pewnych związków, natomiast w przypadku gatunków polskich synteza ta jest bardziej wielokierunkowa. Może to wynikać z różnic klimatycznych i związanej z tym zasobnością gleby, choć interpretacja tego zjawiska wymaga dalszych, pogłębionych badań.

Analizę jakościową z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC przeprowadzono z wykorzystaniem warunków opisanych przez Ji i wsp. [Ji 2005]. Były to warunki zapewniające dobry rozdział wszystkich badanych metabolitów a także stosunkowo krótki czas analizy (20 minut, następnie skrócone do 10). Kwas usninowy i atranorynę identy-

fikowano przy długości fali 240 nm, natomiast dla kwasu fumaroprotocetrarowego lepszą jakość otrzymywanego obrazu chromatograficznego uzyskano stosując długość fali 210 nm [Gudjonsdottir 1997]. Uzyskane czasy retencji dla poszczególnych metabolitów - 6.21min dla kwasu usninowego, 5.89 min dla atranoryny i 6.08 min dla kwasu fumaroprotocetrarowego - były zgodne z danymi opisanymi przez innych autorów.

Analiza HPLC ostatecznie zweryfikowała wyniki uzyskane metodą chromatografii cienkowarstwowej. Kwas usninowy zidentyfikowano we wszystkich rodzajach wyciągów z *Cladonia arbuscula*, *C. gracilis*, *C. macilenta ssp. floerkeana*, *C. uncialis* oraz obydwu gatunków islandzkich, podczas gdy analiza obrazu chromatograficznego uzyskanego metodą TLC nie wskazywała na obecność tego związku w wyciągach metanolowych z wszystkich wymienionych gatunków. Warto podkreślić, że obecność kwasu usninowego w *Cladonia gracilis* została stwierdzona po raz pierwszy. Obecność badanego metabolitu w *Cladonia arbuscula*, *Cladonia macilenta ssp. floerkeana* i *Cladonia uncialis* została potwierdzona i jest zgodna z danymi opisanymi przez innych autorów [Culberson 1979, Gertig 1960, Oświecimska 1987, Piercey-Normore 2007, Ingolfssdottir 1998, Nybakken 2010]. Wbrew wynikom analizy metodą TLC, nie wykazano obecności kwasu usninowego w *Cladonia furcata*, co jest zgodne z danymi podawanymi przez innych autorów [Culberson 1979].

Atranorynę zidentyfikowano we wszystkich rodzajach wyciągów z *Cladonia arbuscula*, *C. macilenta ssp. floerkeana*, *C. gracilis* i *C. subulata*, podczas gdy analiza metodą TLC nie wskazała na obecność tego metabolitu w *Cladonia arbuscula* oraz w wyciągach chloroformowych i metanolowych. Obecność tego metabolitu została po raz pierwszy stwierdzona w *Cladonia arbuscula*, *C. macilenta ssp. floerkeana* i *C. subulata*, natomiast w przypadku *Cladonia gracilis* obecność atranoryny jest zgodna z doniesieniami innych autorów [Culberson 1979]. Obecność tego związku w *Cladonia arbuscula* jest o tyle ciekawa, że znaleziono go wyłącznie w gatunku zebrany w Polsce. Wbrew informacjom podawanym przez Culbersona i Hunecka, metodą HPLC nie stwierdzono obecności atranoryny w *Cladonia furcata* [Huneck 2004, Culberson 1979], mimo plamy o zabarwieniu i wartości R_f wskazującym na obecność tego związku w obrazie chromatograficznym TLC wyciągu acetonowego z tego gatunku (Rycina 13). Może to wynikać z faktu, że występowanie atranoryny w *Cladonia furcata*, opisane przez Culbersona i Hunecka, dotyczyło okazów zebranych w innych krajach.

Wynik analizy TLC wskazywał na obecność kwasu fumaroprotocetrarowego w wyciągach heksanowych, chloroformowych i acetonowych, natomiast metoda HPLC wykazała, że związek ten znajduje się również w wyciągach metanolowych. Obecność tego związku stwierdzono zatem we wszystkich rodzajach wyciągów z *Cladonia arbuscula*, *C. gracilis*, *C. macilenta ssp. floerkeana*, *C. furcata* i *C. subulata*, oraz w *C. arbuscula* zebranej na Islandii. Spośród badanych gatunków jedynie w *Cladonia macilenta ssp. floerkeana* nie opisano dotąd obecności kwasu fumaroprotocetrarowego, natomiast w przypadku pozostałych gatunków obecność tego związku jest zgodna z wcześniej podawanymi doniesieniami innych autorów [Huneck 2004, Ranković 2008, Culberson 1979, Piercey-Normore 2007, Nybakken 2010, Spier 2007].

8.4. Analiza ilościowa

Kolejnym etapem badań była analiza ilościowa wybranych metabolitów wtórnych w gatunkach, w których uzyskano pozytywne wyniki analizy jakościowej. Etap ten podzielono na dwie fazy: optymalizację procesu ekstrakcji surowców pod kątem badanych związków oraz określenie ilości tych związków w badanych gatunkach.

8.4.1. Optymalizacja warunków ekstrakcji

Ze względu na duże zróżnicowanie informacji, opisywanych w literaturze, dotyczących sposobu ekstrakcji surowców porostowych, postanowiono najpierw określić ilościowo wpływ różnych czynników na ten proces, a tym samym zoptymalizować jego warunki w celu uzyskania jak największej wydajności w pozyskiwaniu metabolitów wtórnych. Brano pod uwagę następujące czynniki:

- a) stopień rozdrobnienia materiału roślinnego,
- b) metodę ekstrakcji
- c) polarność rozpuszczalnika

ad. a) materiał roślinny był rozdrabniany w moździerzu na niewielkie kawałki lub mielony na proszek w młynku elektrycznym. W doniesieniach literaturowych stosowano surowce w postaci sproszkowanej [Lohezic Le Devehat 2007, Yilmaz 2004, Marcano 1999, Burlando 2009, Correche 1998, Einarsdottir 2010, Cetin 2008, Bezivin 2004, Gertig 1960, Su 2003, Türk 2006, Millot 2008, Garcia Rowe 1999, Nasser 2009] na równi z rozdrobnionymi [Honda 2010, Ranković 2008, Krivoshchekova 1983, Santos 2004, Perry 1999, König 1999, Kinoshita 1997, Tay 2004, Stark 1950, Jin 2008, Odabasoglu 2006, Dailey 2008, Bomfim 2009, Pereira 1994, Ingolfssdottir 1998, Melo 2008, Bugni 2009, Maia 2002], z czego porosty z rodzaju *Cladonia* nieco częściej były ekstrahowane w postaci sproszkowanej [Yilmaz 2004, Einarsdottir 2010, Oświecimska 1987, Cetin 2008, Bezivin 2004, Gertig 1960, Su 2003] niż rozdrobnionej [Perry 1999, Ingolfssdottir 1998, Bomfim 2009, Maia 2002, Honda 2010, Melo 2008].

W przypadku kwasu usninowego oraz kwasu fumaroprotocetrarowego zdecydowanie bardziej wydajna okazała się być ekstrakcja z surowca rozdrobnionego, różnice te są bardziej widoczne w przypadku pierwszego z metabolitów (Tabela 28). Natomiast ekstrakcja atranoryny z materiału sproszkowanego była o dwa rzędy wielkości bardziej efektywna niż z zastosowaniem surowca rozdrobnionego. Różnice te mogą wynikać z odmiennej lokalizacji badanych związków w obrębie plechy porostu - atranoryna zlokalizowana jest w warstwie korowej, zbudowanej ze strzępek grzyba, natomiast pozostałe dwa metabolity w większości zlokalizowane są w warstwie glonowej [Orange 2001], co może wpływać na efektywność ekstrakcji. Dokładne wytłumaczenie tych różnic wymaga jednak bardziej szczegółowych badań.

Dalszą analizę kwasu usninowego i fumaroprotocetrarowego prowadzono zatem stosując ekstrakcję z surowca rozdrobnionego, natomiast w przypadku atranoryny materiał roślinny poddawano zmieleniu.

ad. b) ekstrakcję prowadzono w aparacie Soxhleta dwoma sposobami: rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności następującymi kolejno po sobie, z użyciem tej samej partii surowca, oraz stosowanymi osobno, wykorzystując do każdego rozpuszczalnika nową partię surowca. W przypadku wszystkich badanych metabolitów bardziej efektywna okazała się być ekstrakcja z zastosowaniem rozpuszczalników następujących po sobie, zgodnie ze wzrastającą polarnością (Tabela 29). Najlepiej widać to na przykładzie ekstrakcji z użyciem heksanu: wyciągi przygotowane pierwszym sposobem zawierały kwas usninowy w stężeniu 54.2 mg/ml, atranorynę w stężeniu 10.98 mg/ml oraz kwas fumaroprotocetrarowy w stężeniu 35.22 mg/ml, podczas gdy w wyciągach przygotowanych drugim sposobem zawartość ta wynosiła odpowiednio 21.26, 0.08 i 12.78 mg/ml. Inni autorzy w swoich doniesieniach stosowali zwykle ekstrakcję pojedynczym rozpuszczalnikiem, najczęściej acetonem [Yilmaz 2004, Burlando 2009, Tay 2004, Stark 1950, Jin 2008, Dailey 2008, Cetin 2008, Garcia Rowe 1999, Kinoshita 1997], heksanem [Lohezic Le Devehat 2007, Krivoshchekova 1983, Bezivin 2004, Bugni 2009] lub chloroformem [König 1999, Bomfim 2009, Gertig 1960, Melo 2008], rzadko wykorzystywana była ekstrakcja rozpuszczalnikami następującymi kolejno po sobie: chloroform/aceton, eter dietylowy/aceton/metanol, heksan/eter dietylowy/aceton/metanol/woda [Santos 2004, Honda 2010, Pereira 1994, Lohezic Le Devehat 2007].

Dalsze badania prowadzono zatem z zastosowaniem ekstrakcji rozpuszczalnikami następującymi po sobie, według wzrastającej polarności, z użyciem tej samej partii surowca. Taka metoda ekstrakcji nie jest również bez znaczenia w przypadku ograniczonej ilości materiału roślinnego.

ad. c) w celu wyboru optymalnych warunków ekstrakcji materiału porostowego sprawdzono również efektywność tego procesu z wykorzystaniem rozpuszczalników o różnej polarności. Stosowano ekstrakcję z zastosowaniem następującego ciągu rozpuszczalników: heksan/chloroform/aceton/metanol, susząc surowiec przy każdorazowej zmianie rozpuszczalnika. Zaobserwowano, że optymalnym układem rozpuszczalników dla ekstrakcji kwasu usninowego jest heksan/chloroform, a najwięcej tego metabolitu znalazło się w wyciągu chloroformowym (1.6772 ± 0.1672 mg/ml dla *Cladonia arbuscula*, 0.5339 ± 0.0342 mg/ml dla *C. macilenta* ssp. *floerkeana*, 1.4480 ± 0.1268 mg/ml dla *C. uncialis*). W podobnych badaniach, przeprowadzonych przez Bezivin i wsp., surowiec (*Cladonia convoluta*) ekstrahowano kolejno heksanem, octanem etylu i metanolem, uzyskując wyniki wskazujące na heksan (zawartość badanego związku 66%) jako optymalny rozpuszczalnik [Bezivin 2004].

Podobnie jak dla kwasu usninowego, w przypadku atranoryny zastosowanie heksanu i następującego po nim chloroformu dało najlepsze rezultaty, przy czym dla dwóch gatunków najwięcej związku było obecne w wyciągu heksanowym (0.0019 ± 0.0006 mg/ml dla *Cladonia subulata*, 0.0549 ± 0.0171 mg/ml dla *C. gracilis*), a dla dwóch kolejnych w wyciągu chloroformowym po wcześniejszej ekstrakcji heksanem (1.9117 ± 0.0099 mg/ml dla *Cladonia arbuscula*, 0.3946 ± 0.0805 mg/ml dla *C. macilenta* ssp. *floerkeana*). Wyniki badań ilościowych, przeprowadzonych przez Maia i wsp. pod kątem zawartości atranoryny w *Cladonia dendroides* ekstrahowanych różnymi rozpuszczalnikami: kolejno eterem dietylowym, chloroformem i acetonem, wskazują na układ dwóch pierwszych rozpuszczalników jako optymalny. Atrano-

ryna przechodziła w równym stopniu do wyciągu eterowego (72.4%), jak i chloroformowego (72.2%) [Maia 2002].

Kwas fumaroprotocetrarowy ekstrahował się do heksanu (0.1761 ± 0.0376 mg/ml dla *Cladonia gracilis*, 0.2358 ± 0.0682 mg/ml dla *C. furcata*), lub do następującego po nim chloroformu (2.6199 ± 0.4927 mg/ml dla *Cladonia macilenta ssp. floerkeana*, 8.8200 ± 2.7658 mg/ml dla *C. arbuscula*), jedynie w przypadku *Cladonia subulata* najwięcej tego związku znalazło się w wyciągu acetonowym (0.2967 ± 0.1601 mg/ml), po wcześniejszej ekstrakcji surowca heksanem (0.0464 ± 0.0558 mg/ml) i chloroformem (0.1449 ± 0.0783 mg/ml). Wspominane już badania przeprowadzone przez Maia i wsp. wskazują natomiast na aceton, po wcześniejszej ekstrakcji eterem dietylowym i chloroformem, jako na optymalny rozpuszczalnik do ekstrakcji kwasu fumaroprotocetrarowego. Autorzy nie wykazali obecności badanego związku w wyciągu chloroformowym, jak również zaobserwowali dwukrotnie mniej związku w wyciągu eterowym w porównaniu do acetonowego [Maia 2002].

Co ciekawe, zarówno dla kwasu usninowego, atranoryny jak i kwasu fumaroprotocetrarowego, ekstrakcja chloroformem po heksanie była najbardziej efektywna dla surowców o dużej zawartości tych związków, natomiast w przypadku surowców o niskiej zawartości tych metabolitów heksan stanowił najlepszy rozpuszczalnik. Jedynie w przypadku ekstrakcji *Cladonia subulata* pod kątem kwasu fumaroprotocetrarowego najbardziej przydatnym rozpuszczalnikiem okazał się aceton, jednak zawartość tego związku w surowcu również była niewielka.

Uzyskane wyniki wskazują zatem na układ rozpuszczalników heksan/chloroform, następujących po sobie, jak na optymalny do ekstrakcji wszystkich trzech metabolitów. Nie jest to zgodne z doniesieniami innych autorów, którzy, jak wspomniano powyżej, stosowali najczęściej ekstrakcję pojedynczym rozpuszczalnikiem, głównie acetonem, w mniejszym stopniu heksanem czy chloroformem. W doniesieniach tych nie jest jednak wytłumaczone, czym kierowali się autorzy, wybierając takie właśnie rozpuszczalniki. Jedynie nieliczne badania opierają się na wynikach wcześniejszej analizy ilościowej, wskazującej na optymalny rozpuszczalnik.

Do dalszej analizy ilościowej zdecydowano się wybrać ekstrakcję z użyciem wszystkich czterech rozpuszczalników.

8.4.2. Analiza ilościowa badanych metabolitów

Analizę ilościową kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego przeprowadzano z zastosowaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC. Była to metoda najczęściej wykorzystywana przez innych autorów, badających zawartość tych związków w różnych gatunkach porostów [Bjerke 2002, Bjerke 2005, Caviglia 2001, Cansaran 2007, Cansaran 2008, Lisickov 2002, Nybakken 2006, Nybakken 2010, Bezivin 2004, Toledo Marante 2003, Ji 2005, Maia 2002, Hesbacher 1996, Białońska 2005, Gudjonssdottir 1997, Freysdottir 2008, Archer 1981]. Wzorce kwasu usninowego i atranoryny rozpuszczały się najlepiej w chloroformie, stąd też uzyskane, zagęszczone do sucha wyciągi (heksanowe, chloroformowe, acetonowe i metanolowe), analizowane ilościowo pod kątem

tych dwóch metabolitów, również rozpuszczano w chloroformie. W przypadku kwasu fumaroprotocetrarowego jako rozpuszczalnika do wzorca i wyciągów użyto acetonu.

Gatunkiem najbogatszym w kwas usninowy okazał się *Cladonia arbuscula*, w którym zawartość tego związku przekraczała pół procenta (0.538%). Jest to zawartość porównywalna z badaniami innych autorów - Gertig podaje przedział wartości 0.800-0.875% kwasu usninowego w gatunku zebrany w Polsce [Gertig 1960], natomiast w gatunkach spoza Polski zawartość ta wynosiła 0.681% (miejsce zbioru: Alaska) [Falk 2008] lub 0.333% (miejsce zbioru: Norwegia) [Nybakken 2010]. Badany surowiec jest zatem uboższy w kwas usninowy w stosunku do tego samego, krajowego gatunku w badaniach z lat 60-tych [Gertig 1960], warto jednak podkreślić, że badania te prowadzono z zastosowaniem metody kolorymetrycznej (pomiar ekstynkcji), charakteryzującej się mniejszą czułością niż metoda HPLC, zastosowana w niniejszej pracy. W porównaniu do gatunków z innych krajów (Norwegia, USA - Alaska) jest to zawartość większa lub mniejsza. Drugim co do zawartości kwasu usninowego najbogatszym gatunkiem jest *Cladonia uncialis* - ilość tego metabolitu dochodzi tu do prawie pół procenta (0.494%), co jest porównywalną, aczkolwiek mniejszą, ilością w porównaniu do wyników opisanych w badaniach BeGora i wsp., gdzie ilość ta w próbkach zebranych w północnej części Kanady wynosiła 0.52 mg/ml (około 0.69%) [BeGora 2001]. Pozostałe dwa gatunki - *Cladonia macilenta ssp. floerkeana* i *C. gracilis* - zawierały odpowiednio 0.212 i 0.036% kwasu usninowego. W gatunkach tych nie stwierdzono dotychczas obecności kwasu usninowego, nie ma więc przeprowadzonych podobnych badań ilościowych, z którymi można by porównać uzyskane wyniki. Można więc jedynie odnieść się do przedziału zawartości badanego związku w badaniach ilościowych przeprowadzonych na innych gatunkach tego rodzaju, który wynosi 0.14 - 1.083% [Cansaran 2008, Nybakken 2010]. Pierwszy z gatunków jest stosunkowo bogaty, jest porównywalny z innymi gatunkami tego rodzaju, i może stanowić potencjalne źródło do jego pozyskiwania, natomiast drugi gatunek zawiera niewielką ilość kwasu usninowego, najmniejszą z dotychczas opisanych, i jego przydatność do izolacji związku nie jest wysoka.

Dwa najbogatsze w atranorynę gatunki to *Cladonia arbuscula* (0.511%) i *C. macilenta ssp. floerkeana* (0.142%), natomiast w pozostałych dwóch badanych gatunkach, *C. gracilis* i *C. subulata*, zawartość tego związku jest bardzo niewielka, i wynosi odpowiednio 0.025 i 0.0013%. Co ciekawe, zarówno *Cladonia arbuscula*, jak i *C. macilenta ssp. floerkeana* są gatunkami, w których do tej pory nie opisano występowania atranoryny. W badaniach Falka i wsp., z zastosowaniem micelarnej chromatografii elektrokinetycznej, nie udało się określić zawartości atranoryny w *C. arbuscula* pochodzącej z Alaski [Falk 2008]. W innych badanych gatunkach rodzaju *Cladonia* (m.in. *C. rangiferina*, *C. dendroides*), zbieranych m. in. na Alasce, w Norwegii czy w Brazylii, zawartość atranoryny mieściła się w przedziale 0.13-0.4% [Falk 2008, Nybakken 2010], zatem oba gatunki najbogatsze w atranorynę mieszczą się, a nawet przekraczają te wartości, natomiast *C. gracilis* i *C. subulata* są znacznie poniżej wartości uzyskiwanych przez innych badaczy w badaniach nad gatunkami tego rodzaju, zebranymi w różnych krajach. Warto podkreślić, że ilościowe określenie zawartości atranoryny w polskich gatunkach rodzaju *Cladonia* zostało przeprowadzone po raz pierwszy.

W przypadku kwasu fumaroprotocetrarowego, również dwoma najbogatszymi gatunkami okazały się *Cladonia arbuscula* (2.34%) i *C. macilenta ssp. floerkeana* (0.81%). Wyniki

te są porównywalne z badaniami nad zawartością tego związku w innych gatunkach rodzaju *Cladonia*, gdzie uzyskiwano wartości od 0.11 do 5.40% [Archer 1981], między innymi w próbkach pochodzących z Australii. W badaniach Nybakkena i wsp. zawartość kwasu fumaroprotocetrarowego w norweskich próbkach *Cladonia arbuscula*, określona metodą HPLC, wyniosła 0.213%, co jest ilością zdecydowanie mniejszą [Nybakken 2010]. Stosunkowo dużą ilość kwasu fumaroprotocetrarowego zawiera także *Cladonia subulata* (0.125%), natomiast w pozostałych dwóch badanych gatunkach, *C. gracilis* i *C. furcata*, zawartość tego metabolitu była bardzo niska (0.08%). Jest to pierwsze badanie, opisujące obecność i ilość kwasu fumaroprotocetrarowego nie tylko w polskich gatunkach rodzaju *Cladonia*, ale też krajowych gatunkach innych rodzajów porostów.

8.4.3. Porównawcza analiza ilościowa metabolitów porostowych w gatunkach polskich i islandzkich

W przypadku kwasu usninowego gatunki islandzkie zawierały zdecydowanie więcej tego metabolitu w odniesieniu do gatunków polskich (Tabela 31). Różnica ta w przypadku *Cladonia arbuscula* nie była jeszcze taka wyraźna, gatunek polski zawierał 0.538% kwasu usninowego, podczas gdy gatunek islandzki 0.698%. Jednak drugi z porównywanych gatunków, *C. uncialis*, zebrany na Islandii zawierał ponad dwukrotnie więcej (1.052%) badanego związku niż jego polski odpowiednik (0.494%). Badania laboratoryjne wskazują na proporcjonalną zależność pomiędzy ilością kwasu usninowego w plechach porostów a intensywnością naświetlania próbek promienowaniem UV [Bjerke 2002, BeGora 2000, BeGora 2001, Nybakken 2006]. W badaniach terenowych wykazano natomiast, że najwięcej kwasu usninowego zawierały porosty zbierane zimą, wczesną wiosną i jesienią, natomiast ilość tego metabolitu zdecydowanie się zmniejszała późną wiosną i latem, co autorzy tłumaczą niską wilgotnością otoczenia i stresem cieplnym [BeGora 2001, Toledo Marante 2003]. Warto również zwrócić uwagę na opisane wcześniej wyniki porównawczej analizy jakościowej - tak duża różnica w zawartości kwasu usninowego w *Cladonia uncialis* zebranej w Polsce i na Islandii może być wynikiem swoistej wielokierunkowości syntezy wtórnych metabolitów w gatunkach polskich, na co wskazuje bardziej różnorodny obraz chromatograficzny wyciągów.

Nie wykryto atranoryny w *Cladonia arbuscula* zebranym na Islandii, natomiast polski gatunek zawierał 0.511% tego związku.. Badania Armaleo i wsp. wskazują na proporcjonalną zależność pomiędzy ilością depsydów w porostach a nasłonecznieniem miejsca ich występowania [Armaleo 2008]. Zależność ta została wykazana w badaniach nad akumulacją atranoryny w plechach *Parmotrema hypotropum* [Armaleo 2008]. Osyczka i Olech zaobserwowali, że atranoryna obecna w gatunkach występujących na półkuli północnej nie występuje u okazów tych samych gatunków, rosnących w rejonie antarktycznym [Osyczka 2004]. Natomiast w warunkach laboratoryjnych, plechy *Cladonia* sp. naświetlane promieniami UV-B nie wykazały zwiększonej syntezy atranoryny w stosunku do warunków kontrolnych [Nybakken 2006]. Innymi czynnikami, mogącymi wpływać na zawartość metabolitów wtórnych w porostach, są temperatura i wilgotność otoczenia. Dotychczas nie określano takiej zależności dla atranoryny, jednak zawartość innego depsydu, kwasu gyroforowego, w dwóch gatunkach z rodzaju *Peltigera* wyraźnie zwiększała się wraz ze wzrostem temperatury i jednoczesnym spadkiem

wilgotności [Bjerke 2003]. Większe nasłonecznienie w Polsce w porównaniu do Islandii, a co za tym idzie mniej wilgotnym klimatem, może zatem tłumaczyć większą zawartość atranoryny w gatunku krajowym. Jednakże całkowita nieobecność tego związku w gatunku islandzkim jest trudna do wytłumaczenia.

Polski gatunek *Cladonia arbuscula* był również bogatszy w kwas fumaroprotocetrarowy w porównaniu do gatunku islandzkiego, a różnica ta była dwukrotna (Tabela 31). Dotychczas nie przeprowadzono badań, porównujących wpływ nasłonecznienia i innych warunków klimatycznych na zawartość kwasu fumaroprotocetrarowego w porostach w warunkach terenowych. W swoich laboratoryjnych badaniach Nybakken i wsp. określali wpływ naświetlania plech porostów z rodzaju *Cladonia* promieniowaniem UV o różnej intensywności, jednak nie udało się wykazać żadnej zależności pomiędzy zawartością badanego związku a działaniem promieniowania [Nybakken 2006]. Jak wspomniano powyżej, ta sama grupa autorów określała również ilościowo zawartość badanego metabolitu w *Cladonia arbuscula* z Norwegii, uzyskując kilkakrotnie mniejszą zawartość w porównaniu do wyników nad gatunkiem polskim, uzyskanych w niniejszej pracy [Nybakken 2010]. Jedyne badania terenowe sugerujące zależność ilości tego metabolitu w porostach a ich występowaniem zostały przeprowadzone przez Gudjonsdottir i wsp. W badaniu tym porównywano ilościowo zawartość kwasu fumaroprotocetrarowego w próbkach *Cetraria islandica* zbieranych na Islandii w rejonie północnowschodnim, północnozachodnim, wschodnim, południowym i zachodnim. Najwięcej badanego związku zaobserwowano w próbce z lokalizacji południowej, a najmniej z północnowschodniej. Jednak w innej próbce zebranej na południu Islandii ilość kwasu fumaroprotocetrarowego była zdecydowanie niższa [Gudjonsdottir 1997]. W badaniach nad innym depsydonem, kwasem norstiktowym, wykazano zmniejszanie się jego ilości w plechach *Parmotrema hypotropum* pod wpływem większego nasłonecznienia [Armaleo 2008]. Efekty tych nielicznych badań są zbyt niejednoznaczne, aby można było wytłumaczyć i zinterpretować wyniki uzyskane w niniejszej pracy, jednak prawdopodobnie ilość kwasu fumaroprotocetrarowego wzrasta wraz z ilością nasłonecznienia, co mogą również potwierdzać badania Archera nad australijskimi gatunkami *Cladonia*, w których zawartość tego związku przekraczała 5% [Archer 1981].

8.5. Izolacja wybranych metabolitów

Kolejnym etapem pracy była izolacja badanych metabolitów wtórnych z gatunków o najwyższej ich zawartości. Dla wszystkich trzech związków takim surowcem okazał się być chrobotek leśny (*Cladonia arbuscula*), jednak izolacja z tego gatunku nie była możliwa ze względu na jego częściową ochronę. Dysponowano jedynie niewielką ilością materiału roślinnego, który został wykorzystany do analizy jakościowej i ilościowej. Stąd też konieczność izolacji z gatunków o nieco mniejszej zawartości badanych metabolitów. Kwas usninowy izolowano zatem z *Cladonia uncialis*, natomiast pozostałe dwa związki z *Cladonia macilenta* ssp. *floerkeana*. Obydwa gatunki są występują pospolicie w Polsce, nie podlegają ochronie gatunkowej, stąd mogą być traktowane jako potencjalne źródła do pozyskiwania omawianych substancji.

Izolację kwasu usninowego prowadzono z wykorzystaniem wyciągów heksanowych i chloroformowych, otrzymanych w sposób opisany powyżej. Z wyciągów tych, podczas ochładzania, wypadał osad w postaci żółtych igieł, które następnie poddawano wielokrotnie rekrytalizowano z etanolu. Uzyskano w ten sposób 87 mg substancji, której wygląd i temperatura topnienia odpowiadały kwasowi usninowemu. Tożsamość związku potwierdzono za pomocą analizy spektralnej (^1H - i ^{13}C -NMR). Analiza wykonanych widm (Tabele 32-33, Ryciny 18-21) wykazała zgodność z danymi literaturowymi [König 1999]. Taki sposób izolacji kwasu usninowego był jednym z najczęściej opisywanych przez innych autorów [Lohezic Le Devehat 2007, Ingolfssdottir 1998, Krivoshchekova 1983, Marcano 1999, Correche 1998, Einarsdottir 2010, Stark 1950, Jin 2008 i in.]. Warto podkreślić, że jest to szybka i efektywna metoda pozyskiwania badanego związku z materiału roślinnego. Inni autorzy stosowali także izolację za pomocą chromatografii kolumnowej [Santos 2004, Honda 2010, Perry 1999, Burlando 2009, Odabasoglu 2006, Bomfim 2009, Garcia Rowe 1999] lub cienkowarstwowej chromatografii preparatywnej [Yilmaz 2004, Tay 2004, Cetin 2008, Garcia Rowe 1999], w pojedynczych przypadkach wykorzystano chromatografię próżniowo-cieczową VLC [König 1999], preparatywną wysokosprawną chromatografię cieczową HPLC [Pereira 1994], jak również preparatywną chromatografię bibułową [Gertig 1960]. Opisano również chemoenzymatyczną syntezę kwasu usninowego [Hawranik 2009], wobec której taka metoda izolacji może stanowić alternatywę. Uzyskany w wyniku izolacji kwas usninowy wykorzystano następnie do badań aktywności biologicznej.

Izolacja atranoryny była prowadzona z wyciągu chloroformowego, po wcześniejszej ekstrakcji surowca heksanem. Początkowo stosowano metodę opisaną przez Melo i wsp. podczas izolacji atranoryny z innego gatunku rodzaju *Cladonia*, polegającą na pozyskiwaniu osadu, wypadającego z ochładzanego wyciągu [Melo 2008]. W tym przypadku jednak osad nie pojawił się, zatem zdecydowano się na izolację za pomocą cienkowarstwowej chromatografii preparatywnej, w standardowej fazie ruchomej toluen - lodowaty kwas octowy 170:30 [Orange 2001, Türk 2006]. Ze względu na trudności w rozdziale chromatograficznym i małą wydajność izolacji, udało się uzyskać jedynie 5 mg bezpostaciowej, bezbarwnej substancji, którą za pomocą metod chromatograficznych (TLC, HPLC) oraz pomiaru temperatury topnienia zidentyfikowano wstępnie jako atranorynę, która wykazywała jednak zanieczyszczenie innymi substancjami. W tej sytuacji zdecydowano się nie wykonywać analizy spektralnej wyizolowanej substancji - do wstępnej identyfikacji wystarczyły metody chromatograficzne oraz pomiar temperatury topnienia, natomiast ze względu na ograniczoną ilość materiału roślinnego, z którego izolowano związek, postanowiono zaniechać dalszych działań. Do badań aktywności biologicznej zastosowano zatem związek zakupiony komercyjnie.

Inni autorzy do izolacji atranoryny stosowali najczęściej metodę chromatografii kolumnowej [Santos 2004, Honda 2010, Lohezic Le Devehat 2007, Perry 1999, Wang 2005 i in.] lub cienkowarstwowej chromatografii preparatywnej [Yilmaz 2004, Türk 2006, Garcia Rowe 1999], w pojedynczych przypadkach wykorzystano preparatywną wysokosprawną chromatografię cieczową HPLC [Mutai 2007, Bugni 2009] lub chromatografię radiacyjną [Nasser 2009]. Często atranoryna wypadała jako osad podczas ochładzania wyciągów [Maia 2002, König 1999, Millot 2008, Melo 2008, Krivoshchekova 1983], jednak, jak już wspomniano, w tym przypadku była to metoda nieskuteczna.

Isolację kwasu fumaroprotocetrarowego prowadzono według metody opisanej przez Su i w sp., z własnymi modyfikacjami [Su 2003]. Surowiec macerowano w metanolu w temperaturze pokojowej. Uzyskany, zagęszczony wyciąg metanolowy rozpuszczano w gorącej wodzie i ekstrahowano kolejno heksanem i octanem etylu. Modyfikacja własna polegała na wprowadzeniu oczyszczania uzyskanej frakcji octanowej metodą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej, z zastosowaniem fazy ruchomej chloroform-metanol-kwas mrówkowy 97:5:1. Faza ta, uzyskana w ramach współpracy z Wydziałem Farmaceutycznym Uniwersytetu w Reykjavíku, została jeszcze zmodyfikowana poprzez zwiększenie ilości metanolu z początkowo 3 do 5 części. Pozwoliło to na lepszy rozdział chromatograficzny badanego związku, w porównaniu do fazy ruchomej toluen-kwas octowy 170:30, co wyrażało się większą wartością R_f (0.28). Uzyskano 80 mg bezpostaciowej, bezbarwnej substancji, której wygląd i temperatura topnienia odpowiadały kwasowi fumaroprotocetrarowemu. Tożsamość związku potwierdzono za pomocą analizy spektralnej ($^1\text{H-NMR}$). Analiza wykonanego widma (Tabela 34, Ryciny 22-23) wykazała zgodność z danymi literaturowymi [Su 2003]. Kwas fumaroprotocetrarowy był najczęściej izolowany z wykorzystaniem zjawiska wypadania osadu substancji podczas ochładzania wyciągu [Ranković 20008, Santos 2004, Su 2003, Krivoshechkova 1983, Bezivin 2004], jednak, podobnie jak w przypadku izolacji atranoryny, nie zaobserwowano pojawiania się osadu na którymkolwiek z etapów procesu izolacji, stąd też konieczność zastosowania preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej, którą wykorzystywali również inni autorzy [Yilmaz 2004, Ranković 2008]. W pojedynczych przypadkach do izolacji stosowano wysokosprawną chromatografię cieczową HPLC [Pereira 1994], a także metodę chromatografii kolumnowej [Lohezic Le Devehat 2007]. Zastosowana metoda pozwoliła na stosunkowo szybką i efektywną izolację badanego metabolitu, który następnie posłużył do przeprowadzenia badań aktywności biologicznej.

8.6. Wpływ badanych związków na komórki

W ostatnim etapie badań określano sposób oddziaływania badanych metabolitów wtórnych na komórki nowotworowe i prawidłowe. Badania te obejmowały wpływ związków zarówno na żywotność i proliferację komórek, jak i na ich morfologię, cytoszkielet aktynowy, aktywność migracyjną oraz indukcję procesu apoptozy w komórkach.

8.6.1. Wpływ badanych związków na żywotność komórek

Wpływ badanych związków na żywotność komórek linii HTB140, Du145 oraz HSF określano za pomocą dwóch testów: z błękitem trypanu oraz z dwuocetanem fluoresceiny i bromkiem etyldyny.

Kwas usninowy wykazał nie wykazał istotnego wpływu na żywotność żadnej z badanych linii komórkowych. W najwyższym badanym stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ kwas usninowy powodował obniżenie ilości żywych komórek linii HTB140 do 88.2 ± 2.3 i 86.6 ± 4.7 , komórek linii Du145 do 87.5 ± 2.2 i 84.1 ± 2.7 , natomiast fibroblastów do 92.0 ± 1.2 i 88.1 ± 1.3 , odpowiednio po 24 i 48 h inkubacji (Tabela 35, Rycina 24.).

Zestawienie badań nad aktywnością cytotoksyczną kwasu usninowego wobec szeregu linii komórkowych zwierzęcych i ludzkich przedstawia Tabela 11. Jedyną linią komórkową, użytą w pracy, którą można porównać bezpośrednio z badaniami innych autorów jest nowotwór prostaty Du145, pozostałe dwie linie (HTB140 i HSF) nie były dotąd badane pod kątem wpływu kwasu usninowego. W badaniach nad linią Du145 określano aktywność kwasu (+) i (-)-usninowego, podając wartość IC_{50} równą odpowiednio $57.4 \pm 2.1 \mu M$ i $45.9 \pm 7.0 \mu M$ [Bazin 2008] lub tylko kwasu (-)-usninowego, gdzie wartość ta wynosiła $15.8 \mu g/ml$ [Bezivin 2004]. W przypadku niniejszej pracy, kwas usninowy okazał się być nieaktywny wobec linii Du145, nawet w najwyższym badanym stężeniu $50 \mu g/ml$ (około $145 \mu M$) śmiertelność komórek wynosiła zaledwie około 15%. Tak duża różnica pomiędzy uzyskanymi wynikami i danymi innych autorów nie może być związana tylko z zastosowaniem innej metody określania cytotoksyczności, jednakże określenie przyczyny nie jest możliwe. Podobny słaby efekt cytotoksyczny kwasu (+)-usninowego opisano dla ludzkich komórek gwiazdki linii U373 MG, gdzie w stężeniu $25 \mu g/ml$ zaobserwowano żywotność $82.8 \pm 0.5\%$ [Amo de Paz 2010]. W większości opisanych doniesień aktywność cytotoksyczna kwasu usninowego była w większości przypadków umiarkowana, jednak w niektórych badaniach aktywność ta może być określona jako wysoka ($EC_{50} \leq 5 \mu g/ml$) [Einarsdottir 2010, Kumar 1999-2, Kristmundsdottir 2005]. Niektórzy autorzy podają jednak wartości świadczące o słabej aktywności, $EC_{50} \geq 50 \mu g/ml$ (około $145 \mu M$) [Bačkorova 2010].

Wyraźny wpływ obniżający ilość żywych komórek obydwu linii nowotworowych miała natomiast atranoryna. Komórki czerniaka w wyniku 48 h inkubacji z tym związkiem w stężeniu $20 \mu g/ml$ charakteryzowały się żywotnością obniżoną do 51.83 ± 4.35 , a w najwyższym badanym stężeniu ($30 \mu g/ml$) żywotność ich wynosiła 44.67 ± 3.20 (Tabela 36, Rycina 25 A). W podobny sposób reagowały komórki drugiej nowotworowej linii, Du145, których żywotność w najwyższym badanym stężeniu wyniosła 45.00 ± 4.98 (Tabela 36, Rycina 25 B). Badany związek nie miał wpływu na żywotność prawidłowych fibroblastów, powodując zmniejszenie ich żywotności zaledwie o kilka procent (90.33 ± 1.37) w najwyższym badanym stężeniu (Tabela 36, Rycina 25 C). Zestawienie badań nad aktywnością cytotoksyczną atranoryny wobec szeregu linii komórkowych zwierzęcych i ludzkich przedstawia Tabela 19. W żadnym z opisanych przypadków nie stosowano tych samych linii komórkowych, co w niniejszej pracy, zatem wpływ atranoryny na liniach czerniaka HTB140, nowotworu prostaty Du145 oraz fibroblastach skóry został zbadany w niniejszej pracy po raz pierwszy. Wobec linii badanych przez innych autorów, atranoryna charakteryzowała się słabą aktywnością cytotoksyczną, wartości IC_{50} mieściły się w przedziale od 83 do ponad $200 \mu M$ (około 30- $80 \mu g/ml$) [Bačkorova 2010, Correche 2004, Toledo Marante 2003,], w kilku przypadkach była nieaktywna [Perry 1999, Kumar 1999-2, König 1999, Kristmundsdottir 2005]. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują na dużo wyższą aktywność cytotoksyczną, w porównaniu do wyników opisanych w innych doniesieniach - wartość IC_{50} dla linii komórek nowotworowych wynosi około $20 \mu g/ml$ (ok. $50 \mu M$), natomiast wobec komórek prawidłowych atranoryna wykazała znikomą aktywność, co może sugerować jej selektywny profil działania.

W przypadku kwasu fumaroprotocetrarowego nie zaobserwowano aktywności cytotoksycznej wobec żadnej z badanych linii. Żywotność komórek w najwyższym badanym stężeniu po 48 h inkubacji z tym związkiem wynosiła 94 ± 1.00 dla linii HTB140 (Tabela 37,

Rycina 26 A), 96.00 ± 1.75 dla linii Du145 (Tabela 37, Rycina 26 B) oraz 99.00 ± 1.00 dla fibroblastów (Tabela 37, Rycina 26 C). Zestawienie nielicznych badań nad aktywnością cytotoksyczną kwasu fumaroprotocetrarowego wobec szeregu linii komórkowych zwierzęcych i ludzkich przedstawia Tabela 27. Bezivin i wsp. badali aktywność kwasu fumaroprotocetrarowego wobec linii użytej również w niniejszej pracy - ludzkiego nowotworu prostaty Du 145. Uzyskana wartość IC_{50} przekraczała $100 \mu\text{g/ml}$ [Bezivin 2004], co jest prawdopodobnie porównywalne z wynikami omawianej pracy, gdzie jednak zakończono badanie przy stężeniu $30 \mu\text{g/ml}$, ze względu na brak aktywności badanego związku mimo wzrostu jego stężenia. Najlepsze efekty uzyskali ci sami autorzy dla dwóch linii nowotworów zwierzęcych, gdzie wartości IC_{50} zawierały się w przedziale $75\text{-}82 \mu\text{g/ml}$ [Bezivin2004]. Dla pozostałych badanych ludzkich linii nowotworowych wartości IC_{50} przekraczały $100 \mu\text{g/ml}$ [Bezivin 2004], $150 \mu\text{g/ml}$ [Correche 2004] lub zaobserwowano brak aktywności [Kristmundsdottir 2005].

8.6.2. Wpływ badanych związków na proliferację komórek

W zakresie stężeń, w których nie zaobserwowano wpływu na żywotność, kwas usninowy wykazał istotny wpływ hamujący na proces proliferacji komórek w badanych liniach. Najbardziej podatne okazały się nowotworowe komórki prostaty oraz czerniaka, nieco słabszą aktywność kwas usninowy wykazał wobec prawidłowych fibroblastów skóry. W najniższym badanym stężeniu $10 \mu\text{g/ml}$ proliferacja komórek Du145 została obniżona o połowę już po 48 godzinach inkubacji z kwasem usninowym, natomiast po kolejnej dobie ilość komórek nie uległa dalszemu obniżeniu. W najwyższym badanym stężeniu po 72 godzinach inkubacji proliferacja komórek Du145 została praktycznie zahamowana (Tabela 38, Rycina 27 B). W przypadku komórek czerniaka hamujący wpływ kwasu usninowego na proliferację najwyraźniej zaznaczył się w stężeniach 25 i $50 \mu\text{g/ml}$, gdzie po 24 godzinach inkubacji ilość komórek spadła odpowiednio do 38 i 15% w odniesieniu do kontroli (Tabela 38, Rycina 27 A). Kwas usninowy hamował również proliferację prawidłowych komórek, jednak w nieco mniejszym stopniu niż w przypadku komórek nowotworowych. W najwyższym badanym stężeniu $50 \mu\text{g/ml}$ zaobserwowano spadek liczby komórek do 29 , 27 i 24% odpowiednio po 24 , 48 i 72 godzinach inkubacji (Tabela 38, Rycina 27 C). Wpływ kwasu usninowego na poziom proliferacji komórek został opisany jedynie w trzech pracach, wobec ludzkich prawidłowych keratynocytów [Kumar 1999-2, Burlando 2009] oraz czterech ludzkich linii nowotworowych: międzybłoniaka MM98 i nowotworu sromu A431 [Burlando 2009] oraz nowotworów trzustki Capan-2 i piersi T-47D [Einarsdottir 2010]. W przypadku komórek prawidłowych, kwas usninowy wykazał silny wpływ hamujący ich proliferację, wartości IC_{50} wynosiły $2.1 \pm 0.7 \mu\text{M}$ [Kumar 1999-2] i $76 \mu\text{M}$ [Burlando 2009]. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy są porównywalne z doniesieniami Burlando i wsp. Hamowanie proliferacji komórek prawidłowych, takich jak keratynocyty czy fibroblasty skóry, może mieć potencjalne znaczenie w schorzeniach przebiegających z nadmiernym namnażaniem się tych komórek, np. łuszczyca [Burlando 2009]. Wyniki opisane dla komórek nowotworowych linii A431 i MM98 są porównywalne z wynikami uzyskanymi w tej pracy, wartości IC_{50} mieszczą się w przedziale $20\text{-}30 \mu\text{M}$ (około $10\text{-}20 \mu\text{g/ml}$) [Burlando2009], natomiast kwas usninowy wykazał silniejszy

wpływ hamujący na namnażanie się komórek pozostałych dwóch linii, Capan-2 i T-467D - wartości IC_{50} wynosiły odpowiednio 5.3 i 4.2 $\mu\text{g/ml}$ [Einarsdottir 2010].

Atranoryna charakteryzowała się słabą aktywnością antyproliferacyjną wobec wszystkich trzech linii komórkowych. Badany związek wykazał nieco większy wpływ hamujący proliferację komórek nowotworowych, w porównaniu do komórek prawidłowych, powodując w najwyższym badanym stężeniu 30 $\mu\text{g/ml}$ spadek liczby komórek linii Du145 do 46%, komórek czerniaka do 53%, podczas gdy fibroblastów jedynie do 81% po 72 godzinach inkubacji (Tabela 39, Rycina 28). Najbardziej podatne na działanie atranoryny okazały się komórki nowotworu prostaty - po 48 godzinach inkubacji z 30 $\mu\text{g/ml}$ badanego związku liczba tych komórek spadła o połowę (Tabela 39, Rycina 28 B). Jedyną pracą opisującą badanie wpływu atranoryny na proliferację komórek dotyczy prawidłowych keratynocytów - badany związek nie wykazał aktywności hamującej proliferację tych komórek [Kumar 1999-2].

Kwas fumaroprotocetrarowy wykazał bardzo słaby wpływ hamujący na proliferację badanych linii komórkowych. Najbardziej odporne na działanie tego związku okazały się komórki nowotworu prostaty Du145 - po 72 godzinach inkubacji w najwyższym badanym stężeniu ich liczba wynosiła 94%, natomiast liczba fibroblastów 92%. Najlepszą, lecz wciąż słabą aktywność kwas fumaroprotocetrarowy wykazał wobec komórek czerniaka, powodując obniżenie proliferacji do 82% w najwyższym badanym stężeniu i po 72 godzinach inkubacji (Tabela 40, Rycina 29). Podobne badania, dotyczące wpływu kwasu fumaroprotocetrarowego na proliferację komórek, nie zostały dotąd opisane.

8.6.3. Wpływ badanych związków na morfologię komórek

Wpływ kwasu usninowego na morfologię komórek Du-145, HTB oraz HSF oraz atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego na morfologię komórek Du-145 określano na podstawie zdjęć, wykonanych za pomocą mikroskopu kontrastowo-fazowego.

Kwas usninowy wyraźnie zmieniał morfologię wszystkich badanych linii komórkowych. Komórki nowotworowe cechowały się większą wrażliwością na działanie tego związku w porównaniu do komórek prawidłowych. Najbardziej podatne na wpływ badanego związku okazały się komórki nowotworu prostaty. W najniższym przebadanym stężeniu (10 $\mu\text{g/ml}$) kwas usninowy powodował wyraźne rozplaszczanie komórek Du145, w odniesieniu do warunków kontrolnych. Zaobserwowano również bardzo wyraźną wakuolizację cytoplazmy komórek (Rycina 30 E). Podobny, aczkolwiek mniej zaznaczony, efekt widać w komórkach czerniaka (Rycina 30 D), natomiast prawidłowe fibroblasty skóry nie wykazały istotnych zmian morfologii (Rycina 30 F). Komórki Du 145 poddane inkubacji z kwasem usninowym w stężeniu 25 $\mu\text{g/ml}$ zmieniają kształt na wrzecionowaty, stopień wakuolizacji cytoplazmy wzrasta w porównaniu do stężenia 10 $\mu\text{g/ml}$ oraz pojawiają się pojedyncze, długie dendrytyczne wypustki (Rycina 30 H). W przypadku komórek czerniaka zmiany te są również bardziej widoczne niż w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$, komórki zmieniają kształt na bardziej wydłużony, postępująca jest również wakuolizacja cytoplazmy (Rycina 30 G). Fibroblasty poddane działaniu kwasu usninowego w stężeniu 25 $\mu\text{g/ml}$ zmieniają kształt na bardziej wydłużony, są bardziej obkurczone i nie posiadają lamellipodiów. Nie zaobserwowano wakuolizacji cytopla-

zmy (Rycina 30 I). Do tej pory nie opisano wpływu kwasu usninowego na morfologię komórek.

Atranoryna wykazała wyraźny wpływ na morfologię wszystkich badanych linii komórkowych. Komórki nowotworowe cechowały się większą wrażliwością na działanie tego związku w porównaniu do komórek prawidłowych. Najbardziej podatne na wpływ badanego związku okazały się komórki nowotworu prostaty. Komórki nowotworu prostaty inkubowane z atranoryną w stężeniach 10 i 25 µg/ml cechowało znaczne, postępujące wydłużanie kształtu oraz pojawianie się wypustek dendrytycznych, natomiast badany związek nie powodował wakuolizacji cytoplazmy tych komórek (Rycina 31 B, C). Komórki czerniaka inkubowane z atranoryną w stężeniu 10 µg/ml charakteryzowały się większym rozplaszczaniem w porównaniu do warunków kontrolnych, zaobserwowano także wakuolizację cytoplazmy. Procesy te były bardziej pogłębione w stężeniu 25 µg/ml (zdjęcia nie pokazane). Prawidłowe fibroblasty wykazały najmniejszą wrażliwość na działanie atranoryny. Pod wpływem badanego związku komórki te nieznacznie się wydłużały i obkurczały, jednak zmiany te nie były tak znaczące, jak w przypadku komórek nowotworowych (zdjęcia nie pokazane). Do tej pory nie opisano wpływu atranoryny na morfologię komórek.

Kwas fumaroprotocetrarowy w zakresie badanych stężeń nie wykazał istotnego wpływu na morfologię komórek czerniaka i prawidłowych fibroblastów. W przypadku linii nowotworu prostaty, inkubowanych z badanym związkiem w stężeniu 25 µg/ml, zaobserwowano bardzo niewielkie zmiany kształtu komórek (Rycina 31 D, E). Do tej pory nie opisano wpływu kwasu fumaroprotocetrarowego na morfologię komórek.

8.6.4. Wpływ badanych związków na cytoszkielet aktynowy komórek

Wpływ kwasu usninowego i atranoryny na cytoszkielet aktynowy badanych komórek zbadano, wykorzystując metodę selektywnego wiązania się falloidyny, znakowanej tetraizotiocyanianem rodaminy, do aktyny.

Kwas usninowy powodował reorganizację cytoszkieletu aktynowego we wszystkich badanych typach komórek, w sposób zależny od dawki. Najbardziej podatne na wpływ badanego związku były komórki czerniaka. W komórkach nowotworowych obu badanych linii efekt reorganizacji cytoszkieletu aktynowego pod wpływem kwasu usninowego jest dobrze zauważalny. Włókna naprężeniowe, widoczne w warunkach kontrolnych (Rycina 32 A, B), zanikają stopniowo, wraz ze wzrostem stężenia badanego związku, a F-aktyna gromadzi się w obszarze okołojądrowym. W komórkach inkubowanych z wyższym z badanych stężeń kwasu usninowego obserwuje się stopniowy spadek intensywności fluorescencji TRITC-falloidyny, co sugeruje spadek ilości F-aktyny (Rycina 32 D, G, E, H). W fibroblastach pod wpływem kwasu usninowego stwierdzono zanik włókien naprężeniowych typowych dla tych komórek. W komórkach inkubowanych z badanym związkiem w stężeniu 10 µg/ml zauważalne są nieregularne wiązki F-aktyny wzdłuż błony komórkowej, które stopniowo zanikają wraz ze wzrostem stężenia związku (Rycina 32 F, I). Dotychczas nie ukazały się prace opisujące wpływ kwasu usninowego na cytoszkielet aktynowy, jedyna podobna praca dotyczy badań nad innymi elementami strukturalnymi - mikrotubulami [O'Neill 2009]. Kwas usninowy w stężeniu 29 µM (około 10 µg/ml) nie powodował żadnych widocznych zmian w mikrotubu-

lach ludzkich komórek nowotworowych linii MCF7 i H1299 [O'Neill 2009]. W niniejszej pracy kwas usninowy w takim samym stężeniu powodował już wyraźne zmiany w cytoszkielecie aktynowym, które jeszcze pogłębiały się wraz ze wzrostem stężenia badanego związku.

Podobny efekt zaobserwowano dla atranoryny. Związek ten również powodował wyraźną reorganizację i dezintegrację cytoszkieletu aktynowego w komórkach wszystkich badanych linii, zarówno nowotworowych, jak i prawidłowych, w sposób zależny od dawki. Najbardziej wyraźny efekt zaobserwowano w komórkach czerniaka. W komórkach nowotworowych obydwu badanych linii wyraźnie widać zanik włókien naprężeniowych, widocznych w komórkach kontrolnych (Rycina 33 A, B), pod wpływem badanego związku. W przypadku komórek czerniaka inkubowanych z atranoryną w stężeniu 10 µg/ml widać znaczny spadek intensywności fluorescencji, co jest związane z zanikiem F-aktyny w tych komórkach (Rycina 33 D). Efekt ten jest niemal całkowity w wyższym z badanych stężeń (Rycina 33 G). Podobny, choć nie tak intensywny zanik F-aktyny można zaobserwować w komórkach nowotworu prostaty, inkubowanych z badanym związkiem, gdzie aktyna gromadzi się wokół jąder tych komórek (Rycina 33 E, H). Najsłabszy wpływ atranoryna wykazała na prawidłowe fibroblasty skóry, gdzie zanik włókien naprężeniowych nie jest tak intensywny, jak w przypadku komórek linii nowotworowych (Rycina 33 F, I). Jest to pierwszy opisany przypadek badania wpływu atranoryny na elementy cytoszkieletu.

Kwas fumaroprotocetrarowy nie został zbadany pod kątem oddziaływania na cytoszkielet aktynowy ze względu na brak jego wpływu na morfologię badanych komórek.

8.6.5. Wpływ kwasu usninowego i atranoryny na aktywność migracyjną komórek

Udowodniono istnienie ścisłego powiązania pomiędzy cytoszkieletem aktynowym a powstawaniem włókien naprężeniowych, nadawaniem komórkom kształtu oraz ich rozplaszczaniem [Osborn i wsp., 1978]. Komórka może zmienić kształt czy migrować tylko wtedy, gdy ma zapewniony stały kontakt z podłożem poprzez białka macierzy zewnątrzkomórkowej, które łączą filamenty aktynowe z białkami kontaktów ogniskowych [Korohoda 1992, Buendia 1990]. Zmiany zaobserwowane w cytoszkielecie aktynowym komórek, wywołane inkubacją w obecności kwasu usninowego i atranoryny sugerują, że związki te mogą wpływać hamująco na aktywność migracyjną komórek. Zbadano zatem wpływ obydwu związków na zdolność ruchową komórek linii nowotworowych. Zdolność ta charakteryzuje przede wszystkim właśnie komórki zmienione nowotworowo, co umożliwia im między innymi naciekanie okolicznych tkanek oraz tworzenie przerzutów *in vivo*. Wśród komórek prawidłowych zdolność do migracji jest bardzo rzadka, a proces ten odbywa się dużo wolniej niż w komórkach nowotworowych. Stąd nie zdecydowano się na wybór fibroblastów jako linii modelowej do badań aktywności ruchowej.

Kwas usninowy w stosunkowo niskim stężeniu (10 µg/ml) wykazał wyraźny wpływ hamujący ruchliwość obu linii komórkowych, przy czym zdecydowanie silniejszy wpływ zaobserwowano w przypadku komórek czerniaka. Badany związek podany w stężeniu 10 µg/ml bezpośrednio przed nagraniem filmu powodował spadek aktywności ruchowej komórek nowotworu prostaty (Rycina 34 B), wartość średniej drogi całkowitej zmalała o ponad 60% ($92,67 \pm 4,32$ µm) w porównaniu z kontrolą ($243,28 \pm 7,75$ µm) (Tabela 41). Podobnie

zmały pozostałe współczynniki opisujące ruch (Tabela 41). 24-godzinna preinkubacja komórek z badanym związkiem również spowodowała spadek średniej długości drogi całkowitej, do ponad 70% ($77,58 \pm 6,76 \mu\text{m}$), co przedstawia Tabela 41. Komórki HTB-140 wykazały większą wrażliwość na działanie kwasu usninowego w porównaniu do komórek DU-145. Zaobserwowano znaczny spadek aktywności migracyjnej komórek poddanych działaniu bezpośrednio podanego kwasu usninowego, w porównaniu do kontroli, na co wskazują wartości parametrów opisujących ruch (Tabela 41): średnia długość drogi całkowitej zmalała o 80% a wartość średniego przemieszczenia całkowitego wyniosła $10,18 \pm 0,76 \mu\text{m}$, co stanowi 30% jego wartości w warunkach kontrolnych ($33,50 \pm 1,66 \mu\text{m}$). Wobec takich wyników - niemal całkowicie zahamowanej zdolności migracyjnej - nie wykonywano dalszego eksperymentu z preinkubacją komórek z badanym związkiem. Do tej pory nie opisano wpływu kwasu usninowego na migrację komórek.

Atranoryna w stosunkowo niskim stężeniu ($10 \mu\text{g/ml}$) wykazała wyraźny wpływ hamujący ruchliwość obu linii komórkowych, przy czym zdecydowanie silniejszy wpływ zaobserwowano w przypadku komórek czerniaka (Rycina 35 E, F). Po podaniu atranoryny bezpośrednio przed nagraniem filmu, zaobserwowano spadek średniej długości drogi komórek czerniaka do około 73% w porównaniu do warunków kontrolnych (Tabela 43). Po 24 godzinnej preinkubacji z badanym związkiem zaobserwowano spadek tego parametru aż do 35% w odniesieniu do kontroli. W obydwu przypadkach wartości pozostałych współczynników opisujących ruch również zmały (Tabela 43), co wskazuje na wyraźne zahamowanie aktywności migracyjnej komórek czerniaka pod wpływem atranoryny. Komórki Du 145 okazały się być mniej wrażliwe na działanie atranoryny (Rycina 35 B, C). Po bezpośrednim podaniu badanego związku średnia długość drogi całkowitej zmalała do około 60% w odniesieniu do kontroli (Tabela 42). 24 godzinna inkubacja z atranoryną nie wpłynęła istotnie na zmniejszenie tego parametru, natomiast wartości niektórych parametrów opisujących ruch nieznacznie wzrosły (Tabela 42), co wskazuje na brak zależności pomiędzy aktywnością a wydłużaniem czasu kontaktu z badanym związkiem. Do tej pory nie opisano wpływu atranoryny na migrację komórek.

8.6.6. Wpływ kwasu usninowego i atranoryny na morfologię jąder komórkowych

Ze względu na zaobserwowany wcześniej efekt działania kwasu usninowego i atranoryny (wpływ na żywotność, proliferację i morfologię komórek) w kolejnym etapie pracy postanowiono zbadać wpływ tych związków na morfologię jąder komórkowych i wywoływanie procesu apoptotycznego. Do badań wybrano linię nowotworu prostaty Du 145, której komórki były najbardziej podatne na działanie cytotoksyczne obydwu związków. Jądra komórkowe wybarwiano barwnikiem Hoechst i obserwowano pod mikroskopem. Kwas fumaroprotocetarowy ze względu na bardzo słabe działanie nie został poddany temu badaniu.

Kwas usninowy już w stężeniu $10 \mu\text{g/ml}$ oraz $25 \mu\text{g/ml}$ zmienia morfologię jąder komórkowych. Po 72 h inkubacji komórek z badanym związkiem obserwowano wyraźną fragmentację jąder, co może wskazywać na apoptotyczny mechanizm śmierci komórkowej pod wpływem kwasu usninowego (pojawienie się ciałek apoptotycznych). Efekt ten był zależny od stężenia (Rycina 36). Podobne badania przeprowadzono w kilku pracach, wykorzystując

wybarwianie jąder komórek zwierzęcych i ludzkich linii nowotworowych barwnikiem Hoechst [Bezivin 2004, Bazin 2008] lub DAPI [Bačkorova 2010]. Kwas usninowy powodował zmianę morfologii jąder komórkowych, wskazującą na proces apoptotyczny, w zbliżonym zakresie stężeń: 6-12 $\mu\text{g/ml}$ [Bezivin 2004] i 17-35 μM (około 7-15 $\mu\text{g/ml}$) dla zwierzęcych komórek białaczki, a także 50 i 100 μM (około 18 i 36 $\mu\text{g/ml}$) dla ludzkich linii nowotworu jajnika i jelita grubego oraz białaczki [Bačkorova 2010]. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy są zatem porównywalne z doniesieniami innych autorów, w przypadku ludzkich linii nowotworowych kwas usninowy wykazał wyższą aktywność.

W celu potwierdzenia stymulacji procesu apoptozy przez kwas usninowy wykonano analizę z zastosowaniem cytometru przepływowego.

W przypadku atranoryny, w zakresie badanych stężeń (20 i 30 $\mu\text{g/ml}$) nie zaobserwowano wpływu na wygląd jąder komórkowych (Rycina 37), stąd nie kontynuowano badań z zastosowaniem cytometru przepływowego. W podobnych badaniach nad czterema ludzkimi liniami nowotworowymi (jajnika, piersi i dwóch liniach nowotworu jelita grubego) wykazano wpływ atranoryny w stężeniach wyższych, niż stosowane w niniejszej pracy - 100 i 200 μM (około 40 i 80 $\mu\text{g/ml}$) na zmiany w morfologii jąder komórkowych, sugerujących zmiany apoptotyczne. Stymulacja procesu apoptozy została następnie wykazana za pomocą badania z zastosowaniem cytometru przepływowego [Bačkorova 2010].

8.6.7. Wpływ kwasu usninowego na indukcję apoptozy

Wpływ kwasu usninowego na stymulację procesu apoptozy w komórkach nowotworu prostaty Du145 zbadano przy użyciu cytometru przepływowego, wykorzystując równoczesne barwienie jodkiem propidiiowym (wybarwia komórki nekrotyczne) oraz aneksyną V (wybarwia komórki apoptotyczne). Zaobserwowano że kwas usninowy wywołuje apoptozę w badanych komórkach, w sposób zależny od dawki.

Kwas usninowy w najniższym badanym stężeniu (10 $\mu\text{g/ml}$) stymulował proces apoptotyczny w ponad 33% komórek, co stanowi ponad dwukrotnie więcej niż w warunkach kontrolnych (Rycina 38, Tabela 44). Po inkubacji z kwasem usninowym w stężeniu 25 $\mu\text{g/ml}$ ilość komórek apoptotycznych wzrosła do ponad 56%. We wszystkich próbkach badanych zaobserwowano również niewielką - około lub poniżej 1% - ilość komórek nekrotycznych. Ustalenie mechanizmu apoptozy pod wpływem kwasu usninowego wymaga dalszych badań, z zastosowaniem innych metod. Inni autorzy również opisywali wpływ kwasu usninowego na stymulację procesu apoptozy, stosując podobną metodykę lecz inne linie komórkowe - ludzkie linie nowotworu piersi, trzustki, jajnika, jelita grubego, białaczki lub zwierzęce linie białczkowe lub prawidłowe hepatocyty [Correche 2004, Einarsdottir 2010, Koparal 2006, Bezivin 2004, Bazin 2008, Mayer 2005, Bačkorova 2010]. Doniesienia na temat stymulacji procesu apoptozy przez kwas usninowy są sprzeczne, dwie spośród cytowanych prac wykazują brak tego wpływu [Correche 2004, Einarsdottir 2010], natomiast pozostałe cztery stwierdzają wyraźne znamiona zmian apoptotycznych w badanych liniach komórkowych [Koparal 2006, Bezivin 2004, Bazin 2008, Bačkorova 2010]. Prace nie wskazujące na proapoptotyczną aktywność kwasu usninowego dotyczą badań zarówno na komórkach prawidłowych (szczurze hepatocyty), jak i nowotworowych (ludzkie nowotwory piersi i trzustki). Co ciekawe, w pra-

cach wykluczających i wskazujących na proces apoptozy pod wpływem badanego związku zastosowano podobną metodykę (cytometr przepływowy, aktywność kaspazy³, fragmentacja jąder komórkowych). Wskazywać to może na selektywne działanie kwasu usninowego jako stymulatora procesu apoptozy, w zależności od rodzaju użytych komórek i innych czynników. Zakres użytych stężeń kwasu usninowego, przy których obserwowano znamiona apoptozy, w opisanych badaniach, jak i w niniejszej pracy są podobne: 10-30 µg/ml.

9. PODSUMOWANIE

Analiza jakościowa gatunków polskich wskazała na obecność kwasu usninowego w czterech spośród sześciu badanych gatunków (*Cladonia arbuscula*, *C. gracilis*, *C. macilenta* ssp. *floerkeana* i *C. uncialis*), atranoryny w czterech badanych gatunkach (*Cladonia arbuscula*, *C. gracilis*, *C. macilenta* ssp. *floerkeana* i *C. subulata*), natomiast kwasu fumaroprotocetrarowego nie stwierdzono jedynie w *Cladonia uncialis*.

Po raz pierwszy stwierdzono obecność kwasu usninowego w *Cladonia gracilis*, atranoryny w *C. arbuscula*, *C. macilenta* ssp. *floerkeana* i *C. subulata*, natomiast kwasu fumaroprotocetrarowego w *C. macilenta* ssp. *floerkeana*. Wbrew doniesieniom literaturowym, nie potwierdzono obecności atranoryny w *Cladonia furcata*, co może wynikać z faktu badania próbek z innej lokalizacji geograficznej.

Porównawcza analiza jakościowa gatunków polskich i islandzkich wskazała na różnice w składzie - wyciągi z surowców polskich charakteryzowały się obecnością wielu związków, podczas gdy surowce islandzkie były wyraźnie uboższe składem. Ponadto zaobserwowano różnice w występowaniu atranoryny w *Cladonia arbuscula* - związek ten był obecny w próbkach zebranych w Polsce, natomiast nie wykryto go w próbkach islandzkich.

Optymalnym sposobem ekstrakcji wszystkich badanych metabolitów wtórnych jest ekstrakcja z zastosowaniem szeregu rozpuszczalników o wzrastającej polarności z użyciem tej samej próbki surowca, a najlepsze rezultaty osiągnięto przy zastosowaniu chloroformu, po wcześniejszej ekstrakcji surowca heksanem. Stopień rozdrobnienia surowca ma wpływ na ekstrakcję związków - w przypadku atranoryny zalecane jest sproszkowanie surowca, dla pozostałych dwóch metabolitów surowiec nie powinien być sproszkowany.

Wyniki analizy ilościowej polskich gatunków wskazują na *Cladonia arbuscula* jako na gatunek najbogatszy we wszystkie badane metabolity, jednak ze względu na częściową ochronę gatunkową nie może on być traktowany jako źródło do pozyskiwania tych związków. Takim źródłem kwasu usninowego może być natomiast *Cladonia uncialis* (0.49%), a dla atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego *C. macilenta* ssp. *floerkeana* (odpowiednio 0.14% i 0.81%) - gatunki powszechnie występujące w Polsce. Warto również prowadzić dalsze badania ilościowe na innych gatunkach rodzaju *Cladonia*, celem wyłonienia kolejnych potencjalnych źródeł metabolitów porostowych.

Porównawcza analiza ilościowa gatunków zebranych w Polsce i na Islandii wskazuje na zbliżoną zawartość kwasu usninowego w *Cladonia arbuscula* z obydwu lokalizacji, natomiast dwukrotnie większą zawartość tego związku zaobserwowano w islandzkich próbkach *C. uncialis* w odniesieniu do gatunku polskiego. Co ciekawe, w przypadku pozostałych dwóch metabolitów, bogatszym gatunkiem był zebrany w Polsce *Cladonia arbuscula*. Wskazuje to na zróżnicowane zależności pomiędzy intensywnością biosyntezy wtórnych metabolitów porostowych i warunkami klimatyczno-glebowymi występowania porostów. Zbadanie tych po-

wiązań wymaga dalszych, szeroko zakrojonych badań, obejmujących różne związki, gatunki i lokalizacje geograficzne.

Izolacja kwasu usninowego i kwasu fumaroprotocetrarowego była prosta, efektywna, co może stanowić alternatywę dla chemicznej syntezy tych związków. Szczególnie warto podkreślić mały nakład czasu i kosztów związanych z izolacją kwasu usninowego. W przypadku atranoryny proces izolacji okazał się trudny, czasochłonny i mało wydajny. Być może należałoby w przyszłości wybrać inną, bardziej czułą i skuteczną metodę izolacji tego związku, jak na przykład preparatywną wysokosprawną chromatografię cieczową.

Badane metabolity charakteryzowały się zróżnicowanym oddziaływaniem na komórki. Najbardziej podatne na wpływ badanych związków okazały się komórki nowotworowe obydwu linii – czerniaka HTB140 i nowotworu prostaty Du145 - w stopniu porównywalnym w granicach błędu. Jedynie w przypadku hamowania aktywności migracyjnej oraz wywoływaniu procesu apoptozy zaobserwowano różną wrażliwość obu linii nowotworowych na działanie badanych metabolitów. Aktywność ruchowa komórek linii HTB140 była hamowana znacznie silniej pod wpływem obydwu związków niż aktywność komórek drugiej z badanych linii, Du145. Może to wynikać z faktu, że linia ta posiada wysoki stopień złośliwości, co może powodować jej swoistą oporność. Dezintegracja cytoszkieletu aktynowego i związane z tym hamowanie migracji komórek nowotworowych przez obydwa związki może mieć znaczenie w kontekście procesów metastatycznych, jednak sugestia ta wymaga poszerzenia badań o eksperymenty *in vivo*.

Zmiany w morfologii jąder komórkowych, uwidaczniające się w obrazie mikroskopowym w postaci tzw. ciałek apoptotycznych, a co za tym potwierdzona za pomocą cytometru przepływowego indukcja apoptozy pod wpływem kwasu usninowego, były obserwowane jedynie w komórkach nowotworu prostaty Du145. W komórkach drugiej z badanych linii takich zmian nie stwierdzono. Określenie dokładnego mechanizmu stymulacji apoptozy przez kwas usninowy wymaga dalszych badań, obejmujących bardziej szczegółowe metody biochemiczne.

Najbardziej aktywnym związkiem był kwas usninowy, który, mimo słabego wpływu na żywotność komórek, wykazał w tym samym zakresie stężeń wysoką aktywność antyproliferacyjną, powodował zmiany w morfologii komórek, jąder komórkowych i cytoszkieletu aktynowego, hamował migrację komórek i indukował w nich procesy apoptotyczne. Aktywność związku była zależna od stosowanej dawki i czasu inkubacji, jednak nie była selektywna - związek wpływał zarówno na komórki nowotworowe, jak i prawidłowe.

Atranoryna charakteryzowała się wysoką aktywnością cytotoksyczną i umiarkowaną aktywnością antyproliferacyjną. Wyraźnie zmieniała morfologię komórek oraz powodowała zmiany w ich cytoszkiecie aktynowym, jak również hamowała ich aktywność migracyjną. Badany związek nie wpływał na morfologię jąder komórkowych i nie stymulował procesu apoptozy. Warto podkreślić selektywność działania atranoryny wobec komórek nowotworowych - oddziaływanie związku na komórki prawidłowe było znacznie słabsze.

Kwas fumaroprotocetrarowy wykazał słabą aktywność antyproliferacyjną oraz nieznacznie zmieniał morfologię komórek. W pozostałych badanych aspektach nie wykazano aktywności tego związku. Co ciekawe, podobieństwo strukturalne do atranoryny, oraz przynależność do tej samej grupy pochodnych β -orcynolu, sugerowałoby porównywalną aktywność. Jednak niewielkie różnice w strukturze chemicznej powodują znaczny spadek aktywności lub jej brak. W przyszłości warto byłoby dokładniej określić, które z grup funkcyjnych kwasu fumaroprotocetrarowego odpowiedzialne są za tak słabą jego aktywność i stworzyć pochodne tego związku, ukierunkowane na zwiększenie aktywności. Wysoka zawartość kwasu fumaroprotocetrarowego w porostach, jak również brak trudności z jego izolacją z materiału roślinnego, przemawiają na korzyść tej idei.

Opisane wyniki oddziaływania kwasu usninowego i atranoryny na komórki w warunkach *in vitro* mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań nad ich potencjalnym działaniem przeciwnowotworowym. Badania takie mogłyby obejmować eksperymenty na zwierzętach z wszczepionymi nowotworami, powinny jednak być uzupełnione o określenie biodostępności i toksyczności obydwu związków. Dla kwasu usninowego określono dobrą biodostępność w kilku eksperymentach na zwierzętach, jednak dla atranoryny badania takie nie były dotychczas przeprowadzone. Ponadto, kwas usninowy w licznych badaniach wykazywał działanie hepatotoksyczne, które jednak niwelowano poprzez zastosowanie specjalnej formulacji jego podawania (nanokapsułki). Wysoka podatność komórek nowotworu prostaty o wysokim stopniu złośliwości na działanie kwasu usninowego mogłaby zostać potencjalnie wykorzystana w przyszłości w leczeniu tego schorzenia, co wymagałoby jednak opracowania odpowiedniej postaci leku celem uniknięcia efektu ubocznego w postaci uszkodzania komórek wątroby. Toksyczność atranoryny nie została dotąd zbadana, warto zatem uzupełnić te informacje wynikami odpowiednio przeprowadzonych badań.

W kilku przypadkach odnotowano także pojawianie się skórnoo alergicznego w przypadku kontaktu z kwasem usninowym, zatem zewnętrzne stosowanie tego związku w przypadku nowotworów skóry (czerniak) czy chorób związanych z hiperproliferacją komórek nabłonka skóry mogłoby się wiązać z niewielkim ryzykiem pojawienia się alergii kontaktowej.

Porównawcze zestawienie wyników uzyskanych w pracy przedstawia Tabela 45.

Tabela 45. Zestawienie wyników analizy fitochemicznej i aktywności kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego, przeprowadzonych w pracy

BADANY CZYNNIK	KWAS USNINOWY	ATRANORYNA	KWAS FUMARO-PROTOCETRAROWY
ANALIZA FITOCHEMICZNA			
optymalny stopień rozdrobnienia surowca	rozdrobniony	sproszkowany	rozdrobniony
optymalny rozpuszczalnik	heksan/chloroform	heksan/chloroform	heksan/chloroform
obecność w surowcach	w czterech z sześciu	w czterech z sześciu	w pięciu z sześciu
zawartość w surowcach	0.036-0.538%	0.0013-0.511%	0.08-2.34%
izolacja	prosta, efektywna	trudna, mało wydajna	skuteczna, efektywna
AKTYWNOŚĆ			
aktywność cytotosycyczna	niska	wysoka, selektywna	brak
aktywność antyproliferacyjna	wysoka	średnia, selektywna	niska
wpływ na morfologię komórek	silny	silny, selektywny	słaby
wpływ na morfologię jąder komórkowych	silny	brak	nb
wpływ na cytoszkielet aktynowy	silny	silny, selektywny	nb
wpływ na aktywność migracyjną komórek	hamujący	hamujący	nb
stymulacja apoptozy	tak	nie	nb

nb - nie badano

Piśmiennictwo:

1. Al-Bekairi A.M., Qureshi S., Chaudhry M.A., Krishna D.R., Shah A.H.: "Effect of (+)-usnic acid on testicular nucleic acids and epididymal spermatozoa in mice", *Fitoterapia*, 1991, LXII, 258-260
2. Al-Bekairi A.M., Qureshi S., Chaudhry M.A., Krishna D.R., Shah A.H.: "Mitodepressive, clastogenic and biochemical effects of (+)-usnic acid.", *J Ethnopharm*, 1991, 33, 217-220
3. Abo-Khatwa A.N., Al-Robai A.A., Al-Jawhari D.A.: "The uncoupling of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria in vivo by usnic acid.", *JKAU*, 2005, 17, 35-45
4. Amo De Paz G., Raggio J., Gómez-Serranillos M.P., Palomino O.M., González-Burgos E., Carretero M.E., Crespo A.: "HPLC isolation of antioxidant constituents from *Xanthoparmelia* ssp.", *J Pharmaceut Biomed*, 2010, 53, 165-171
5. Archer A.W.: "Quantitative distribution of lichen products in Australian scyphose *Cladonia* species", *Lichenologist*, 1981, 13, 259-263
6. Armaleo D., Zhang Y., Cheung S.: "Light might regulate divergently depside and depsidone accumulation in the lichen *Parmotrema hypotropum* by affecting thallus temperature and water potential", *Mycologia*, 2008, 100, 565-576
7. Arribas L., Vicente C.: "Enzyme inhibition by usnic acids", *Curr Enz Inhib*, 2008, 4, 180-185
8. Aslan A., Güllüce M., Sökmen M., Adigüzel A., Sahin F., Özkan A.: "Antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Evernia divaricata*, *Evernia prunastri* and *Neofuscella pulla*", *Pharm Biol*, 2006, 44, 247-252
9. Bačkor M., Fahselt D.: "Physiological attributes of the lichen *Cladonia pleurota* in heavy metal-rich and control sites near Sudbury", *Environ Exp Bot*, 2004, 52, 149-159
10. Bačkor M., Klemová K., Bačkorová M., Ivanova V.: "Comparison of the phytotoxic effects of usnic acid on cultures of free-living alga *Scenedesmus quadricauda* and aposymbiotically grown lichen photobiont *Trebouxia erici*", *J Chem Ecol*, 2010, 36, 405-411
11. Bačkorová M., Bačkor M., Mikeš J., Jendzelovsky 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, 37-44
12. Barbosa-Filho J.M., Alencar A.A., Nunes X.P., de Andrade Tomaz A.C., Sena-Filho J.G., Athayde-Filho P.F., Silva M.S., Vanderlei de Souza M.F., Leitão da-Cunha E.F.: "Sources of alpha, beta, gamma, delta and epsilon carotenes: a twentieth century review", *Braz J Pharmacognosy*, 2008, 18, 135-154
13. Barton, D.H.R., Deflorin, A.M., Edwards, O.E.: "The synthesis of usnic acid", *J Chem Soc*, 1956, 530-534
14. Bazin M.A., Le Lamer A.C., Delcros J.G., Rouaud I., Uriac P., Boustie J., Corbel J.C., Tomasi S.: "Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives", *Bioorgan Med Chem*, 2008, 16, 6860-6866
15. Be Gora M.D., Fahlset D.: "An alternative method for quantification of lichen secondary products", *The Bryologist*, 2000, 103, 563-567
16. Be Gora M.D., Fahlset D.: "Usnic acid and atranorin concentrations in lichens in relation to bands of UV irradiance", *The Bryologist*, 2001, 104, 134-140
17. Behera B.C., Verma N., Sonone A., Makhija U.: "Detremination of antioxidative potential of lichen *Usnea ghattensis* in vitro", *LWT*, 2006, 39, 80-85
18. Behera B.C., Verma N., Sonone A., Makhija U.: "Tissue culture of some lichens and screening of their antioxidant, antityrosinase and antibacterial properties", *Phytother*

- Res, 2007, 21, 1159–1170
19. Bernard G., Gimenez-Arnau E., Rastogi S.C., Heydorn S., Johansen J.D., Menne T., Goossens A., Andersen K., Lepoittevin J.P.: “Contact allergy to oak moss: search for sensitizing molecules using combined bioassay-guided chemical fractionation, GC-MS, and structure-activity relationship analysis”, *Arch Dermatol Res*, 2003, 295, 229–235
 20. Bézivin C., Tomasi S., Lohézic-Le Dévéhat F., Boustie J.: “Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cells”, *Phytomedicine*, 2003, 10, 499–503
 21. Bézivin C., Tomasi S., Rouaud I., Delcros J.G., Boustie J.: “Cytotoxic activity of compounds from the lichen: *Cladonia convoluta*”, *Planta Med*, 2004, 70, 874–877
 22. Białońska D., Dayan F.E.: “Chemistry of the lichen *Hypogymnia physodes* transplanted to an industrial region”, *J Chem Ecol*, 2005, 31, 2975–2991
 23. Bjerke J.W., Lerfall K., Elvebakk A.: “Effects of ultraviolet radiation and PAR on the content of usnic and divaricatic acids in two arctic-alpine lichens”, *Photochem Photobiol Sci*, 2002, 1, 678–685
 24. Bjerke J.W., Zielke M., Solheim B.: “Effects of ultraviolet radiation and PAR on the content of usnic and divaricatic acid in two arctic-alpine lichens”, *New Phytol*, 2003, 159, 361–367
 25. Bjerke J.W., Elvebakk A., Dominguez E., Dahlback A.: “Seasonal trends in usnic acid concentrations of Arctic, alpine and Patagonian populations of the lichen *Flavocetraria nivalis*”, *Phytochemistry*, 2005, 66, 337–344
 26. Blanch M., Blanco Y., Fontaniella B., Legaz M.E., Vicente C.: “Production of phenolics by immobilized cells of the lichen *Pseudevernia furfuracea*: the role of epiphytic bacteria”, *Int Microbiol*, 2001, 4, 89–92
 27. Boehm F., Clarke K., Edge R., Fernandez E., Navaratnam S., Quilhot W., Rancan F., Truscott T.G.: “Lichens-photophysical studies of potential new sunscreens”, *J Photoch Photobio B*, 2009, 95, 40–45
 28. Bomfim R.R., Araújo A.A.S., Cuadros-Orellana S., Melo M.G.D., Quintans-Júnior L.J., Cavalcanti S.C.H.: “Larvicidal activity of *Cladonia substellata* extract and usnic acid against *Aedes aegypti* and *Artemia salina*”, *Lat Am J Pharm*, 2009, 28, 580–4
 29. Bouaid K., Vicente C.: “Chlorophyll degradation effected by lichen substances”, *Ann Bot Fennici*, 1998, 35, 71–74
 30. Boustie J., Grube M.: “Lichens – a promising source of bioactive secondary metabolites”, *Plant Gen Res*, 2005, 3, 273–287
 31. Bucar F., Schneider I., Ögmundsdottir H., Ingolfssdottir K.: “Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets”, *Phytomedicine*, 2004, 11, 602–606
 32. Buendia B., Bre M.-H., Karsenti E.: “Cytoskeletal control of centrioles movement during the establishment of polarity in Madin-Darby canine kidney cells”, *J Cell Biol*, 1990, 110, 1123–1135.
 33. Bugni T.S., Andjelic C.D., Pole A.R., Rai P., Ireland C.M., Barrows L.R.: “Biologically active components of a Papua New Guinea analgesic and anti-inflammatory lichen preparation”, *Fitoterapia*, 2009, 80, 270–273
 34. Burlando B., Ranzato E., Volante A., Appendino G., Pollastro F., Verotta L.: “Antiproliferative effects on tumor cells and promotion of keratinocytes wound healing by different lichen compounds”, *Planta Med* 2009, 75, 607–613
 35. Bystrek J., Leonowicz A.: „Porosty i ich właściwości lecznicze”, *Folia Soc Scient Lubl*, 1987, 29, 27–37
 36. Bystrek J.: „Podstawy lichenologii”, Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin, 1997
 37. Campanella L., Delfini M., Ercole P., Iacoangeli A., Risuleo G.: “Molecular characterization and action of usnic acid, a dug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription”, *Biochimie*, 2002, 84, 329–

38. Cansaran D., Atakol O., Halici M.G., Aksoy A.: "HPLC analysis of usnic acid in some *Ramalina* species from Anatolia and investigation of their antimicrobial activities ", Pharm Biol, 2007, 45, 77–81
39. Carbonero E.R., Sasaki G.L., Stuelp P.M., Gorin P.A.J., Woranovicz-Barreira S.M., Iacomini M.: "Comparative studies of the polysaccharides isolated from lichenized fungi of the genus *Cladonia*: significance as chemotypes", FEMS Microbiol Lett, 2001, 194, 65–69
40. Carbonero E.R., Montai A.V., Woranovicz-Barreira S.M., Gorin P.A.J., Iacomini M.: "Polysaccharides of lichenized fungi of three *Cladonia* spp: significance as chemotypes", Phytochemistry, 2002, 61, 681–686
41. 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, 667–672
42. Cardinale M., Vieira de Castro Jr J., Müller H., Berg G., Grube M.: "In situ analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscula* reveals predominance of *Alphaproteobacteria*", FEMS Microbiol Ecol, 2008, 66, 63–71
43. Carlos I.Z., Quilles M.B., Carli C.A., Maia D.A., Benzatti F.P., Lopes T.I.B., Gianini A.S., Rosenei L.B., Vilegas W., dos Santos L, Honda N.K.: "Lichen metabolites modulate hydrogen peroxide and nitric oxide in mouse macrophages", Z Naturforsch, 2009, 64 c, 664–672
44. Caviglia A.M., Nicora P., Giordani P., Brunialti G., Modenesi P.: Oxidative stress and usnic acid content in *Parmelia caperata* and *Parmelia soledians*", Il Farmaco, 2001, 56, 379–382
45. Cetin H., Tufan-Cetin O., Turk A.O., Tay T., Candan M., Yanikoglu A., Sumbul H.: "Insecticidal activity of major lichen compounds, (-) and (+)-usnic acid, against the larvae of house mosquito, *Culex pipiens*", Parasitol Res, 2008, 102, 1277–1279
46. Chitturi S., Farrell G.C.: "Hepatotoxic slimming aids and other herbal hepatotoxins", J Gastroen Hepatol, 2008, 23, 366–373
47. Choudhary M.I., Azizuddin, Jalil S., Atta-ur-Rahman: "Bioactive phenolic compounds from a medicinal lichen *Usnea longissima*", Phytochemistry, 2005, 66, 2346–2350
48. Clark S.J., Henderson I.F., Hill D.J., Martin A.P.: "Use of lichen secondary metabolites as antifeedants to protect higher plants from damage caused by slug feeding", Ann Appl Biol, 1999, 134, 101–108
49. Cocchietto M., Skert N., Nimis P.L., Sava G.: "A review on usnic acid, an interesting natural compound", Naturwissenschaften, 2002, 89, 137–146
50. Conover M.A., Mierzwa R., King A., Loebenberg D., Bishop W.R., Puar M., Patel M., Coval S.J., Hershenhorn J., Strobel G.A.: "Usnic acid amide, a phytotoxin and antifungal agent from *Cercosporidium henningsii*", Phytochemistry 1992, 31, 2999–3001
51. Conti M.E., Cecchetti G.: "Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment – a review", Environ Pollut, 2001, 114, 471–492
52. Correche E.R., Enriz R.D., Piovano M., Garbarino J., Gomez Lechon M.J.: "Cytotoxic and apoptotic effects on hepatocytes of secondary metabolites obtained from lichens", ATLA, 2004, 32, 605–615
53. Correche E.R., Carrasco M., Escudero M.E., Velaquez L., de Guzman A.M.S., Giannini F., Enriz R.D., Jauregui E.A., Cenal J.P., Giordano O.S.: "Study of the cytotoxic and antimicrobial activities of usnic acid and derivatives", Fitoterapia, 1998, 69, 493–501
54. Culberson C.F.: "Chemical and Botanical Guide to Lichen Products", 1969, The University of North Carolina Press; Reprint 1979 by Otto Koeltz Science Publishers, Koenigstein, Germany
55. Culberson C.F.: Supplement to "Chemical and Botanical Guide to Lichen Products", The Bryologist, 1970, 73, 177–377.

56. Czarnota P.: „Symbiozy porostowe w świetle interakcji pomiędzy grzybami i fotobiontami”, Kosmos, 2009, 58, 229–248
57. Czacuga B., Grillo M., Czacuga-Semeniuk E.: “Carotenoid content in the thalli of 34 lichen species from Sicily”, Feddes Repertorium, 1999, 110, 561–568
58. da Costa Silva J.A., Bomfim R.R., Santos Estevam C., Antonioli A.R., de Souza Araújo A.A., Thomazzi S.M.: “Pharmacological properties of lichen *Cladonia clathrata*”, Pharm Biol, 2010, 48, 745–752
59. da Silva Santos N.M., Carneiro Nascimento S., Outtes Wanderley M.S., Pontes-Filho N.T., da Silva J.F., Barbosa de Castro C.M.M., Pereira E.C., da Silva N.H., Honda N.K., Santos-Magalhães N.S.: “Nanoencapsulation of usnic acid: an attempt to improve antitumor activity and reduce hepatotoxicity”, Eur J Pharm Biopharm, 2006, 64, 154–160
60. Dailey R.N., Montgomery D.L., Ingram J.T., Siemion R., Vasquez M., Raisbeck M.F.: “Toxicity of the lichen secondary metabolite (+)-usnic acid in domestic sheep”, Vet Pathol, 2008, 45, 19–25
61. Davies J. Wang H. Taylor T., Warabi K., Huang X., Andersen R.J.: “Uncialamycin, a new enediyne antibiotic”, Org Lett, 2005, 7, 5233–5236
62. Dayan F.E., Romagni J.G.: “Lichens as potential source of pesticides”, Pestic Outlook, December 2001, 229–232
63. de Carvalho M.G., Geizi J. A. de Carvalho G.J.A., Braz-Filho R.: “Chemical constituents from *Ouratea floribunda*: complete ¹H and ¹³C NMR assignments of atranorin and its new acetyl derivative”, J Braz Chem Soc, 2000, 11, 143–147,
64. de Carvalho M.G., de Oliveira M.C.C., Werle A.A.: “Chemical constituents from *Luxemburgia nobilis*”, J Braz Chem Soc, 2000, 11, 232–236
65. de Carvalho E.A.B., Andrade P.P., Silva N.H., Pereira E.C., Figueiredo R.C.B.Q.: “Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study”, Micron, 2005, 36, 155–161
66. Deruelle S., Lallemant R., Roux C.: “La Vegetation lichenique de la Basilique de Notre-Dame de l'Epine (Marne)”, Doc Phytosociol N.S., 1979, 4, 218–234
67. Dias D.A., Urban S.: „Phytochemical investigation of the Australian lichens *Ramalina glaucescens* and *Xanthoria parietina*”, Nat Prod Commun, 2009, 4, 959–64
68. Durazo F.A., Lassman C., Han S.H.B., Saab S., Lee N.P., Kawano M., Saggi B., Gordon S., Farmer D.G., Yersiz H., Goldstein L.I., Ghorbail M., Busuttil R.: “Fulminant liver failure due to usnic acid for weight loss”, Am J Gastroent, 2004, doi: 10.1111/j.1572-0241.2004.04165.x
69. Edwards H.G.M., Newton E.M., Wynn-Williams D.D.: “Molecular structural studies of lichen substances II: atranorin, gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rhizocarpic acid, calycin, pulvinic dilactone and usnic acid”, J Mol Struct, 2003, 651–653, 27–37
70. Edwards H.G.M., Newton E.M., Wynn-Williams D.D., Coombes S.R.: “Molecular spectroscopic structure studies of lichen substances I: parietin and emodin”, J Mol Struct, 2003, 648, 49–59
71. Einarsdottir E., Groeneweg J., Björnsdottir G.G., Harðardottir G., Omarsdottir S., Ingólfsdottir K., Ögmundsdottir H.M.: “Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid”, Planta Med, 2010, 76, 1–6
72. Elo H., Matikainen J., Peltari E.: “Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”, Naturwissenschaften, 2007, 94, 465–468
73. Engel K., Schmidt U., Reuter J., Weckesser S., Simon-Haarhaus B., Schempp C.M.: “*Usnea barbata* extract prevents ultraviolet B induced prostaglandin E2 synthesis and COX -2 expression in HaCaT keratinocytes”, J Photoch Photobio B, 2007, 89, 9–14
74. Erba E., Pocar D., Rossi L.M.: “New esters of R(+)-usnic acid”, Il Farmaco, 1998, 53, 718–720

75. Esimone C. O., Adikwu M. U.: "Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Ramalina farinacea*", *Fitoterapia*, 1999, 70, 428-431
76. Esimone C. O., Adikwu M. U.: "Susceptibility of some clinical isolates of *Staphylococcus aureus* to bioactive column fractions from the lichen *Ramalina farinacea*", *Phytother Res*, 2002, 16, 494-496
77. Fahselt D., Krol M., Hüner N., Tønsberg T.: "Pigmentation of *Cladonia* infected by the lichenicolous fungus *Arthrurhaphis aeruginosa*", *The Lichenologist*, doi: 10.1006/lich.1999.0253
78. Falk A., Green T.K., Barboza P.: "Quantitative determination of secondary metabolites in *Cladonia stellaris* and other lichen by micellar elektrokinetic chromatography", *J Chromatogr A*, 2008, 1182, 141-144
79. Fałtynowicz W.: "The lichens, lichenicolous and allied fungi of Poland. An annotated checklist. Krytyczna lista porostów i grzybów naporostowych Polski.", 2003, W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
80. Favreau J.T., Ryu M.L., Braunstein G., Orshansky G., Park S.S., Coody G.L., Love L.A., Fong T.L.: "Severe hepatotoxicity associated with the dietary supplement Lipo-Kinetix", *Ann Intern Med*. 2002, 136, 590-595
81. Fernandez E., Quilhot W., Gonzalez I., Hidalgo M.E., Molina X., Meneses I.: "Lichen metabolites as UVB filters", *Cosmet Toiletries*, 1996, 111, 69-74
82. Fernandez E., Reyes A., Hidalgo M.E., Quilhot W.: "Photoprotector capacity of lichen metabolites assessed through the inhibition of the 8-methoxypsoralen photobinding to protein", *J Photoch Photobio B*, 1998, 42, 195-201
83. Fontaniella B., Legaz M.E., Pereira E.C., Sebastian B., Vicente C.: "Requirements to produce fumarprotocetraric acid using alginate-immobilized cells of *Cladonia verticillaris*", *Biotechnol Lett*, 2000, 22, 813-817
84. Foti R.S., Dickmann L.J., Davis L.J., Greene R.J., Hill J.J., Howard M.L., Pearson J.T., Rock D.A., Tay J.C., Wahlstrom J.L., Slatter J.G.: "Metabolism and related human risk factors for hepatic damage by usnic acid containing nutritional supplements", *Xenobiotica*, 2008, 38, 264-280
85. Fournet A., Ferreira M.E., Rojas de Arias A., Torres de Ortiz S., Inchausti A., Yaluff G., Quilhot W., Fernandez E., Hidalgo M.E.: "Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis", *Comp Biochem Physiol*, 1997, 116C, 51-54
86. Francolini I., Norris P., Piozzi A., Donelli G., Stoodley P.: "Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces", *Antimicrob Agents Ch*, 2004, Nov, 4360-4365
87. Frazier T.H., Krueger K.J.: "Hepatotoxic herbs: will injury mechanism guide treatment strategies?", *Curr Gastroent Rep* 2009, 11, 317-324
88. Freysdóttir J., Omarsdóttir S., Ingólfssdóttir K., Víkingsson A., Ólafsdóttir E.S.: "In vitro and in vivo immunomodulating effects of traditionally prepared extract and purified compounds from *Cetraria islandica*", *Int Immunopharm*, 2008, 8, 423-430
89. Furin G.G., Luzina O.A., Sokuev R.I., Polovinka M.P., Salakhutdinov N.F., Tolstikov G.A.: "Chemical modification of usnic acid. 1. Reaction of (+)-usnic acid with perfluoroolefins", *Russ Chem Bull, International Edition*, 2007, 56, 1244-1248
90. Garcia Rowe J., Garcia Gimenez M.D., Saenz Rodriguez M.T.: "Some lichen products have antimicrobial activity", *Z Naturforsch*, 1999, 54c, 605-609
91. Gertig H.: „Oznaczanie zawartości kwasu usninowego w porostach”, *Acta Pol Pharm*, 1960, 17, 35-43
92. Gertig H., Banasiewicz Z.: „Rozpowszechnienie kwasu usninowego w niektórych porostach krajowych”, *Acta Pol Pharm*, 1961, 18, 67-71
93. Gertig H.: „Wyodrębnianie kwasu D-protolichestrynowego oraz fumaroprotocetrarowego z plech *Cetraria islandica* pochodzenia krajowego”, *Dissert Pharm*, 1963, 15,

94. Ghione M., Parrello D., Grasso L.: "Usnic acid revisited, its activity on oral flora", *Chemioterapia* 1988, 7, 302–305.
95. Glazunov V.P., Tchizhova A.Y., Shestak O.P., Sopelnyak G.I., Anufriev V.P.: "Chemistry of naphthazarin derivatives. 8. Determination of structures of substituted 2-hydroxy-6(7)-methoxynaphthazarins and 7(8)-hydroxypyranonaphthazarins by IR spectroscopy", *Russ Chem Bull, International Edition*, 2001, 50, 95-100
96. Gordien A.Y., Gray A.I., Ingleby K., Franzblau S.G., Seidel V.: "Activity of Scottish plant, lichen and fungal endophyte extracts against *Mycobacterium aurum* and *M. tuberculosis*", *Phytother Res*, 2010, 24, 692–698
97. Grzycka K.: „Badanie aktywności biologicznej niektórych kładników plechy *Ramalina fraxinea*”, *Acta Pol Pharm*, 1979,, 36, 481-485
98. Gudjonsdottir G.A., Ingolfssdottir K.: "Quantitative determination of protolichetrinic and fumaroportocetarric acid in *Cetraria islandica* by HPLC", *J Chromatogr A*, 1997, 757, 303-306
99. Halama P., Van Haluwin C.: "Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids", *Bio Control*, 2004, 49, 95–107
100. Han D., Matsumaru K., Rettori D., Kaplowitz N.: "Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress", *Biochem Pharmacol*, 2004 67, 439–451
101. Hanuš L.O., Temina M., Dembitsky V.M.: "Antibacterial and antifungal activities of some phenolic metabolites isolated from lichenized *Ascomycetes Ramalina lacera*", *Nat Prod Comm*, 2008, 3, 233-236
102. Harðardóttir G, Ögmundsdóttir HM, Ingólfssdóttir K.: "Usnic acid: antiproliferative, apoptotic and morphological effects on human malignant cell lines", *Iceland Med J*, 2006, 93, 105
103. Hauck M., Jürgens S.R.: "Usnic acid controls the acidity tolerance of lichens", *Environ Pollut*, 2008, 156, 115-122
104. Hauck M., Willenbruch K., Leuschner C.: "Lichen Substances Prevent Lichens from Nutrient Deficiency", *J Chem Ecol*, 2009, 35, 71–73
105. Hawksworth D.L.: "Hallucinogenic and toxic lichens", *Int Lichen Newslett*, 2004, 36, 33-35
106. Hawksworth D. L.: "The variety of fungal-algal symbioses, their evolutionary significance, and the nature of lichens", *Bot J Linn Soc*, 1988, 96, 3–20
107. Hawranik D.J., Anderson K.S., Simmonds R., Sorensen J.L.: "The chemoenzymatic synthesis of usnic acid", *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19, 2383–2385
108. Hesbacher S., Baur B., Baur A., Proksch P.: "Sequestration of lichen compounds by three species of terrestrial snails", *J Chem Ecol*, 1995, 21, 233-246
109. Hesbacher S., Fröberg L., Baur A., Baur B., Proksch P.: "Chemical variation within and between individuals of the lichenized ascomycete *Tephromela atra*", *Biochem Syst Ecol*, 1996, 24, 603-609
110. Hidalgo M.E., E. Fernandez E., Quilhot W.: "Photohemolytic activity of lichen metabolites", *J Photoch Photobio B*, 1993, 21, 37-40
111. Hiserodt R.D., Swijter D.F.H., Mussinan C.J.: "Identification of atranorin and related potential allergens in oakmoss absolute by HPLC-tandem mass spectrometry using negative ion atmospheric pressure chemical ionization", *J Chromatogr A*, 2000, 888, 103–111
111. Honda N.K., Pavan F.R., Coelho R.G., deAndrade Leite S.R., Micheletti A.C., Lopes T.I.B., Misutsu M.Y., Beatriz A., Brum R.L., Leite C.Q.F.: "Antimycobacterial activity of lichen substances", *Phytomedicine*, 2010, 17, 328–332
113. Hsu L.M., Huang Y.S., Chang F.Y., Lee S.D.: "Fat burner herb, usnic acid, induced acute hepatitis in a family", *J Gastroenterol Hepatol.*, 2005, 20, 1138-9

114. Huneck S.: "Die wasserabweisende Eigenschaft von Flechtenstoffen", *Bibl Lichenol*, 2002, 86, 9–12.
115. Huneck S., Feige G.B., Schmidt J.: "Chemie von *Cladonia furcata* and *Cladonia rangiformis*", *Herzogia*, 2004, 17, 51-58
116. Huneck S., Tibell L.: "Occurrence and chemistry of isousnic acid from the lichen *Bunodophoron ramuliferum*", *J Hattori Bot Lab*, 2005, 98, 299-305
117. Huneck S.: "The significance of lichens and their metabolites", *Naturwissenschaften*, 1999, 86, 559–570
118. Huovinen K., Hiltunen R., von Schantz M.: "A standardized HPLC method for analyses of lichen compounds from the genus *Cladonia* ", *Planta Med*, 1982, 45, 152
119. Huovinen K., Lampero M.: "Usnic acid as a mitotic inhibitor in the *Allium* test", *Planta Med*, 1989, 55, 98
120. Ingólfsdóttir K., Kook Lee S., Bhat K.P., Lee K., Chai H.B., Kristinsson H., Song L.L., Gills J., Gudmundsdóttir J.T., Mata-Greenwood T., Jang M.S., Pezzuto J.M.: "Evaluation of selected lichens from Iceland for cancer chemopreventive and cytotoxic activity", *Pharm Biol*, 2000, 38, 313-317
121. Ingólfsdóttir K.: "Molecules of interest: usnic acid", *Phytochemistry*, 2002, 61, 729-736
122. Ingólfsdóttir K., Bloomfield S.F., Hylands P.J.: "In vitro evaluation of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potential preservatives", *Antimicrob Agents Chemother*, 1985, 28, 289–292.
123. Ingólfsdóttir K., Chung G.A.C., Skulason V.G., Gissurarson S.R., Vilhelmsdóttir M.: "Antimycobacterial activity of lichen substances in vitro", *Eur J Pharm Sci*, 1998, 6, 141-144
124. Ji X., Khan I.A.: "Quantitative determination of usnic acid in *Usnea* lichen and its products by reversed-phase liquid chromatography with photodiode array detector", *J AOAC Int*, 2005, 88, 1265-1268
125. Jin J., Li C., He L.: "Down-regulatory effect of usnic acid on nuclear factor-kB-dependent tumor necrosis factor- α and inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7", *Phytother Res*, 2008, 22, 1605–1609
126. Joseph A., Lee T., Moland C.L., Branham W.S., Fuscoe J.C., Leakey J.E.A., Allaben W.T., Lewis S.M., Ali A.A., Desai V.G.: "Effect of (+)-usnic acid on mitochondrial functions as measured by mitochondria-specific oligonucleotide microarray in liver of B6C3F1 mice", *Mitochondrion*, 2009, 9, 149–158
127. Daniel Joulain and Raphaël Tabacchi: "Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part2: treemoss", *Flavour Fragr J*, 2009, 24, 105–116
128. Karakus B., Odabasoglu F., Cakir A., Halici Z., Bayir Y., Halici M., Aslan A., Suleyman H.: "The effects of methanol extracts of *Lobaria pulmonaria* a lichen species on indomethacin-induced gastric mucosal damage, oxidative stress and neutrophil infiltration", *Phytother Res*, 2009, 23, 635–639
129. 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, 173–178
130. Kirmizigul S., Koz O., Boke N.: "Constituents of apolar extracts including essential fatty acids of some Turkish lichens", *Chem Nat Comp*, 2007, 43, 462-464
131. Kohlhardt-Floehr C., Boehm F., Troppens S., Lademann J., Truscott T.G.: "Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation – Studies on human cells", *J Photoch Photobio B*, 2010, 101, 97-102
132. Kohlmünzer S.: "Farmakognozja", Wydanie V, PZWL, Warszawa, 1998
133. König G.M., Wright A.D.: " ^1H and ^{13}C -NMR and biological activity investigations of four lichen-derived compounds", *Phytochem Anal*, 1999, 10, 279–284

134. Koparal A. T., Ayaz Tüylü B., Türk H.: "In vitro cytotoxic activities of (+)usnic and (-) usnic acid on V79, A549 and human lymphocyte cells and their non-genotoxicity on human lymphocytes", *Nat Prod Res*, 2006, 20, 1300–1307
135. Korohoda W.: "Migracja komórek nabłonkowych", *Kosmos*, 1992, 41, 39-50
136. Kreft S., Štrukelj B.: "Reversed-polarity capillary zone electrophoretic analysis of usnic acid", *Electrophoresis*, 2001, 22, 2755–2757
137. Krishna D.R., Venkataramana D.: "Pharmacokinetics of d(+)-usnic acid in rabbits after intravenous and oral administration", *Drug Metab Dispos*, 1992, 20, 909-911
138. Kristmundsdottir T., Jonsdottir E., Ogmundsdottir H.M., Ingolfssdottir K.: "Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines", *Eur J Pharm Sci*, 2005, 24, 539–543
139. Krivoshchekova O.E., Mishchenko N.P., Stepanenko L.S., Maksimov O.B.: "Aromatic metabolites of lichens of the family *Parmeliaceae*. I. Depsidones", *Khim Priir Soed*, 1983, 1, 13-19
140. Kumar S.K.C., Müller K.: "Lichen metabolites 2: Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic and diffractic acid on human keratinocytes growth", *J Nat Prod*, 1999, 62, 821-823.
141. Kumar S.K.C., Müller K.: "Lichen Metabolites. 1. Inhibitory Action Against Leukotriene B4 Biosynthesis by a Non-Redox Mechanism", *J Nat Prod*, 1999, 62, 817-820
142. Kupchan S.M., Kopperman H.L.: "Usnic acid: tumour inhibition isolated from lichens", *Experientia*, 1975, 31, 625
143. Latkowska E., Lechowski Z., Bialczyk J., Pilarski J.: "Photosynthesis and Water Relations in Tomato Plants Cultivated Long-Term in Media Containing (+)-Usnic Acid", *J Chem Ecol*, 2006, 32, 2053–2066
144. Lauterwein M., Oethinger M., Belsner K., Peters T., Marre R.: "In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)- and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms", *Antimicrob Agents Chem*, 1995, 2541–2543
145. Legaz M.E., Pedrosa M.M., Martinez P., Planelles V.: "The effects of lichen phenols on the reaction modes of arginases produced in the light by lichen *Evernia prunastri*", *Endocyt Cell Res*, 1990, 7, 85-96
146. Lin X., Cai Y.J., Li Z.X., Liu Z.L., Yin S.F., Zhao J.C.: "*Cladonia furcata* polysaccharide induced apoptosis in human leukemia K562 cells", *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22, 716-720
147. Lin X., Cai Y.J., Li Z.X., Chen Q., Liu Z.L., Wang R.: "Structure determination, apoptosis induction, and telomerase inhibition of CFP-2, a novel lichenin from *Cladonia furcata*", *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1622, 99– 108
148. Lisci M., Monte M., Pacini E.: 'Lichens and higher plants on stone: a review", *Int Biodeter Biodegr*, 2003, 51, 1–17
149. Lisickov K., Najdenova V., Zoltan D.: "Application of supercritical CO2 extraction for separation on natural antibiotics from lichens", *Herba Pol*, 2002, 48, 32-39
150. Lohezic Le Devehat F., Tomasi S., Elix J.A., 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, 1218-1220
151. Luzina O.A., Polovinka M.P., Salakhutdinov M.F., Tolstikov G.A.: "Schmidt reaction of usnic acid", *Chem Nat Comp*, 2009, 45, 251-252
152. Mac Kenzie S.: "Ultraviolet Absorption Spectra of Derivatives of Usnic Acid", *J Am Chem Soc*, 1952, 74, 4067-4069
153. Maia M.B.S., Silva N.H., Silva E.F., Catanho M.T.J., Schuler A.R.P., Pereira E.C.: "Antinociceptive activity of crude extracts and atranorin obtained from the lichen *Cladonia dendroides*", *Acta Farm Bonaerense*, 2002, 21, 259-64
154. Manojlovic N.T., Vasiljevic P., Bogdanovic-Dusanovic G., Manojlovic I.: "Antioxidant activity of some lichen growing in Serbia", *Planta Med*, 2008, 74, 996-997

155. Marcano V., Rodriguez-Alcocer V., Mendez A.M.: "Occurrence of usnic acid in *Usnea laevis* from the Venezuelan Andes", J Ethnopharm, 1999, 66, 343–346
156. Marshak A., Kuschner M.: "The action of streptomycin and usnic acid on the development of tuberculosis in guinea pigs", Public Health Rep, 1950, 65, 131–144
157. Martin W.: "Chemical aids to species recognition in the lichen genus *Cladonia*", Tuatara, 1971, 19, 6–11
158. Matławska I.: "Farmakognozja", Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2008
159. Matwiejuk A.: "Porosty i ich właściwości lecznicze", Kosmos, 2008, 57, 85–91
160. Mayer M., O'Neill M.A., Murray K.E., Santos-Magalhaes N.S., Carneiro-Leao A.M.A., Thompson A.M., Appleyard A.C.M.: "Usnic acid: a non-genotoxic compound with anti-cancer properties", Anti-Cancer Drugs, 2005, 16, 805–809
161. Melo M.G.D., Araújo A.A.S., Rocha C.P.L., Almeida E.M.S.A., Siqueira R.S., Bonjardim L.R., Quintans-Júnior L.J.: "Purification, physicochemical properties, thermal analysis and antinociceptive effect of atranorin extracted from *Cladonia kalbii*", Biol Pharm Bull, 2008, 31, 1977–1980
162. 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, 316–318
163. Millot M., Tomasi S., Sinbandhit S., Boustie J.: "Phytochemical investigation of *Tephromela atra*: NMR studies of collatolic acid derivatives", Phytochem Lett, 2008, 1, 139–143
164. Millot M., Tomasi S., Studzinska E., Rouaud I., Boustie J.: "Cytotoxic constituents of the lichen *Diploicia canescens*", J Nat Prod, 2009, 72, 2177–2180
165. Mirek Z., Zarzycki K., Wojewoda W., Szelać Z.: "Red list of plants and fungi in Poland", W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków 2006
166. Mitchell J.C., Armitage J.S.: "Dermatitis venenata from lichens; biology of lichens related to criteria for diagnosis of occupational dermatitis and to industrial exposure risk", Arch Environ Health, 1965, 11, 701–709
167. Modenesi P.: "Skull lichens: a curious chapter in the history of phytotherapy", Fitoterapia, 2009, 80, 145–148
168. Müller K.: "Pharmaceutically relevant metabolites from lichens", Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56, 9–16
169. Mustafa M.R., Mohamad R., Din L., Wahid S.: "Smooth muscles relaxant activities of compounds isolated from Malaysian medicinal plants on rat aorta and Guinea-pig ileum", Phytother Res, 1995, 9, 555–558
170. Mutai C., Abatis D., Vagias C., Moreau D., Roussakis C., Roussis V.: "Lupane triterpenoids from *Acacia mellifera* with cytotoxic activity", Molecules, 2007, 12, 1035–1044
171. Najdenova V., Lisickov K., Zoltán D.: "Antimicrobial activity and stability of usnic acid and its derivatives in some cosmetic products", Olaj, Szappan, Kozmetika, 2001, 50, 158–160
172. Nasser J.A., Yaacob W.A., Din L.B., Yamin B.M., Latip J.: "Isolation of atranorin, bergenin and goniothalamin from *Hopea sangal*", J Eng Appl Sci, 2009, 1, 92–95
173. Natić M., Tešić Z., Anđelković K., Brćeski I., Radulović S., Manić S., Sladić D.: "Synthesis and biological activity of Pd(II) and Cu(II) complexes with acylhydrazones of usnic acid", Syn React Inorg Met, 2004, 34, 101–113
174. Neamati N., Hong H., Mazumder A., Wang S., Sunder S., Nicklaus M.C., Milne G.W.A., Proksa B., Pommier Y.: "Deposides and depositions as inhibitors of HIV-1 integrase: discovery of novel inhibitors through 3D database searching", J Med Chem, 1997, 40, 942–951
175. Neff G.W., Reddy K.R., Durazo F.A., Meyer D., Marrero R., Kaplowitz N.: "Severe he-

- patotoxicity associated with the use of weight loss diet supplements containing ma huang or usnic acid”, J Hepatol, 2004, 41, 1062-1064
176. Nybakken L., Julkunen-Tiitto R.: “UV-B induces usnic acid in reindeer lichens”, The Lichenologist, 2006, 38, 477-485
 177. Nybakken N., Helmersen A.M., Gauslaa Y., Selås V.: “Lichen compounds restrain lichen feeding by bank voles (*Myodes glareolus*)”, J Chem Ecol, 2010, 36, 298–304
 178. O’Neill M.A., Mayer M., Murray K.E., Rolim-Santos H.M.L., Santos-Magalhães N.S., Thompson A.M., Appleyard V.C.L.: “Does usnic acid affects microtubules in human cancer cells?”, Braz J Biol, 2010, 70, doi: 10.1590/S1519-69842010005000013
 179. Odabasoglu F., Cakir A., Suleymanc H., Aslan A., Bayir Y., Halici M., Kazaz C.: “Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats”, J Ethnopharm, 2006, 103, 59–65
 180. Okuyama E., Umeyama K., Yamazaki M., Kinoshita Y., Yamamoto Y.: “Usnic acid and diffractric acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*”, Planta Med, 1995, 61, 113-115
 181. Orange A., James P.W., White F.J.: „Microchemical methods for the identification of lichens”, British Lichen Society, 2001
 182. Osborn M., Bom T., Koitsh H.J., Weber K.: “Stereo immunofluorescence microscopy: I. three dimensional arrangement of microfilaments, microtubules and tonofilaments”, Cell, 1978, 14, 477-488
 183. Oświecimska M., Sendra J., Janeczko Z.: “Antimitotic activity of some *Cladonia* species native in Poland. Part I. Preliminary screening investigations”, Herba Pol, 1979, 25, 317-322
 184. Oświecimska M., Janeczko Z., Sendra J., Hładoń B.: “Antimitotic activity of some *Cladonia* species native in Poland. Part II. Search for preparations showing the stable biological activity and cytostatic screening of dried extract”, Herba Pol, 1983, 29, 271-279
 185. Oświecimska M., Janeczko Z., Sendra J.: “Antimitotic activity of some *Cladonia* species native in Poland. Part IV. The biological activity of usnic acid isolated from *Cladonia sylvatica* L. Hoffm.”, Herba Pol, 1987, 33, 212-216
 186. Osyczka P., Olech M.: „Gatunki rodzaju *Cladonia* Hill ex Browne (grzyby zlichenizowane) w ekosystemie lądowym Wyspy Króla Jerzego (Antarktyka)”, XXX Międzynarodowe Sympozjum Polarne Gdynia, 23–25 września 2004 Streszczenia
 187. Öztürk S., Güvenc S., Arikan N., Yilmaz Ö.: „Effect of usnic acid on mitotic index in root tips of *Allium cepa*”, Lagasalia, 1999, 21, 47-52
 188. Periera E.C., Nascimento S.C., Lima R.C., Silva N.H., Oliveira A.F., Bandeira E., Boitard M., Beriel H., Vicente C., Legaz M.E.: “Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity”, Tokai J Exp Clin Med, 1994, 19, 47-52.
 189. Pereira E.C., Pereyra T., Matos S.C., DaSilva N.H., Andrade L., Vicente C.: “Bioproduction of usnic acid from acetate by kaolinite immobilized cells of *Cladonia substellata* Vain.”, Acta Soc Bot Pol, 1995, 64, 171–174
 190. Perry N.B., Benn M.H., Brennan N.J., Burgess E.J., Ellis G., Galloway D.J., Lorimer S.D., Tangney R.S.: “Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zeland lichens”, The Lichenologist, 1999, 31, 627–636
 191. Piovano M., Chamy M.C., Garbarino J.A., Quilhot W.: “Secondary metabolites in the genus *Sticta* (lichens)”, Biochem Syst Ecol, 2000, 28, 589-590
 192. Piovano M., Garbarino J.A., Giannini F.A., Correche E.R., Feresin G., Tapia A., Zaccchino S., Enriz R.D.: “Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens”, Bol Soc Chil Quim, 2002, 47, 235-240
 193. Podterob A.P.: “Chemical composition of lichens and their medicinal applications”, Pharm Chem J, 2008, 42, 582-588
 194. Polónia M.A.J., Carneiro A.F., Pinto M.M.M.: “Quantification of usnic acid in *Usnea*

- florida* by densitometric high performance thin layer chromatography”, J Liq Chromatogr R T, 1991, 14, 1447 – 1452
195. Pöykkö H., Hyvärinen M., Bačkor M.: “Removal of lichen secondary metabolites affects food choice and survival of lichenivorous moth larvae”, Ecology, 86, 2005, 2623–2632
 196. Pramyothin P., Janthasoot W., Pongnimitprasert N., Phrukudom S., Ruangrunsi N.: “Hepatotoxic effect of (+)-usnic acid from *Usnea siamensis* in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria”, J Ethnopharm, 2004, 90, 381-7.
 197. Ramaut J.L., Corvisier M.: “Effets inhibiteurs des extraits de *Cladonia impexa*, *Cladonia gracilis* et *Cornicularia muricata* sur la germination des graines de *Pinus sylvestris*”, Oecol Plant, 1975, 10, 295-299
 198. Rancana F., Rosana S., Boehmb K., Fernandez E., Hidalgo M.E., Quihot W., Rubio C., Boehmb F., Piazena H., Oltmanns u.: “Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens”, J Photoch Photobio B, 2002, 68, 133–139
 199. Ranković B., Mišić M., Sukdolak S.: “Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*”, Br J Biomed Sci, 2007, 64, 143-148
 200. Ranković B., Mišić M.: “The antimicrobial activity of the lichen substances of the lichens *Cladonia furcata*, *Ochrolechia androgyna*, *Parmelia caperata* and *Parmelia conspersa*”, Biotechnol Biotec Eq, 2008, 22, 1013-1016
 201. Rashid M.A., Majida M.A., Quader M.A.: “Complete NMR assignments of (+)-usnic acid”, Fitoterapia, 1999, 70, 113-115
 202. Ribeiro-Costa R.M., Alves A.J., Santos N.P., Nascimento S.C., Goncalves E.C.P., Silva N.H., Honda N.K., Santos-Magalhaes N.S.: “In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres”, J Microencapsul, 2004, 21, 371–384
 203. Roach J.A.G., Musser S.M., Morehouse K., Woo J.Y.J.: “Determination of usnic acid in lichen toxic to elk by liquid chromatography with ultraviolet and tandem mass spectrometry detection”, J Agric Food Chem, 2006, 54, 2484-2490
 204. Rocha L.G., Almeida J.R.G.S., Macedo R.O., Barbosa-Filho J.M.: “A review of natural products with anti-leishmanial activity”, Phytomedicine, 2005, 12, 514–535
 205. Romagni J.G., Meazza G., Nanayakkara N.P., Dayan F.E.: “The phytotoxic lichen metabolite, usnic acid, is a potent inhibitor of plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase”, FEBS Lett, 2000, 480, 301-5
 206. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 lipca 2004 r. w sprawie gatunków dziko występujących grzybów objętych ochroną (Dz. U. z dnia 28 lipca 2004 r.)
 207. Russo A., Piovano M., Lombardo L., Vanella L., Cardile V., Garbarino J.: “Pannarin inhibits cell growth and induces cell death in human prostate carcinoma Du-145 cells”, Anti-Cancer Drugs 2006, 17, 1163–1169
 208. Saenz M.T., Garcia M.D., Rowe J.G.: “Antimicrobial activity and phytochemical studies of some lichens from south of Spain”, Fitoterapia, 2006, 77, 156–159
 209. Safak B., Ciftci I.H., Ozdemir M., Kiyildi N., Cetinkay Z., Aktepe O.C., Altindis M., Asik G.: “In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of usnic acid”, Phytother Res, 2009, 23, 955–957
 210. Sahib K., Kularatne N.S., Kumar S., Karunaratne V.: “Effect of (+)-usnic acid on the shot-hole borer (*Xyleborus fornicatus*) of tea”, J Natn Sci Foundation Sri Lanka, 2008, 36, 335-336
 211. Sanchez W., Maple J.T., Burgart L.J., Kamath P.S.: “Severe hepatotoxicity associated with use of a dietary supplement containing usnic acid”, Mayo Clin Proc, 2006, 81, 541-544
 212. Santos L.C., Honda N.K., Carlos I.Z., Vilegas W.: “Intermediate reactive oxygen and nitrogen from macrophages induced by Brazilian lichens”, Fitoterapia, 2004, 75, 473–479

213. Sassa T., Igarashi M.: "Structures of (-)-mycousnine, (+)-isomycousnine and (+)-oxymycousnine, new usnic acid-derivatives from phytopathogenic *Mycosphaerella nawae*", *Agr Biol Chem*, 1990, 54, 2231–2237
214. Sassaki G.L., Cruz L.M., Gorin P.A.J., Iacomini M.: "Fatty acid composition of lipids present in selected lichenized fungi: a chemotyping study", *Lipids*, 2001, 36, 167–174
215. Schmidt R.J.: "Allergic contact dermatitis to liverworts, lichen and mosses", *Semin Dermatol*, 1996, 15, 95–102
216. Scirpa P., Scambia G., Masciullo V., Battaglia F., Foti E., Lopez R., Villa P., Malecore M., Mancuso S.: "A zinc sulfate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesions by human papillomavirus", *Minerva Ginecol*, 1999, 51, 255–260
217. Sheu M., Simpson E.L., Law S.V., Storrs F.J.: "Allergic contact dermatitis from a natural deodorant: a report of 4 cases associated with lichen acid mix allergy", *J Am Acad Dermatol*, 2006, 55, 332–7
218. Shibata S.: "Some recent studies on the metabolites of fungi and lichens", *Pure Appl Chem*, 1973, 33, 109–28
219. Solhaug K.A., Gauslaa Y., Nybakken L., Bilger W.: "UV-induction of sun-screening pigments in lichens", *New Phytol*, 2003, 158, 91–100
220. Solhaug K.A., Lind M., Nybakken L., Gauslaa Y.: "Possible functional roles of cortical depsides and medullary depsidones in the foliose lichen *Hypogymnia physodes*", *Flora*, 2009, 204, 40–48
221. Spier L., Aptroot A.: "*Cladonia rei* is a chemotype and synonym of *Cladonia subulata*", *The Lichenologist*, 2007, 39, 57–60
222. Stark J.B., Walter E.D., Owens H.S.: "Method of isolation of usnic acid from *Ramalina reticulata*", *J Am Chem Soc*, 1950, 72, 1819–1820
223. Stinchi C., Guerrini V., Ghetti E., Tosti A.: "Contact dermatitis from lichens", *Contact Dermatitis*, 1997, 36, 310
224. Stocker-Wörgötter E., Elix J.A.: "Secondary chemistry of cultured mycobionts: formation of a complete chemosyndrome by the lichen fungus of *Lobaria spathulata*", *The Lichenologist*, 2002, 34, 351–359
225. Studzińska E., Witkowska-Banaszczak E., Bylka W.: „Związki biologicznie aktywne porostów”, *Herba Pol*, 2008, 54, 79–88
226. Su B.N., Cuendet M., Nikolic D., Kristinsson H., Ingolfssdottir K., van Breemen R.B., Fong H.H.S., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D.: „NMR study of fumarprotocetraric acid, a complex lichen depsidone derivative from *Cladonia furcata*", *Magn Reson Chem*, 2003, 41, 391–394
227. Süleyman H., Yildirim D., Aslan A., Göçer F., Gepdiremen A., Güvenalp Z.: "An investigation of the antiinflammatory effects of an extract from *Cladonia rangiformis*", *Biol Pharm Bull*, 2002, 25, 10–3.
228. Sundset M.A., Barboza P.S., Green T.K., Folkow L.P., Blix A.S., Mathiesen S.D.: "Microbial degradation of usnic acid in the reindeer rumen", *Naturwissenschaften*, 2010, 97, 273–278
229. Szwejkowska A., Szwejkowski J. "Botanika. Systematyka", tom II, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1993
230. Takai M., Uehara Y., Beisler J.A.: "Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents", *J Med Chem*, 1979, 22, 1380–1384
231. Tay T., Türk A.Ö., Yilmaz M., Türk H., Kivanc M.: "Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen *Ramalina farinacea* and its (+)-usniac acid, norstictic acid and protocetraric acid constituents", *Z Naturforsch*, 2004, 59c, 384–388
232. Tazetdinova A.A., Luzina O.A., Polovinka M.P., Salakhutdinov N.F., Tolstikov G.A.: "Amino-derivatives of usnic acid", *Chem Nat Comp*, 2009, 45, 800–804
233. Tobolewski Z.: "Porosty. Klucz do oznaczania pospolitszych gatunków krajowych",

- Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Wyd. II, Warszawa 1972
234. Toledo Marante F.J., Garcia Castellano A., Rosas F.E., 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, 2049-2071
 235. Tomasi S., Picard S., Laine C., Babonneau V., Goujeon A., Boustie J., Uriac P.: "Solid-phase synthesis of polyfunctionalized natural products: application to usnic acid, a bioactive lichen compound", *J Comb Chem*, 2006, 8, 11-14
 236. Türk H., Yilmaz M., Tay T., Türk A.Ö., Kivanc M.: "Antimicrobial activity of extracts of chemical races of the lichen *Pseudevernia furfuracea* and their physodic acid, chloroatranorin, atranorin and olivetoric acid constituents", *Z Naturforsch*, 2006, 61c, 499-507
 237. Verotta L., Appendino G., Bombardelli E., Brun R.: "In vitro antimalarial activity of hyperforin, a prenylated acylphloroglucinol. A structure-activity study", *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17, 1544-1548
 238. Vijayakumar C.S., Viswanathan S., Kannappa Reddy M., Parvathavarthini S., Kundu A.B., Sukumar E.: "Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid", *Fitoterapia*, 2000, 71, 564-566
 239. Wang X., Yu W., Lou H.: "Antifungal constituents from the Chinese moss *Homalia trichomanoides*", *Chem Biodiv*, 2005, 2, 139-145
 240. Woranovicz-Barreira S.M., Gorin P.A.J., Sassaki G.L., Tischer C.A., Ahtic T., Iacomini M.: "Chemotyping glucans from lichens of the genus *Cladonia*", *Phytochemistry*, 1999, 52, 1069-1074
 241. Wójciak H.: "Porosty, maszaki, paprotniki", Multico Oficyna Wydawnicza, Wyd. II, Warszawa 2007
 242. Yamazaki M., Matsuo M., Shibata S.: "Biosynthesis of lichen depsides, lecanoric acid and atranorin", *Chem Pharm Bull*, 1965, 13, 1015-7
 243. Yilmaz M., Türk A.Ö., Tay T., Kivanc M.: "The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (-)-usnic acid, atranorin and fumarprotocetraric acid constituents", *Z Naturforsch*, 2004, 59c, 249-254
 244. Zain M.E.: "Effect of olive oil on secondary metabolite and fatty acid profiles of *Penicillium expansum*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. ochraceus*", *Australian J Basic Appl Sci*, 2009, 3, 4274-4280

Spis tabel

Tabela 1.	Odczynniki wykorzystywane do reakcji mikrochemicznych [Orange 2001, Martin 1971]	str. 10
Tabela 2.	Podział metabolitów porostowych ze względu na ich biogenezę	str. 17
Tabela 3.	Gatunki chrobotków zagrożone na terenie Polski [wg. Mirek 2006]	str. 21
Tabela 4.	Rozpowszechnienie kwasu usninowego w porostach	str. 39
Tabela 5.	Warunki ekstrakcji, izolacji i identyfikacji kwasu usninowego	str. 42
Tabela 6.	Zestawienie faz ruchomych wykorzystywanych do izolacji kwasu usninowego	str. 45
Tabela 7.	Zestawienie metod i warunków przeprowadzania analizy ilościowej kwasu usninowego	str. 46
Tabela 8.	Zawartość kwasu usninowego w różnych gatunkach porostów	str. 48
Tabela 9.	Aktywność przeciwbakteryjna in vitro kwasu usninowego	str. 53
Tabela 10.	Aktywność przeciwgrzybicza in vitro kwasu usninowego	str. 55
Tabela 11.	Aktywność cytotoksyczna kwasu usninowego	str. 65
Tabela 12.	Rozpowszechnienie atranoryny w roślinach	str. 79
Tabela 13.	Zestawienie warunków ekstrakcji, izolacji i identyfikacji atranoryny	str. 82
Tabela 14.	Zestawienie faz ruchomych, stosowanych podczas izolacji atranoryny	str. 84
Tabela 15.	Zestawienie metod i warunków przeprowadzania analizy ilościowej atranoryny	str. 85
Tabela 16.	Zestawienie zawartości atranoryny w różnych gatunkach	str. 86
Tabela 17.	Aktywność przeciwbakteryjna atranoryny	str. 89
Tabela 18.	Aktywność przeciwgrzybicza atranoryny	str. 89
Tabela 19.	Aktywność cytotoksyczna atranoryny	str. 94
Tabela 20.	Rozpowszechnienie kwasu fumaroprotocetrarowego w porostach	str. 96
Tabela 21.	Zestawienie warunków ekstrakcji, izolacji i identyfikacji kwasu fumaroprotocetrarowego	str. 98
Tabela 22.	Zestawienie faz ruchomych stosowanych podczas izolacji i identyfikacji kwasu fumaroprotocetrarowego	str. 99
Tabela 23.	Zestawienie warunków analizy ilościowej kwasu fumaroprotocetrarowego	str. 100
Tabela 24.	Zestawienie zawartości kwasu fumaroprotocetrarowego w różnych gatunkach	str. 100
Tabela 25.	Aktywność przeciwbakteryjna kwasu fumaroprotocetrarowego	str. 103
Tabela 26.	Aktywność przeciwgrzybicza kwasu fumaroprotocetrarowego	str. 104
Tabela 27.	Aktywność cytotoksyczna kwasu fumaroprotocetrarowego	str. 106
Tabela 28.	Zawartość procentowa kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego w surowcu <i>Cladonia arbuscula</i> o różnym stopniu rozdrobnienia	str. 120
Tabela 29.	Zawartość procentowa kwasu usninowego, atranoryny i kwasu	str. 121

	fumaroprotocetrarowego w surowcu <i>Cladonia gracilis</i> ekstrahowanym różnymi metodami	
Tabela 30.	Zawartość kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego w wyciągach heksanowych, chloroformowych, acetonowych i metanolowych ze wszystkich badanych gatunków.	str. 122
Tabela 31.	Zawartość procentowa kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego we wszystkich badanych gatunkach polskich i islandzkich	str. 124
Tabela 32.	Zestawienie sygnałów ^{13}C -NMR dla wyizolowanego związku z danymi literaturowymi dla kwasu usninowego	str. 126
Tabela 33.	Zestawienie sygnałów ^1H -NMR dla wyizolowanego związku z danymi literaturowymi dla kwasu usninowego	str. 129
Tabela 34.	Zestawienie sygnałów ^1H -NMR dla wyizolowanego związku z danymi literaturowymi dla kwasu fumaroprotocetrarowego	str. 134
Tabela 35.	Wpływ kwasu usninowego na żywotność komórek HTB-140, Du145 i HSF	str. 138
Tabela 36.	Wpływ atranoryny na żywotność komórek HTB140, Du145 i HSF	str. 139
Tabela 37.	Wpływ kwasu fumaroprotocetrarowego na żywotność komórek HTB140, Du145 i HSF	str. 140
Tabela 38.	Wpływ kwasu usninowego na proliferację komórek HTB-140, Du145 i HSF	str. 142
Tabela 39.	Wpływ atranoryny na proliferację komórek HTB-140, Du145 i HSF	str. 144
Tabela 40.	Wpływ kwasu fumaroprotocetrarowego na proliferację komórek HTB-140, Du145 i HSF	str. 146
Tabela 41.	Parametry ruchu komórek Du145 i HTB-140 pod wpływem kwasu usninowego	str. 154
Tabela 42.	Parametry ruchu komórek Du145 pod wpływem atranoryny	str. 155
Tabela 43.	Parametry ruchu komórek HTB-140 pod wpływem atranoryny	str. 156
Tabela 44.	Wpływ kwasu usninowego na stymulację procesu apoptozy w komórkach Du145	str. 159
Tabela 45.	Zestawienie wyników analizy fitochemicznej i aktywności kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego, przeprowadzonych w pracy	str. 186

Spis rycin

Rycina 1.	Różne formy plechy porostów: A - nitkowata, B - krzaczkowata, C - listkowata, D - skorupiasta	str. 9
Rycina 2.	Przykład niszczyielskiej działalności porostów - Katedra Notre Dame w l'Epine	str. 14
Rycina 3.	Schemat biogenetycznych i biochemicznych powiązań między metabolitami porostowymi [wg. Edwards 2003 II]	str. 16
Rycina 4.	Zdjęcia opisywanych gatunków (fot. własna)	str. 22
Rycina 5.	Ilość prac poświęconych kwasowi usninowemu w latach 1940-1990 [wg. Cocchietto]	str. 35
Rycina 6.	Wzór kwasu usninowego	str. 35
Rycina 7.	Enancjomery kwasu usninowego i izousninowego	str. 36
Rycina 8.	Schemat biosyntezy kwasu usninowego [wg. Ingolfssdottir 2002]	str. 37
Rycina 9.	Wzór atranoryny	str. 77
Rycina 10.	Schemat biosyntezy atranoryny [wg. Yamazaki 1965]	str. 78
Rycina 11.	Wzór kwasu fumaroprotocetrarowego	str. 95
Rycina 12.	<i>Cladonia arbuscula</i> zebrana na Islandii (z lewej) i w Polsce	str. 112
Rycina 13.	Chromatogramy wyciągów heksanowych (A), chloroformowych (B), acetonowych (C) i metanolowych (D) ze wszystkich badanych gatunków polskich i islandzkich wraz z wzorcami kwasu usninowego, atranoryny i kwasu fumaroprotocetrarowego	str. 114
Rycina 14.	Chromatogram wyciągu chloroformowego z <i>Cladonia macilenta</i> ssp. <i>floerkeana</i> (kolor czerwony) wraz z wzorcem kwasu usninowego (kolor czarny).	str. 115
Rycina 15.	Chromatogram wyciągu chloroformowego z <i>Cladonia subulata</i> (kolor niebieski) wraz z wzorcem atranoryny (kolor czarny)	str. 116
Rycina 16.	Chromatogram wyciągu acetonowego z <i>Cladonia subulata</i> (kolor czerwony) wraz z wzorcem kwasu fumaroprotocetrarowego (kolor czarny)	str. 116
Rycina 17.	Krzywe wzorcowe wykonane dla kwasu usninowego (A), atranoryny (B) i kwasu fumaroprotocetrarowego (C)	str. 118.
Rycina 18.	Graficzne przyporządkowanie sygnałów ^{13}C -NMR dla poszczególnych atomów węgla wyizolowanego kwasu usninowego	str. 127
Rycina 19.	Widmo ^{13}C -NMR wyizolowanego kwasu usninowego	str. 128
	Graficzne przyporządkowanie sygnałów ^1H -NMR dla poszczególnych atomów wodoru wyizolowanego kwasu usninowego	str. 130
Rycina 20.		
Rycina 21.	Widmo ^1H -NMR wyizolowanego kwasu usninowego	str. 131
Rycina 22.	Graficzne przyporządkowanie sygnałów ^1H -NMR dla poszczególnych atomów wodoru wyizolowanego kwasu fumaroprotocetrarowego	str. 134
Rycina 23.	Widmo ^1H -NMR dla wyizolowanego kwasu fumaroprotocetrarowego	str. 135

Rycina 24.	Wpływ kwa 139su usninowego na żywotność komórek HTB140 (A), Du145 (B) i HSF (C)	str. 138
Rycina 25.	Wpływ atranoryny na żywotność komórek HTB-140 (A), Du145 (B) i HSF (C)	str. 139
Rycina 26.	Wpływ kwasu fumaropro tocetrarowego na żywotność komórek HTB140 (A), Du145 (B) i HSF (C)	str. 140
Rycina 27.	Wpływ kwasu usninowego na proliferację komórek HTB-140 (A), Du145 (B) i HSF (C)	str. 143
Rycina 28.	Wpływ atranoryny na proliferację komórek HTB140 (A), Du145 (B) i HSF (C)	str. 145
Rycina 29.	Wpływ kwasu fumaroprotocetrarowego na proliferację komórek HTB140 (A), Du145 (B) i HSF (C)	str. 147
Rycina 30.	Wpływ kwasu usninowego na morfologię komórek HTB-140 (A - warunki kontrolne, D - inkubacja z 10µg/ml KU, G - inkubacja z 25µg/ml KU), Du145 (B - warunki kontrolne, E - inkubacja z 10µg/ml KU, H - inkubacja z 25µg/ml KU) oraz HSF (C - warunki kontrolne, F - inkubacja z 10µg/ml KU, I - inkubacja z 25µg/ml KU)	str. 149
Rycina 31.	Wpływ atranoryny (ATR) (A - warunki kontrolne, B - inkubacja z 10µg/ml ATR, C - inkubacja z 25µg/ml ATR) i kwasu fumaroprotocetrarowego (KF) (A - warunki kontrolne, D - inkubacja z 10µg/ml KF, E - inkubacja z 25µg/ml KF) na morfologię komórek Du145.	str. 150
Rycina 32.	Wpływ kwasu usninowego (KU) na cytoszkielet aktynowy komórek HTB-140 (A - warunki kontrolne, D - inkubacja z 10µg/ml KU, G - inkubacja z 25µg/ml KU), Du145 (B - warunki kontrolne, E - inkubacja z 10µg/ml KU, H - inkubacja z 25µg/ml KU) oraz HSF (C - warunki kontrolne, F - inkubacja z 10µg/ml KU, I - inkubacja z 25µg/ml KU)	str. 151
Rycina 33.	Wpływ atranoryny (ATR) na cytoszkielet aktynowy komórek HTB-140 (A - warunki kontrolne, D - inkubacja z 10µg/ml ATR, G - inkubacja z 25µg/ml ATR), Du145 (B - warunki kontrolne, E - inkubacja z 10µg/ml ATR, H - inkubacja z 25µg/ml ATR) oraz HSF (C - warunki kontrolne, F - inkubacja z 10µg/ml ATR, I - inkubacja z 25µg/ml ATR)	str. 152
Rycina 34.	Wpływ kwasu usninowego (KU) na migrację komórek Du145 (A - warunki kontrolne, B - inkubacja z 10µg/ml KU, C - 24h preinkubacja z 10µg/ml KU) i HTB-140 (D - warunki kontrolne, E - inkubacja z 10µg/ml KU)	str. 154
Rycina 35.	Wpływ atranoryny (ATR) na migrację komórek Du145 (A - warunki kontrolne, B - inkubacja z 10µg/ml ATR, C - 24h preinkubacja z 10µg/ml ATR) i HTB-140 (D - warunki kontrolne, E - inkubacja z 10µg/ml ATR, F - 24h preinkubacja z 10µg/ml ATR)	str. 155

- Rycina 36. Wpływ kwasu usninowego (KU) na morfologię jąder komórek Du145 (A, a - warunki kontrolne, D, d - inkubacja z 10µg/ml KU, G, g - inkubacja z 25µg/ml KU), str. 157
- Rycina 37. Wpływ atranoryny (ATR) na morfologię jąder komórek Du145 (A - warunki kontrolne, B - inkubacja z 20 µg/ml ATR, C - inkubacja z 30 µg/ml ATR) str. 158
- Rycina 38. Wpływ kwasu usninowego (KU) na stymulację procesu apoptozy w komórkach Du145 (A - warunki kontrolne, B - inkubacja z 10 µg/ml KU, C - inkubacja z 25 µg/ml KU) str. 160