



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Александар Г. Кочовић

**Екстракти лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*:
фитохемијска анализа, биолошка активност и
потенцијални кардиопротективни ефекти на
моделу доксорубицином изазване
кардиотоксичности**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2024. године



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Aleksandar G. Kočović

***Xanthoparmelia stenophylla* lichen extracts:
phytochemical analysis, biological activity and
potential cardioprotective effects in a model of
doxorubicin-induced cardiotoxicity**

Doctoral disertation

Kragujevac, 2024.

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Аутор
Име и презиме: Александар Кочовић
Датум и место рођења: 31.08.1991. године., Крагујевац, Република Србија
Садашње запослење: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Екстракти лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> : фитохемијска анализа, биолошка активност и потенцијални кардиопротективни ефекти на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности
Број страница: 164
Број: 16 слика, 20 табела, 62 графика
Број библиографских података: 184
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
Научна област (УДК): Медицина
Коментори:
Проф. др Недељко Манојловић, редовни професор за ужу научну област Фармацеутска анализа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу Доц. др Јована Новаковић, доцент за ужу научну област Фармацеутска биотехнологија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:
Одлука бр. IV-03-57/12 од 04.02.2022.

DOCTORAL DISSERTATION IDENTIFICATION PAGE

Author
Name and surname: Aleksandar Kočović
Date and place of birth: August 31 st , 1991., Kragujevac, Republic of Serbia
Current employment: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> lichen extracts: phytochemical analysis, biological activity and potential cardioprotective effects in a model of doxorubicin-induced cardiotoxicity
No. of pages: 164
No. of images: 16, tables:20, figures: 62
No. of bibliographic data: 184
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
Co-Mentors:
Prof. Nedeljko Manojlović, Full professor of Pharmaceutical Analysis at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac Ass. Prof. Jovana Novaković, Assistant Professor of Pharmaceutical Biotechnology at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Topic Application Date: September 16 th , 2021.
Decision number and date of acceptance of the doctoral/artistic dissertation topic:
Decision No: IV-03-57/12, date February 4 th , 2022.

ЗАХВАЛНИЦА

Веровали или не готово је.

Можда је могло да буде и раније, али мислим да је готово баш кад треба да буде. Такође, верујем да се велика већина вас неће сложити са мном, али имамо године и године заједничког дружења да убеђујемо једни друге ко је у праву.

Знамо се дуго. Сви ви и ја. И свако од вас је у овај документ или у мене уткао један мали део себе и ја се надам да ће свако од вас тај део препознати.

Не знам како да захвалност преточим у пар реченица, а да оне буду специфичне и посебне за сваког од вас, али ипак морам да покушам.

Највећу захвалност дугујем мојој мајци. Речи захвалности које бих јој написао превазишле би број речи ове докторске дисертације, која је њена бар онолико колико је и моја. Мама, хвала ти! Знаш све, идемо даље!

Хвала мом тати, Љиљи, Сари и Лани на подрици и стрпљењу. Нисте увек разумели шта радим, али сте увек разумели да је мени то важно.

Хвала Јелени што се појавила у мом животу, али и на огромном разумевању и подрици коју ми је пружила у финишу израде ове дисертације.

Велику захвалност дугујем менторима проф. др Недељку Манојловићу и доц. др Јовани Новаковић.

Професор Недељко Манојловић је својим огромним знањем и искуством омогућио да се ова докторска дисертација формулише и испланира, а својим саветима да се спроведе у дело.

Хвала Јовани на константној подрици, саветима и храбрости да се са оним што имамо упустимо у једно ново поглавље истраживања, при чему се надам да је ово само почетак.

Огромну захвалност, не само за докторску дисертацију, већ и за мој лични и професионални напредак дугујем професору Владимиру Јаковљевићу који ми је указао поверење и омогућио да се ова замисао спроведе у дело.

Хвала мојим колегама Мирославу и Јовици на свим саветима, помоћи и подрици приликом израде ове докторске дисертације.

Хвала професору Перици Васиљевићу на помоћи приликом сакупљања материјала, детерминације прикупљеног материјала и фитохемијске анализе. Сарадња је увек била професионална и на највишем могућем нивоу.

Велико хвала проф. др Дејану Баскићу, др Сузани Поповић и др Сањи Матић на великој помоћи приликом извођења експеримената за испитивање цитотоксичности.

Хвала др Мирјани Грујовић и др Катарини Младеновић на помоћи приликом одређивања антимикробне активности испитиваних узорака.

Након планирања и логистичке подршке неко је све ово морао да спроведе у дело, а то не би било могуће без њих три.

Маријана, Марина и Невена прошле су са мном сваки корак на овом путовању, пружиле ми несебичну помоћ и подршку у сваком тренутку и омогућиле да се све планирано спроведе до краја. Драго ми је што постојите и што сте моји пријатељи.

Захваљујем се свим осталим члановима тима Центра за претклиничка и функционална истраживања на помоћи и подршци током израде ове дисертације.

Има ту и вас осталих, немојте се љутити ако сам неког заборавио да поменем.

За крај бих вам оставио овде један цитат. Не неког познатог писца, научника, песника и слично. Цитат Човека, кога је мало вас овде лично познавало (нажалост), али кога засигурно препознајете кроз сваки мој поступак, манир, реч, питање или одговор. То је мој деда Никола, а својевремено је рекао: „Ако правиш, прави!“. Е па деда, направили смо га!

Насмејте се мало. Готово је... Или можда тек почиње.

Хвала вам још једном!

Волим вас све!

Живели!

Александар

САЖЕТАК

Увод: Доксорубицин може довести до појаве кардиотоксичности. Лишајеви представљају извор секундарних метаболита специфичне хемијске структуре и дејства. Уснинска киселина је један од најчешће испитиваних секундарних метаболита. Ефекти екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине до сада нису испитивани у погледу кардиопротективног ефекта.

Циљ: Циљ истраживања било је добијање екстракта лишаја *X. stenophylla*, фитохемијска карактеризација и одређивање биолошке активности, а затим испитивање потенцијалног кардиопротективног ефекта одабраног екстракта и уснинске киселине на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.

Материјал и методе: Први део истраживања подразумевао је израду ацетонског, метанолног и n-хексанског екстракта лишаја *X. stenophylla*, фитохемијску карактеризацију применом HPLC хроматографије и *in vitro* испитивање биолошке активности, док је у другом делу испитан потенцијални кардиопротективни ефекат применом *in vivo* и *ex vivo* метода, као и биохемијских, имуноесејских и PCR тестова.

Резултати: Утврђено је присуство четири различита секундарна метаболита у испитиваним екстрактима. Најизраженију антиоксидациону и антитуморску активност испољио је ацетонски екстракт, док је најизраженију антимикуробну активност испољио n-хексански екстракт. Ацетонски екстракт лишаја *X. stenophylla* и уснинска киселина испољили су значајан кардиопротективни ефекат, а као могући механизми деловања издвојили су се редукција оксидационог стреса и регулација процеса апоптозе.

Закључак: Лишај *X. stenophylla* представља биолошки извор једињења са потенцијалним антиоксидациони, антимикуробним, цитотоксичним и кардиопротективним дејством.

Кључне речи: Доксорубицин, Лишајеви, *Xanthoparmelia stenophylla*, Уснинска киселина, Кардиотоксичност, Оксидациони стрес, Апоптоза.

ABSTRACT

Introduction: Doxorubicin can cause cardiotoxicity. Lichens are a source of secondary metabolites with a specific chemical structure and action. Usnic acid is one of the most frequently investigated secondary metabolites. The effects of extracts of the lichen *Xanthoparmelia stenophylla* and usnic acid have not been investigated so far in terms of cardioprotective effect.

Aim: The objective was to obtain extracts of lichen *X. stenophylla*, their phytochemical characterization and determination of biological activity, and then to examine the potential cardioprotective effect of the selected extract and usnic acid in a model of doxorubicin-induced cardiotoxicity.

Material and methods: The first part of the research included the production of acetone, methanol and n-hexane extract of lichen *X. Stenophylla*, phytochemical characterization using HPLC chromatography and *in vitro* testing of biological activity, while the second part examined the potential cardioprotective effect using *in vivo* and *ex vivo* method, as well as biochemical, immunoassay and PCR tests.

Results: Four different secondary metabolites was identified. The most pronounced antioxidant and antitumor activity was shown by the acetone extract, while the most pronounced antimicrobial activity was shown by the n-hexane extract. The acetone extract of lichen *X. stenophylla* and usnic acid showed a significant cardioprotective effect, and the possible mechanisms of action were the reduction of oxidative stress and the regulation of the apoptosis.

Conclusions: Lichen *X. Stenophylla* represents a biological source of compounds with potential antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and cardioprotective effects.

Key words: Doxorubicin, Lichens, *Xanthoparmelia stenophylla*, Usnic acid, Cardiotoxicity, Oxidative stress, Apoptosis.

САДРЖАЈ

I	УВОД.....	1
	1.1. Доксорубицин.....	2
	1.1.1. Откриће и историјски развој доксорубицина.....	2
	1.1.2. Хемијске карактеристике доксорубицина.....	2
	1.1.3. Фармаколошке карактеристике и механизам цитостатског дејства доксорубицина.....	3
	1.1.4. Нежељена дејства доксорубицина.....	4
	1.1.5. Кардиотоксичност као нежељено дејство доксорубицина.....	5
	1.1.6. Молекулски механизми настанка доксорубицином индуковане кардиотоксичности.....	5
	1.1.7. Природни производи у третману доксорубицином изазване кардиотоксичности.....	6
	1.2. Лишајеви.....	8
	1.2.1. Опште карактеристике лишајева.....	8
	1.2.2. Таксономија лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i>	9
	1.2.3. Распрострањеност и морфоанатомске карактеристике лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i>	10
	1.2.4. Хемијски састав лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i>	10
II	ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА.....	12
	2.1. Циљеви истраживања.....	13
	2.2. Хипотезе истраживања.....	14
III	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	15
	3.1. Припрема и фитохемијска карактеризација екстраката лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и испитивање њихове биолошке активности.....	16
	3.1.1. Дизајн студије.....	16
	3.1.2. Прикупљање лишаја.....	16
	3.1.3. Припрема екстраката лишаја.....	16
	3.1.4. Анализа екстраката применом танкослојне хроматографије.....	17
	3.1.5. Анализа екстраката применом високо-ефикасне течне хроматографије ...	17
	3.1.6. Изоловање уснинске киселине.....	18
	3.1.7. Одређивање лимита детекције и лимита квантификације.....	18
	3.1.8. Одређивање укупног садржаја фенолних и флавоноидних једињења у испитиваним екстрактима лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i>	19
	3.1.9. Испитивање антиоксидационе активности екстраката лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине.....	20
	3.1.10. Испитивање антимикробне активности екстраката лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине.....	23
	3.1.11. Испитивање антибиофилм активности екстраката лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине.....	24
	3.1.12. Испитивање антитуморске активности екстраката лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине.....	25

3.2. Испитивање кардиопротективног ефекта екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселина на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.....	28
3.2.1. Анимални протокол	28
3.2.2. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине на хемодинамске параметре и параметре функције срца <i>ex vivo</i>	30
3.2.3. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине на параметре оксидационог стреса у крви, ефлуенту и ткиву миокарда.....	34
3.2.4. Испитивање утицаја примене ацетонског екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине на биохемијске маркере срчане функције и маркере инфламације	36
3.2.5. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине на патохистолошке карактеристике ткива миокарда.....	39
3.2.6. Испитивање утицаја примене ацетонског екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине на релативну експресију гена укључених у оксидациони стрес, апоптозу и инфламацију у левој комори срца.....	41
3.3. Снага студије и величина узорка	44
3.4. Статистичка обрада и анализа података	44
IV РЕЗУЛТАТИ.....	46
4.1. Припрема и фитохемијска карактеризација екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и испитивање њихове биолошке активности.....	47
4.1.1. Принос екстракције.....	47
4.1.2. Анализа екстракта применом танкослојне хроматографије.....	47
4.1.3. Анализа екстракта применом високо-ефикасне течне хроматографије ...	49
4.1.4. Лимит детекције и лимит квантификације	52
4.1.5. Укупан садржај фенолних и флавоноидних једињења у испитиваним екстрактима лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i>	53
4.1.6. Антиоксидациона активност екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине	53
4.1.7. Антимикробна и антибиофилм активност екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине	55
4.1.8. Антитуморска активност екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине	59
4.2. Испитивање ефеката доксорубицина на кардиоваскуларни систем пацова и изазивање кардиотоксичности	65
4.2.1. Испитивање ефеката примене доксорубицина на хемодинамске параметре и параметре функције срца <i>ex vivo</i>	65
4.2.2. Испитивање ефеката примене доксорубицина на параметре оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту, крви и ткиву миокарда	72
4.2.3. Испитивање ефеката примене доксорубицина на биохемијске маркере срчане функције и маркере инфламације	80

4.2.4. Испитивање ефеката примене доксорубицина на патохистолошке карактеристике ткива миокарда.....	83
4.2.5. Испитивање ефеката примене доксорубицина на релативну експресију гена укључених у оксидациони стрес, апоптозу и инфламацију у левој комори срца	86
4.3. Испитивање ефекта примене екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине на кардиоваскуларни систем пацова.....	90
4.3.1. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине на хемодинамске параметре и параметре функције срца <i>ex vivo</i>	90
4.3.2. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине на параметре оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту, крви и ткиву миокарда	95
4.3.3. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине на биохемијске маркере срчане функције и маркере инфламације	101
4.3.4. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине на патохистолошке карактеристике ткива миокарда.....	103
4.3.5. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине на релативну експресију гена укључених у оксидациони стрес, апоптозу и инфламацију у левој комори срца.....	107
4.4. Испитивање потенцијалног кардиопротективног ефекта екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселина на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности	110
4.4.1. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине на хемодинамске параметре и параметре функције срца <i>ex vivo</i> на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности	110
4.4.2. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине на параметре оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту, крви и ткиву миокарда на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности	115
4.4.3. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине на биохемијске маркере срчане функције и маркере инфламације на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности	122
4.4.4. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине на патохистолошке карактеристике ткива миокарда на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.....	124
4.4.5. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине на релативну експресију гена укључених у оксидациони стрес, апоптозу и инфламацију у левој комори срца на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности	128
V ДИСКУСИЈА	132

5.1. Припрема и фитохемијска карактеризација екстраката лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и испитивање њихове биолошке активности	133
5.1.1. Фитохемијска карактеризација и принос екстракције.....	133
5.1.2. Укупан садржај фенолних и флавоноидних једињења и антиоксидациона активност.....	134
5.1.3. Антимикробна и антибиофилм активност екстраката лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине	135
5.1.4. Антитуморска активност екстраката лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине	138
5.2. Кардиопротективни ефекти ацетонског екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине	140
5.2.1. Испитивање ефеката доксорубицина на кардиоваскуларни систем пацова и изазивање кардиотоксичности	140
5.2.2. Испитивање ефекта примене ацетонског екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселине на кардиоваскуларни систем пацова	142
5.2.3. Испитивање потенцијалног кардиопротективног ефекта ацетонског екстракта лишаја <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> и уснинске киселина на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности	144
VI ЗАКЉУЧЦИ	147
VII ЛИТЕРАТУРА	151
VIII ПРИЛОЗИ	165

І УВОД

1.1. Доксорубицин

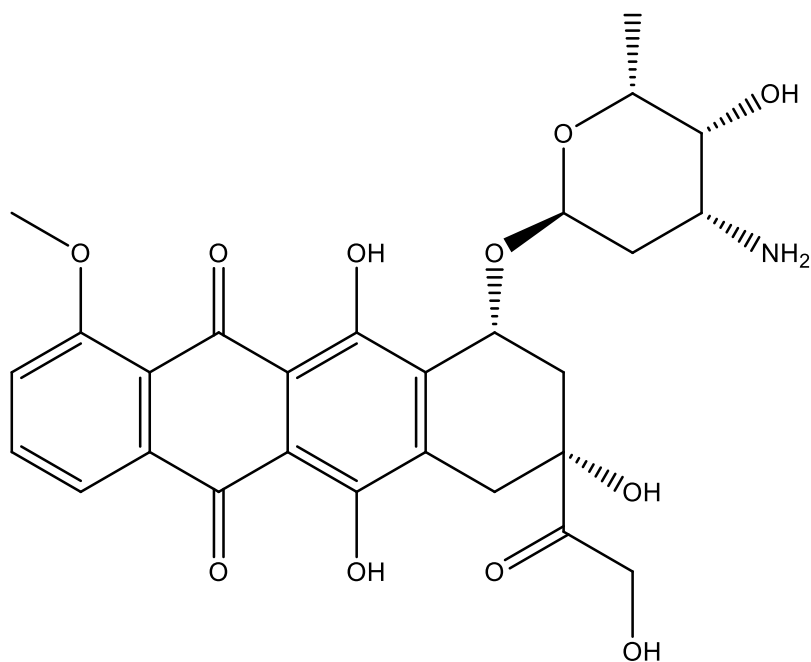
1.1.1. Откриће и историјски развој доксорубицина

Доксорубицин је једињење које у хемијском смислу припада породици антрациклинских антибиотика. Први представник ове групе лекова био је даунорубицин који је откривен 1960. године у оквиру скрининга једињења изолованих из култура бактеријских ћелија, које у уобичајним условима живе у земљишту, а у циљу откривања нових антимикробних агенаса (1). Даунорубицин је интензивно обојено једињење које је изоловано из културе бактерије *Streptomyces peucetius* (1). Током испитивања антимикробних својстава откривено је да даунорубицин испољава и антитуморску активност на туморским ћелијама мишева. Аналог даунорубицина, доксорубицин, изолован је 1969. године из културе бактерије *Streptomyces peucetius* var. *caesius* који представља хемијски мутирани сој наведене бактерије (2, 3). Доксорубицин је испољио значајно антитуморско дејство посебно у случају третмана леукемија, лимфома и солидних тумора, док је са друге стране испољио високу селективност односно минималан ефекат на здраве ћелије.

Након открића доксорубицина уследило је две деценије интензивних преклиничких и клиничких истраживања, са циљем откривања молекулских механизма дејства доксорубицина, ефикасности, безбедности примене, нежељених дејстава, токсичних ефеката, дозних режима, као и свих других параметара који би могли бити од значаја приликом клиничке примене. На основу свих прикупљених података FDA је током 70-тих година 20. века одобрио примену доксорубицина у терапији различитих карцинома (4).

1.1.2. Хемијске карактеристике доксорубицина

Доксорубицин је цитостатик веома широког спектра и може се користити у терапији тумора какви су тумори јајника и дојке, саркоми, тумор бешике, Хочкинов и нон-Хочкинов лимфом, али и акутна лимфобластна леукемија (4). Припада групи антрациклинских антибиотика са израженим цитостатским својствима. Карактерише се постојањем тетрацикличног нафтаценхинонског (тетраценског) система са хидроксилним групама у положајима 6, 8 и 11, кето групама у положајима 5 и 12 и метилоксанским прстеном као супституентом атома водоника у хидроксилној групи на положају 7 тетраценског система где се О гликозидном везом повезује гликонска компонента односно шећер дауносамин. Молекулска формула доксорубицина је $C_{27}H_{29}NO_{11}$, а молекулска маса износи 543,52 g/mol. Хемијска структура доксорубицина представљена је на **Слици 1**.



Слика 1: Хемијска структура доксорубицина

Доксорубицин се на тржишту може наћи под различитим називима као што су: *Doxil*[®], *Rubex*[®], *Myocet*[®], *Adriamycin RDF*[®], *Adriamycin PFS*[®] и други. Доступан је у облику хидрохлоридне соли или у облику липозомалне формулације. Оба облика доксорубицина примењују се у облику интравенске инјекције, при чему се липозомална формулација одликује нешто нижим степеном токсичности у поређењу са стандардним раствором (5). Последњих година ради се на развоју нових фармацеутско-технолошких облика за примену доксорубицина какви су микроемулзије (6), фото-осетљиви липозоми (7), липозоми са двоструким лигандима (8), наноформулације (9), које ће омогућити циљану испоруку доксорубицина до малигних ћелија и истовремено смањити појаву и степен тежине нежељених ефеката.

Доксорубицин је изразито фотосензитиван тако да се до примене обавезно чува у тамној бочици, на тамном и хладном месту.

1.1.3. Фармаколошке карактеристике и механизам цитостатског дејства доксорубицина

Свој антитуморски ефекат доксорубицин остварује комбинованим дејством и то са једне стране интеркалацијом односно специфичним уметањем антрациклинског језгра између комплементарних ланаца молекула ДНК, а са друге стране инхибирањем активности ензима топоизомеразе II, који је одговоран за ослобађање молекула ДНК током процеса репликације. Након интеркалације у молекул ДНК спречава се и нормална функција ензима ДНК полимеразе, чиме је инхибиран процес деобе ћелије, као и њено нормално функционисање. Специфична структура антрациклина коју чини неполарно нафтаценхинонско језгро и поларна гликонска компонента омогућава доксорубицину да се раствара и у хидрофилним и у липофилним растварачима, али истовремено да буде транспортован кроз биолошке мембране. Такође, молекули доксорубицина се специфично везују за неке протеине плазме у делове ћелијске мембране. Липофилни део доксорубицина због своје структуре испољава карактеристике киселости, док аминокшећер има базне карактеристике.

Наведени механизми дејства су истовремено одговорни и за појаву нежељених дејстава и токсичних ефеката (10).

1.1.4. Нежељена дејства доксорубицина

Као и већине других цитостатика нека од најчешћих нежељених дејстава јесу она везана за дигестивни тракт, а укључују мучнину, повраћање, дијареју и губитак апетита. Учесталост појаве гастроинтестиналних нежељених дејстава је између 1% и 10% и сматрају се честим нежељеним дејствима (11). Сви наведени симптоми утичу на опште стање болесника, а могу утицати и на ток болести и опоравак. Ова нежељена дејства често захтевају примену симптоматске терапије коју чине антиеметици, прокинетици и пробиотици, а такође је важно прилагођавање начина исхране и праћење уноса хранљивих материја (12, 13). Мучнина и повраћање обично се јављају 24 сата након примене доксорубицина. Упале слузница, а нарочито стоматитис и езофагитис јављају се између петог и десетог дана од примене, а учесталије су када режим дозирања подразумева примену током три узастопна дана. Код неких пацијената забележена је и хиперпигментација оралне слузнице. Као најозбиљније гастроинтестинално нежељено дејство јавља се некроза колоне која је праћена обилним крварењем и инфекцијама и јавља се обично код пацијената са акутном нелимфоцитном леукемијом који су третирани комбинацијом доксорубицина и цитарабина.

Друга група нежељених дејстава односи се на хематолошке поремећаје који могу укључивати анемију, леукопенију, тромбоцитопенију или општу панцитопенију, а такође спадају у групу честих нежељених дејстава са инциденцом између 1 и 10% (11). Сви ови поремећаји последично могу довести до опште слабости организма и убрзаног замарања болесника, чешће појаве бактеријских и вирусних инфекција, поремећаја коагулације и учесталог крварења. Највећи степен супресије костне сржи у случају примене доксорубицина јавља се две недеље након почетка терапије, али се сви параметри крвне слике обично враћају у нормалу након три недеље. У случају да се параметри крвне слике не побољшају у наведеном периоду, врши се кориговање примењене дозе. Забележени су и случаји појаве секундарне акутне мијелоидне леукемије у случају примене доксорубицина нарочито у комбинацији са другим цитостатским лековима. Због тога је код пацијената на терапији доксорубицином неопходно континуирано праћење параметара крвне слике и адекватно реаговање у смислу примене трансфузије пуне крви, плазме, тромбоцита или фактора раста гранулоцитно-макрофагних колонија (14).

Поред праћења параметара крвне слике, код пацијената на терапији доксорубицином неопходно је пратити и биохемијске параметре, а посебно ензиме аспартат-аминотрансфераза (AST) и аланин-аминотрансфераза (ALT) који могу указати на потенцијално оштећење јетре (15).

Као последица примене доксорубицина може се јавити инфламација коже и слузокоже, хиперпигментација коже и палмарно-плантарна еритродистезија (синдром шака-стопало). Ова нежељена дејства чешће се јављају код пегированих и липозомалних формулација доксорубицина. Промене на кожи нису болне, али могу представљати додатни психолошки и емоционални изазов за ове пацијенте (16, 17).

Међу свим наведеним нежељеним дејствима, као најчешће и најозбиљније издваја се кардиотоксичност.

1.1.5. Кардиотоксичност као нежељено дејство доксорубицина

Кардиотоксичност се може јавити као нежељено дејство услед примене различитих врста цитостатика, али се најчешће везује за примену антрациклинских антибиотика чију су представници доксорубицин и даунорубицин (18). Специфично је то да је ово нежељено дејство дозно-зависно, односно да се најчешће јавља у случају да се прекорачи доза од 400-700 mg/m² (10), што се означава као иреверзибилна кардиотоксичност или тип 1 кардиотоксичности. У случају прекорачења највише дозе кардиотоксичност се јавља код готово половине пацијената. Симптоми кардиотоксичности су отежано дисање, бол у грудима, палпитације, вртоглавица и отоци око чланака. Кардиотоксичност се посебно издваја по учесталости појаве код пацијената на терапији доксорубицином, по значају и утицају на опште здравствено стање пацијената, као и на успешност терапије.

1.1.6. Молекулски механизми настанка доксорубицином индуковане кардиотоксичности

До сада је описано неколико могућих механизма настанка доксорубицином индуковане кардиотоксичности и последично срчане инсуфицијенције. Најчешће разматрани механизам је оштећење срчаног ткива посредовано оксидационим стресом. Оксидациони стрес доводи до повећане синтезе реактивних кисеоничних врста које доводе до оштећења срчаног мишића, а праћене су и смањеним нивоом антиоксидационих молекула, а нарочито оних са тиолним групама. Такође, описан је механизам којим поремећај у нивоу јона калцијума доводи до апоптозе кардиомиоцита и ендотелних ћелија и то путем активације каспаза (19).

Главни проблем након примене доксорубицина је продукција слободних радикала који могу да доведу до оштећења кардиомиоцита. Долази до повећане продукције реактивних кисеоничних врста (енгл. *Reactive oxygen species* - ROS) и пероксидације липида у ткиву миокарда. Описани су различити механизми настанка ROS, као што су митохондријама посредована продукција ROS и ензимима посредована продукција ROS где се посебно издваја азот-моноксид синтетаза (NOS) (20, 21).

Доксорубицин интерагује са ендотелном NOS (eNOS), при чему доводи до формирања семихинонског радикала кооји доводи до редуковања слободног кисеоника до супероксид-анјон радикала. Ово доводи до нарушавања равнотеже између нивоа азот-моноксида и супероксид-анјон радикала, што последично доводи до испољавања токсичних ефеката. Примена доксорубина на култури говећих ендотелних ћелија аорте доводи до појачане експресије гена за eNOS, као и до повећане концентрације овог ензима што за крајњи ефекат има апоптозу. Постоје три типа NOS и то: индуцибилна (iNOS), ендотелна (eNOS) и неуронална (nNOS). Такође је уочено да примена доксорубицина доводи до повећане експресије гена за iNOS, повећане експресије протеина и последично увећане концентрације нитротирозина. Нитротирозин доводи до повећане синтезе супероксид-анјон радикала у митохондријама, смањења контрактилности кардиомиоцита и смањења активности ензима антиоксидационог система заштите као што су каталаза и глутаион пероксидаза. Овај ефекат је доказан тако што је доксорубицин примењен код iNOS нокаут мишева, при чему не доводи до претходно наведених поремећаја (10, 21).

Доксорубицин испољава специфичан афинитет према митохондријама кардиомиоцита што последично доводи до нарушавања њихове функције и смрти. Пошто се након примене молекула доксорубицина метаболички преводи у своју позитивно наелектрисану форму, постоји могућност да се веже за кардиолипински протеин и да са њим формира иреверзибилни комплекс чиме се ремети физиолошка функција мембране. Узимајући у

обзир улогу кардиолипина у респираторном низу, може се закључити да се формирањем наведеног комплекса истовремено онемогућава регуларно стварање енергије, а целокупан процес праћен је повећањем концентрације супероксид радикала. Поред кардиолипина нарушавају се структура и функција и других протеина у митохондрији (10, 19, 20).

1.1.7. Природни производи у третману доксорубицином изазване кардиотоксичности

Узимајући у обзир учесталост кардиотоксичности код пацијената који су на терапији доксорубицином, све је већа потреба за проналаском нових агенаса који би спречили или ублажили овај нежељени ефекат. Иако конвенционални лекови имају своје место у лечењу кардиотоксичности, последњих неколико деценија у жижи научних интересовања је проналазак препарата базираних на природним ресурсима који би унапредили конвенционалну терапију. Природни препарати најчешће изазивају мање штетних ефеката у односу на синтетичке лекове, па су корисни за дугорочно лечење. Такође, мање ступају у интеракције са другим лековима, а уз то често показују и антиинфламаторне, антиоксидационе и антихипертензивне ефекте што их чини атрактивним за лечење кардиотоксичности. Управо због тога, испитивања природних производа у лечењу кардиотоксичности веома су корисна за проналазак или допуну постојеће терапије са циљем да се квалитет живота пацијената лечених доксорубицином побољша. Тренутно су у фокусу научних истраживања бројни природни препарати, а у наредним поглављима наведени су само неки од најзначајнијих.

1.1.7.1. Ресвератрол

Ресвератрол је полифенолно једињење са стилбенским језгром које је састојак великог броја различитих биљака и значајан је састојак црвених вина. Ово једињење има доказани антиоксидациони ефекат, али испољава и антиинфламаторно дејство путем инхибиције функционисања ензима као што су циклооксигеназа и хидропероксидаза. Сматра се да кардиопротективно дејство ресвератрола потиче од активирања АМПК чиме се ублажавају процеси апоптозе и фиброзе, али и умањује оксидациони стрес који настаје у случају доксорубицином изазване кардиотоксичности. Антиоксидационо дејство огледа се у смањењу продукције ROS, али и индуковању антиоксидационог ефекта ензима као што су каталаза и супероксид-дисмутаза (22). Сличне ефекте остварује и природни аналог ресвератрола, птеростилбен, који смањује оксидациони стрес активирањем SIRT1 и АМПК каскадних механизма, али и редукује доксорубицином изазвану кардиотоксичност путем активације PGC-1 α који је задужен за ремоделовање мишићног ткива до фиброзног ткива (23).

1.1.7.2. Алицин

Алицин представља један од најважнијих састојака белог лука, а у хемијском смислу представља органосумпорно једињење са различитим биолошким ефектима као што су антибактеријски, антигљивични, антитуморски и антиоксидациони, а испољава и протективни ефекат у случају доксорубицином изазване кардиотоксичности (24). Истраживања су показала да алицин ефикасно смањује продукцију РОС, инфламацију и апоптозу у случају доксорубицином изазване кардиотоксичности, а главни ефекат огледа су у активацији ензима система антиоксидационе заштите као што су каталаза, супероксид-дисмутаза и глутатион пероксидаза (25).

1.1.7.3. Куркумин

Куркумин има бифенолну структуру и представља главни састојак биљке куркуме (*Curcuma longa*), која се користи као зачин претежно у азијској кухињи. Због своје интензивне жуто-наранџасте боје често се користи као средство за бојење намирница. У претходним истраживањима показано је да куркумин испољава антиинфламаторно и антиапоптолично дејство активирањем различитих молекуларних механизма (26). Могуће објашњење за протективно дејство у случају доксорубицином изазване кардиотоксичности јесте неутралисање штетних ефеката доксорубицина, а посебно повећања синтезе ROS, индукције пироптозе, индукције липидне пероксидације и смањења активности ензима система антиоксидационе заштите. Показано је такође да примена доксорубицина доводи до нисходне регулације сигналног пута PI3K/Akt/mTOR, нисходне регулације антиапопточког фактора Bcl-2, али и усходне регулације Вах протеина што све последично доводи до нарушавања функције митохондрија и смрти ћелија. Куркумин ефикасно смањује ниво Вах протеина, врши усходну регулацију сигналног пута Akt/mTOR, али и мења функцију проапоптоских фактора какви су каспаза-1, интерлеукин-18 и NLRP3 чиме се спречава процес пироптозе ћелија. Такође, ефикасно смањује ниво креатин-киназе, лактатне дехидрогеназе и аспарат-аминотрансферазе код доксорубицином изазване кардиотоксичности. Примећено је и смањење нивоа аутофагије кардиомиоцита и то тако што куркумин редукује ниво аутофагозома дејством на GFP-LC3 и Beclin1 протеине (27).

Континуирана истраживања у области нових природних препарата имају кључну улогу у развоју фармације, очувању здравља пацијената, откривању нових терапијских опција и индивидуалном приступу у лечењу. Узимајући у обзир да се за лишајеве још од давнина зна да могу побољшати срчану функцију, смањити упалу и подржати опоравак миокарда, у фокусу нашег истраживања је лишај, тачније његови екстракти и секундарни метаболит о којима ће више бити речи у наредном поглављу. Са друге стране, имајући у виду да лишајеви до сада нису испитивани на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности, овај рад ће бити камен темељац будућим истраживањима из ове области.

1.2. Лишајеви

1.2.1. Опште карактеристике лишајева

Лишајеви (лат. *Lichenes*) су космополитски распрострањени организми који таксономски припадају царству гљива (лат. *Fungi*), а представљају симбиотску заједницу микобионта и фотобионта. Главни део ове заједнице који одређује облик и изглед лишајева јесте гљива (микобионт), док је фотобионт организам који је способан да обавља фотосинтезу. Најважнији представници фотобионта су цијанобактерије и зелене алге, док микобионт чине гљиве поткраљевства *Dikarya*, односно раздела *Ascomycota* и *Basidiomycota*. До сада је откривено да око једне петине свих познатих гљива може да чини микобионтску компоненту симбиотске заједнице лишајева (28). Уколико фотобионт чини алга такав фотобионт називамо фикобионт, а уколико га чини цијанобактерија називамо га цијанобионт. Најважнији представници фикобионта су из родова *Trebouxia* и *Trentepohlia*, док представници цијанобионта најчешће припадају роду *Nostoc*. Најважнија разлика међу овим организмима је та што су алге еукариотски организми, а цијанобактерија прокариотски организми. Постоје и случајеви када оба типа фотобионта коегзистирају у оквиру истог лишаја и тада се алга издваја као доминантни фотобионт (29).

Лишајеви представљају један од најкарактеристичнијих примера симбиотске заједнице са особинама које омогућавају овим организмима да живе, расту и размножавају се у условима у којима појединачни организми не би могли да опстану. Гљиве имају улогу да обезбеде потпорно ткиво целом лишају, као и да обезбеде довољну количину воде и минералних материја из околне средине, док цијанобактерије и алге врше фотосинтезу и обезбеђују гљивама довољну количину глукозе, као и одређену количину органских једињења азота у случају цијанобактерија (30, 31).

Вегетативно ткиво лишаја, односно тело лишаја, назива се талус и највећим делом је изграђен од хифа. Хифе се вишеструко гранају и међусобно преплићу стварајући такозвану „анастомозирану“ структуру лишаја. У оваквој мрежи изграђеној од хифа смештају се ћелије фотобионта (32-34). Уколико се на попречном пресеку талуса уочавају неки од слојева, такву структуру називамо хетеромерна структура. Уколико се слојеви не могу разликовати такву структуру називамо хомеомерна структура. Талус се, гледано на попречном пресеку, може поделити у пет слојева:

1. Кора (лат. *cortex*) представља спољашњи слој талуса лишаја који је у контакту са спољашњом средином. Изграђен је од густо пакованих филамената ткива гљиве и има за циљ да штити дубље слојеве од спољашњих утицаја, као и да ограничи сунчеву светлост да доспе до дубљих слојева. Дебљина коре је од неколико стотина микрометара до једног милиметра.
2. Фотобионтски (симбиотски) слој сачињен од мреже филамената ткива гљиве између којих се налазе ћелије фотобионта.
3. Срж (лат. *medulla*) – у зависности од типа лишаја може да садржи додатне ћелије фотобионта, али у већини случајева садржи само ткиво гљиве који пружа потпору фотобионтском слоју.
4. Доња кора богата је хифама и представља основу за израстање структура које су одговорне за причвршћивање лишаја за подлогу. Присуство доње коре условљени је морфо-анатомском структуром лишаја и најчешће је код фрутикозног типа лишаја.

5. Ризине („коренчићи“) – израстају са доње стране талуса лишаја и имају улогу у причвршћивању лишаја за подлогу (супстрат). Нису заступљени код свих типова лишајева.

Према морфо-анатомској структури можемо разликовати следеће типове лишајева:

1. Листасти (фолиозни) лишајеви – карактеришу се растом у једној равни и постојањем одвојених режњева, односно листова талуса лишаја. Примери за овакав тип лишајева су врсте *Parmotrema tinctorum* (35), *Myelochroa leucotyliza* (36), *Nephroma arcticum* (L.) Torss (37) и многе друге.
2. Корасте (крустозни) лишајеви – личе на кору, а расту течно припијени за супстрат и тешко се одвајају. Брзина раста им је нешто мања у поређењу са листасти лишајевима (38). Примери за овакав тип лишајева су врсте *Rhizocarpon geographicum* (39), *Arthonia excipienda*, *Graphidastra multiformis* (40) и многе друге.
3. Жбунасте (фрутикозни) лишајеви – расту у облику малих жбунова са доста појединачних грана које могу бити оријентисане на више (усправно) или на ниже (висећи). Гране жбунастих лишајева имају скоро округло попречни пресек. Примери за овакав тип лишајева су врсте *Usnea orientalis* (41), *Cladonia borealis* (42), *Lecanora anakeestiicola* (43) и многе друге.
4. Прелазне и мешовите форме – сквамозни лишајеви који се карактеришу структуром сличном корастим лишајевима, али са врховима издигнутим од подлоге, геласте лишајеви који немају диференцирану унутрашњу структуру, лепрозни лишајеви који расту на супстрату (најчешће камену) у облику праха у једном слоју, при чему подсећају на лепрозне промене, као и друге, мање заступљене форме.

1.2.2. Таксономија лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*

Лишај *Xanthoparmelia stenophylla* (Ach.) Ahti & D. Hawksw (*Xanthoparmelia stenophylla*) припада породици лишајева Parmeliaceae. Комплетна таксономска класификација лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* представљена је у Табели 1:

Табела 1: Таксономска класификација лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*

Царство:	Fungi
Потцарство:	Dikarya
Раздео:	Ascomycota
Подраздео:	Pezizomycotina
Класа:	Lecanoromycetes
Поткласа:	Lecanoromycetidae
Ред:	Lecanorales
Фамилија:	Parmeliaceae
Потфамилија:	Parmelioideae
Род:	<i>Xanthoparmelia</i>
Врста:	<i>Xanthoparmelia stenophylla</i>

Поред тога лишај *Xanthoparmelia stenophylla* има бројне синониме и то: *Parmelia somloensis* Gyeln., *Parmelia stenophylla* (Ach.) Heugel, *Xanthoparmelia somloensis* (Gyelnik) Hale, *Parmelia conspersa* subsp. *stenophylla* (Ach.) Hasse, *Imbricaria conspersa* var. *stenophylla* (Ach.) Jatta, *Parmelia centrifuga* var. *stenophylla* (Ach.) Rabenh., *Parmelia conspersa* var. *stenophylla*, *Parmelia somloensis* var. *somloensis* Gyeln., *Parmelia stenophylla* var. *stenophylla* Mull. Arg., *Parmelia viriduloumbrina* var. *somloensis* (Gyeln.) Gyeln.,

Imbricaria conspersa f. stenophylla (Ach.) Flot., *Parmelia centrifuga f. stenophylla* (Ach.) Wallr., *Parmelia conspersa f. stenophylla* (Ach.) Schaer., *Parmelia polyphylloides f. somloensis* (Gyeln.) Gyeln., *Parmelia somloensis f. somloensis* Gyeln. и *Parmelia stenophylla f. stenophylla* Mull. Arg..

На основу таксономске класификације може се уочити да лишај *Xanthoparmelia stenophylla* има микобионт из раздела Ascomycota, док су као фотобионти заступљене алге из породице Chlorococcaceae.

1.2.3. Распрострањеност и морфоанатомске карактеристике лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*

Лишај *Xanthoparmelia stenophylla* је распрострањен широм света, на свим континентима и у свим врстама станишта. Најчешће расте на каменој подлози која је добро осветљена и за коју је лишај слабо причвршћен, међутим често се може пронаћи и на другим врстама подлоге попут земље, глине, хумуса или опалог лишћа. Талус лишаја је фрутикозне форме, ширине до 5 cm, обојен у различите нијансе зелене, жуте и сиве боје. Површина талуса лишаја може бити сјајна са мање или више израженим белим пегамма. Режњеви лишаја су ширине до 3 mm, издужени, дихотомно разгранати, перасто дељени и међусобно преклопљени. Доња површина је бледо смеђа до смеђа, умерено ризинирана (44).

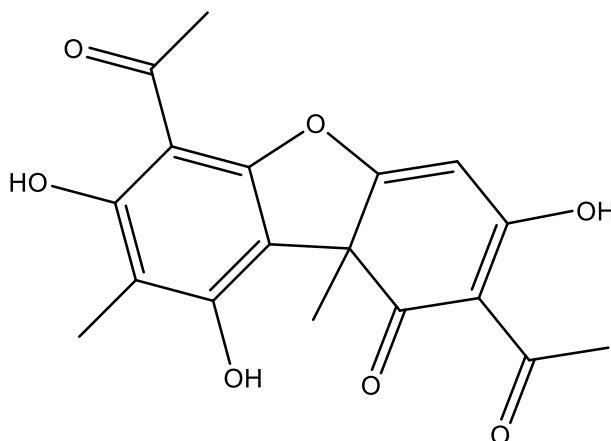
1.2.4. Хемијски састав лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*

У досадашњим истраживањима као главни састојци лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* издвојили су се салазинска киселина и уснинска киселина (44). Постоје записи о традиционалној примени лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у третману полних болести као што је сифилис, за смањење упале гингивалног ткива, као и у третману рана након змијског уједа. Са друге стране, лишајеви из рода *Xanthoparmelia* традиционално се примењују у третману реуматских болести, хроничног бола, артритиса, изражених менструалних тегоба и отицања (45).

Уснинска киселина је секундарни метаболит који је идентификован у великом броју различитих врста лишајева и већ скоро два века је предмет истраживања у биологији, екологији, хемији, медицини, фармацији, фармакологији, биотехнологији и другим наукама (46, 47). Почевши од њеног открића, преко присуства и заступљености у лишајевима из различитих породица па до бројних доказаних биолошких ефеката које испољава уснинска киселина је стална тема истраживања научника из различитих области.

Уснинску киселину открио је немачки агрохемичар Вилхелм Кноп 1844. године и то тако што је изоловао и окарактеризовао једињење из лишаја *Usnea barbata*, одакле и потиче назив уснинска киселина (47). Уснинска киселина је један од секундарних метаболита лишајева који су први откривени, али постоје подаци о примени лишајева који је садрже још из античког доба. Хемичари Курд и Робертсон синтетисали су уснинску киселину у периоду између 1933. и 1937. године, а касније је откривена у великом броју лишајева из родова *Cladonia*, *Hypotrachyna*, *Ramalina*, *Evernia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Alectoria* и *Parmelia* (47). Уснинска киселина је једно од најчешће проучаваних једињења пореклом из лишајева, а њено откриће практично је покренуло како откриће нових врста лишајева, тако и других секундарних метаболита. Распрострањена је у лишајевима који се могу наћи широм света и у свим врстама станишта. Сматра се да у лишајевима има заштитну улогу и то од различитих патогена, хербивора и других стресних фактора средине.

Уснинска киселина је једињење карактеристичне дибензофуранске структуре (Слика 2).



Слика 2: Структура уснинске киселина

На основу оријентације метил-групе у положају 9b могу се разликовати два изомерна облика уснинске киселине и то: (+)-енантиомер и (-)-енантиомер. Нека истраживања упућују на то да постоји значајна разлика у дејству и токсичности наведених изомера (46). Специфична хемијска структура и већа заступљеност хидроксилних и кисеоничних група уско су повезане са доказаним ефектима уснинске киселине (47). Различита *in vitro* и *in vivo* истраживања потврдила су антибактеријско, антибиофилм, антифунгално, антиоксидационо и антитуморско дејство саме уснинске киселине (48-52). Антибактеријско дејство уснинске киселине доказано је на различитим грам-позитивним и грам-негативним бактеријским сојевима какви су *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. Од посебног је значаја ефекат уснинске киселине на мултирезистентне сојеве наведених бактерија (48, 49). Антифунгално дејство највише је испитивано на гљивицама *Candida albicans* and *Aspergillus spp* на којима је доказан значајан ефекат (50). Када је у питању цитотоксично дејство оба енантиомера испољавају значајан ефекат на широком спектру хуманих и мишјих туморских ћелијских линија. Посебно се издваја ефекат према ћелијским линијама аденокарцинома колона (HT-29), промијелоцитне леукемије (HL-60), карцинома колона (HCT-116), аденокарцинома дојке (MCF-7), карцинома јајника (A2780), аденокарцинома дојке (SK-BR-3) и аденокарцинома цервикса (HeLa) (47, 48).

Уснинска киселина је репрезентативни пример разноликости биодиверзитета како у лишајевима тако и у целокупном живом свету, а такође указује на важност природних производа у открићу и развоју нових лекова у данашње време. Од самог открића, преко распрострањености у лишајевима и доказаних биолошких ефеката уснинска киселина је била од значаја као ресурс за биомедицинска истраживања, фармаколошка истраживања и истраживања природних производа. Без обзира на велики број истраживања чини се да уснинска киселина поседује и даље неоткривене потенцијале за унапређење људског здравља.

И друга једињења присутна у испитиваним екстрактима лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* као што су салазинска киселина, обтусична киселина, леканорна киселина и атранорин испољавају антиоксидациони ефекат (47, 48, 53).

Према нашим сазнањима, фармаколошки ефекти лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* до сада нису у потпуности испитани. Међутим, узимајући у обзир хемијски састав испитиваних екстраката можемо претпоставити да ће лишај у целини испољити ефекат који је последица адитивног или потенцирајућег синергизма присутних супстанци.

II ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. Циљеви истраживања

Главни циљеви првог дела овог истраживања подразумевали су фитохемијску карактеризацију екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, као и одређивање антиоксидационе, антимикуробне и антитуморске активности испитиваних екстракта. На основу фитохемијског састава екстракта, као и на основу њихове антиоксидационе активности, одабран је екстракт који је био коришћен у другом делу истраживања уз уснинску киселину.

Главни циљеви другог дела истраживања били су испитивање ефеката администрације одабраног екстракта и уснинске киселине на функцију и морфологију миокарда у моделу доксорубицином индуковане кардиотоксичности, као и испитивање потенцијалних механизма кардиопротективног дејства одабраног екстракта и уснинске киселине.

У складу са главним циљевима, постављени су и следећи специфични циљеви:

1. Фитохемијска карактеризација ацетонског, метанолног и п-хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*
2. Евалуација и компарација антиоксидационих ефеката ацетонског, метанолног и п-хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*
3. Евалуација и компарација антимикуробних ефеката ацетонског, метанолног и п-хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*
4. Евалуација и компарација антитуморских ефеката ацетонског, метанолног и п-хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*
5. Евалуација и компарација кардиопротективних ефеката одабраног екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.
6. Евалуација и компарација ефеката одабраног екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на редокс статус пацова којима је доксорубицином изазвана кардиотоксичност.
7. Испитивање потенцијалних механизма кардиопротекције изазване применом одабраног екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.

2.2. Хипотезе истраживања

Основна хипотеза истраживања била је да лишај *Xanthoparmelia stenophylla* садржи различите секундарне метаболите лишајева са потенцијалним биолошким ефектом, као и да примена екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине остварује кардиопротективни ефекат на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности

На основу наведеног постављене су следеће хипотезе:

1. Хемијски састав ацетонског, метанолног и n-хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* разликује се у квалитативном и квантитативном аспекту.
2. Ацетонски, метанолни и n-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* садрже фенолна и флавоноидна једињења
3. Ацетонски, метанолни и n-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* испољавају антиоксидациону активност.
4. Ацетонски, метанолни и n-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* испољавају антимикуробну активност.
5. Ацетонски, метанолни и n-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* испољавају антитуморску активност.
6. Одабрани екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* има значајан кардиопротективни ефекат на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.
7. Уснинска киселина, као секундарни метаболит лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, има значајан кардиопротективни ефекат на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.
8. Потенцијални механизам кардиопротективног дејства екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* подразумева модулацију редокс статуса и процеса апоптозе.
9. Потенцијални механизам кардиопротективног дејства уснинске киселине, као секундарног метаболита лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, подразумева модулацију редокс статуса и процеса апоптозе.

III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Припрема и фитохемијска карактеризација екстраката лишаја

Xanthoparmelia stenophylla и испитивање њихове биолошке

активности

3.1.1. Дизајн студије

Студија је дизајнирана као експериментална студија на биљном материјалу *in vitro*, на животињама *in vivo* и материјалу анималног порекла *in vitro* и *ex vivo*.

3.1.2. Прикупљање лишаја

Узорак лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* из породице Parmeliaceae сакупљен је у септембру 2021. године. Сакупљање је обављено на подручју Старе планине (ГПС координате - 43°21'51.9"N 22°32'33.4"E) у источном делу Републике Србије. Приликом сакупљања прикупљено је укупно 450 g лишаја, при чему се водило рачуна да се не прикупља целокупна постојећа количина лишајева са истог локалитета и тиме се угрозио опстанак популације на месту сакупљања. Материјал се прикупљао пажљивим одвајањем лишаја од подлоге помоћу ножа. Идентификација лишаја извршена је на основу поређења морфолошких и анатомских карактеристика лишаја са референтним литературним подацима, као и коришћењем стандардних хемијских техника (54). Узорак лишаја депонован је на Катедри за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу (број ваучера: 770НХМ).

3.1.3. Припрема екстраката лишаја

Прикупљени материјал је пречишћен од земље, камења, коре дрвећа, делова других биљака и делова других лишајева, након чега је подвргнут поступку сушења. Лишај је сушен на собној температури (22-25°C) током 7 дана, уз свакодневну промену упијајућег материјала испод лишаја. Осушени лишај је млевен у прах коришћењем лабораторијског млина (*IKA A11, IKA®-Werke GmbH & Co, Germany*). Након млевења прах је просејан кроз сито величине 0,30 (55), како би се уједначила величина честица на 300 µm и на тај начин побољшао процес екстракције. Растварачи, ацетон, метанол и *n*-хексан (*Sigma Aldrich, Burlington, Massachusetts, United States*), припремљени су за процес екстракције применом поступка редестилације, након чега је уследило филтрирање кроз мембрански филтер величина пора 0,22 µm (*MF-Millipore® , Merck and Company, Rovey, New Jersey, USA*). Екстракција се обављала у стакленој боци, одговарајуће запремине, са шлифованим чепом, а као поступак за екстракцију одабрана је вишеструка мацерација. Уситњена дрога је преливена растварачем и остављена да стоји током три дана на тамном месту уз повремено мућкање и мешање како би се нарушио стационарни слој који се формира на додирној површини дроге и растварача и омогућила ефикаснија дифузија активних принципа из уситњеног лишаја у растварач. Однос дроге и растварача био је 1:10 (*m/v*), односно за сваки грам дроге користило се 10 mL растварача, а за 20 g дроге коришћено је по 200 mL сваког од растварача. Промена растварача обављала се на свака три дана и то тако што је целокупан садржај боце филтриран, након чега је филтрат одвајан и чуван у фрижидеру до краја поступка мацерације, а дрога која је заостала на филтер папиру је враћана у боцу и додавана је нова количина одговарајућег растварача. Течни екстракти из све три мацерације са истим растварачем су обједињени,

профилтрирани и упарени до сува коришћењем ротационог вакуум упаривача (*IKA RV10, IKA®-Werke GmbH & Co., Germany*).

Добијени суви екстракти чувани су у замрзивачу (-18°C) до тренутка спровођења анализе односно до тренутка примене екстракта.

3.1.4. Анализа екстракта применом танкослојне хроматографије

За прелиминарну фитохемијску анализу екстракта коришћена је танкослојна хроматографија. Танкослојна хроматографија представља раздвајање компоненти смеше на танком слоју адсорбенса под утицајем кретања растварача супротно од смера гравитације. Растварач се креће под дејством капиларних сила и раздваја компоненте смеше на основу њиховог афинитета према стационарној односно мобилној фази. Параметар који се упоређује је ретенциони фактор (R_f вредност) који представља однос пређеног пута једне од компоненти и пређеног пута мобилне фазе.

За танкослојну хроматографију екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* коришћене су *ALUGRAM SIL G/UV 254* плоче (немодификовани силика гел, величина честица 60 Å, специфична површина ~500 m²/g са додатком манганом активираниог цинк силиката као индикатора за UV зрачење) (*Macherey-Nagel, Düren, Nordrhein-Westfalen, Germany*). Као мобилна фаза коришћена је смеша толуена и сирћетне киселине у односу 85:15 која је посебно ефикасна за танкослојну хроматографију екстракта лишајева (54). За изазивање хроматограма, односно за визуелизацију неких од компонената коришћен је раствор 10% сумпорне киселине у дестилованој води уз загревање плоче за танкослојну хроматографију. Сви растварачи коришћени у овом делу истраживања набављени су од компаније *Sigma Aldrich (Burlington, Massachusetts, United States)*.

3.1.5. Анализа екстракта применом високо-ефикасне течне хроматографије

Припрема екстракта за анализу применом високо-ефикасне течне хроматографије (енгл. *High Performance Liquid Chromatography – HPLC*) извршена је тако што су екстракти растворени у метанолу и то 10 mg екстракта у 10 mL метанола односно тако да концентрација буде 1 mg/mL.

За анализу је коришћен хроматографски систем *Agilent 1200 System HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)* са реверзно-фазном хроматографском колоном (C18; 25 cm x 4,6 mm; величина честица 10 µm) и UV спектрофотометријским детектором са опсегом рада од 200-800 nm. Као мобилна фаза коришћен је систем растварача метанол-вода-фосфорна киселина (80:20:0,9 v/v/v), у изократском модалитету рада, док је брзина протока мобилне фазе била 1,0 mL/min. Инјектована количина узорка за анализу била је 10 µL. Овакви хроматографски услови претходно су коришћени у студијама које су се бавиле анализом екстракта лишаја и карактеришу се добрим раздвајањем појединачних пикова на хроматограму (56-58). Сви хроматограми и UV спектри су снимљени на таласној дужини од 254 nm. Вода коришћена у овом експерименту добијена је помоћу *Milli-Q* система за пречишћавање воде (*Milford, MA, USA*), метанол је био HPLC степена чистоће (*Merck, Darmstadt, Germany*), а фосфорна киселина степена чистоће одговарајућег за аналитику (*Sigma Aldrich, Burlington, Massachusetts, United States*). За обраду података добијених хроматографском анализом коришћен је фабрички софтвер за уређаје компаније *Agilent (Agilent OpenLAB CDS Chemstation v.C.01.10, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)*). Све вредности изражене су у маси испитиване супстанце по граму сувог екстракта (mg/g).

3.1.6. Изоловање уснинске киселине

Након HPLC анализе и потврде присуства уснинске киселине у испитиваним екстрактима лишља *Xanthoparmelia stenophylla*, спроведен је раније успостављен поступак изоловања уснинске киселине из екстракта (59). Суви ацетонски екстракт (2000 mg) је растворен у бензену и остављен у фрижидеру на 4°C да се охлади и формира преципитат. Формирани преципитат је филтриран, а остатак на филтер папиру је анализиран коришћењем претходно описане хроматографске процедуре. HPLC анализа је показала да анализирани преципитат садржи две компоненте и то: уснинску киселину као доминантну компоненту и атранорин у мањим количинама. У циљу пречишћавања узорка, фракционисање је изведено на хроматографској колони (силика гел; величина честица < 0,063 mm; 230 mesh), користећи смешу етил ацетата и циклохексана (25:75, v/v) као мобилну фазу. Уснинска киселина је била прва елуирана компонента, а након упаравања је извршена рекристализација у систему растварача етанол-хлороформ. На крају је добијено 80 mg чисте супстанце, степена чистоће од 98,8%. Идентификација супстанце је извршена на основу тачке топљења, спектралних података и поређења хроматограма добијене супстанце са хроматограмом стандарда уснинске киселине (54). Изолована супстанца је чувана на -18°C до спровођења анализа. Сви растварачи коришћени у овом делу истраживања, као и стандард уснинске киселине набављени су од компаније *Sigma Aldrich (Burlington, Massachusetts, United States)*.

3.1.7. Одређивање лимита детекције и лимита квантификације

Лимит детекције (енгл. *Limit of detection* – LOD) и лимит квантификације (енгл. *Limit of quantification* – LOQ) су два важна параметра у валидацији хроматографске методе. LOD се дефинише као најнижа концентрација или количина анализата која се може поуздано детектовати, али не и нужно квантификовати, под наведеним експерименталним условима (60). Такође, може представљати и најмањи сигнал који се може разликовати од позадинског шума. С друге стране, LOQ је најнижа концентрација или количина анализата која се може поуздано измерити и квантификовати са прихватљивом тачношћу и прецизношћу (60) и сматра се мером осетљивости и поузданости аналитичке методе. На одређивање вредности LOD и LOQ могу утицати различити фактори, као што су састав узорка, изабрана методологија детекције и специфичности анализата. Одређивање вредности LOD и LOQ за сваку аналитичку методу је кључно како би се обезбедила прецизна и поуздана квантификација анализата (61, 62).

Вредности LOD и LOQ су одређене према смерницама Интернационалне конференције за хармонизацију техничких захтева за регистрацију фармацеутика за хуману употребу (енгл. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* – ICH), као и на основу претходно описаних метода (63, 64).

Припремљена је серија раствора испитиваних једињења (уснинска киселина, obtусична киселина, леканорна киселина и атранорин), различитих концентрација при чему је за свако од једињења припремљено по седам концентрација. Испитивана једињења су изолована и идентификована у претходним студијама (59, 65, 66), а метанол је био HPLC степена чистоће (*Merck, Darmstadt, Germany*). Ови раствори анализирани су претходно описаном хроматографском техником и забележени су хроматограма. На основу хроматографских података, односно на основу површине испод пика конструисе се график зависности површине испод пика од концентрације и одређује се једначина добијене праве. Поред вредности LOD и LOQ одређују се и коефицијент корелације за

конструисану праву (R^2) односно линеарност, као и опсег концентрација испитиваног једињења.

Вредност LOD се израчунава према **Једначини 1**:

$$LOD = 10 * \frac{\sigma}{k} \quad (1)$$

Вредност LOQ се израчунава према **Једначини 2**:

$$LOQ = 3,3 * \frac{\sigma}{k} \quad (2)$$

У претходним једначинама σ представља стандардну девијацију анализиране групе података, а k нагиб калибрационе криве. Вредности LOD и LOQ се одређиване у следећем опсегу концентрација: 1,56-100 $\mu\text{g/mL}$ за обтусичну киселину и уснинску киселину, 7,81-500 $\mu\text{g/mL}$ за леканорну киселину и 0,78-50 $\mu\text{g/mL}$ за атранорин.

3.1.8. Одређивање укупног садржаја фенолних и флавоноидних једињења у испитиваним екстрактима лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*

Сва мерења у оквиру овог дела истраживања обављена су на спектрофотометру *Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Japan)*.

*3.1.8.1. Одређивање укупног садржаја фенолних једињења у екстрактима лишаја *Xanthoparmelia stenophylla**

Укупна количина растворљивих фенолних једињења у ацетонском, метанолном и п-хексанском екстракту лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* одређена је коришћењем Folin–Ciocalteu (FC) реагенса према претходно коришћеној методи (67). За конструисање калибрационе криве коришћена је серија стандардних раствора галне киселине (25, 50, 100, 200, 400, 500 и 1000 $\mu\text{g/mL}$). Укратко, 50 μL испитиваног екстракта или стандарда се разблажи са 150 μL дестиловане воде, и дода се 1 mL FC реагенса. Након интензивног мешања, смеша се оставља на собној температури 5 минута након чега се додаје 800 μL натријум карбоната (7,5%). Реакциона смеша се оставља у мраку током једног сата ради инкубације. Апсорбанца је мерена на 760 nm, а садржај фенолних једињења изражен је у милиграмима (mg) еквивалената галне киселине по граму сувог екстракта (mg GAE/g сувог екстракта). Садржај фенолних једињења читава се са калибрационе криве која је математички описана **Једначином 3**:

$$\text{Апсорбанца} = 0,0028 * \text{Укупни феноли} + 0,0813 \quad (R^2=0,9984) \quad (3)$$

FC реагенс и гална киселина су произведени од стране фирме *Sigma Aldrich (Burlington, Massachusetts, United States)*.

*3.1.8.2. Одређивање укупног садржаја флавоноида у екстрактима лишаја *Xanthoparmelia stenophylla**

Укупан садржај флавоноида одређен је према претходно описаној методи Худза и сарадника (68). Метода се заснива на реакцији флавоноида са алуминијум-(III)-хлоридом (AlCl_3) при чему се формира комплекс жуте боје. Укратко, 200 μL 10% раствора AlCl_3 у

метанола, 200 μL 1M раствора калијум ацетата и 5,6 mL дестиловане воде додато је у 1 mL раствора испитиваног екстракта или стандарда различитих концентрација (тј. 31,25, 62,5, 125, 250, 500 и 1000 $\mu\text{g/mL}$). После инкубације од 30 минута на собној температури, мерена је апсорбанца на 415 nm у односу на слепу пробу. Рутин и кверцетин су коришћени као стандарди, а резултати су изражени у милиграмима еквивалената кверцетина и милиграмима еквивалената рутина по граму сувог екстракта (mg QE/g сувог екстракта или mg RE/g сувог екстракта). Добијене су две калибрационе криве и то једна са коришћењем кверцетина као стандарда, а друга са коришћењем рутина као стандарда. Наведене калибрационе криве математички су описане **Једначином 4** (за кверцетин) и **Једначином 5** (за рутин).

$$\text{Апсорбанца} = 0,0020 * \text{Укупан садржај флавоноида} + 0,0568 \quad (R^2=0,9975) \quad (4)$$

$$\text{Апсорбанца} = 0,0013 * \text{Укупан садржај флавоноида} + 0,0268 \quad (R^2=0,9981) \quad (5)$$

Алуминијум-(III)-хлорид, калијум-ацетат, рутин и кверцетин су произведени од стране фирме *Sigma Aldrich (Burlington, Massachusetts, United States)*.

3.1.9. Испитивање антиоксидационе активности екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине

Сва мерења у оквиру овог дела истраживања обављена су на спектрофотометру *Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Japan)*. Све супстанце у оквиру овог дела истраживања набављене су од фирме *Sigma Aldrich (Burlington, Massachusetts, United States)*.

3.1.9.1. Одређивање способности неутралисања DPPH радикала

Способност неутралисања слободних радикала је тестирана коришћењем 1,1-дифенил-2-пикрил-хидразил (DPPH) радикала према претходно описаној методи (69).

Прво је припремљен раствор DPPH у метанола у концентрацији од 0,05 mg/mL и чуван у затамњеној боци у фрижидеру до извођења експеримената. Затим је направљена серија стандардних раствора испитиваних екстракта, уснинске киселине и стандарда у метанола (тј. 1000, 500, 250, 125, 62,5 и 31,25 $\mu\text{g/mL}$). У епрувете је сипано 200 μL раствора испитиваних екстракта или стандарда наведених концентрација и 2 mL раствора DPPH. Након интензивног мешања смеша је инкубирана у мраку током пола сата. Након инкубације мерена је апсорбанца раствора на 517 nm у односу на контролу. Аскорбинска киселина, гална киселина, 6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина (Тролокс) и бутил-хидрокситолуен (ВНТ) коришћени су као позитивне контроле. Концентрација DPPH радикала је израчуната према **Једначини 6**:

$$\% \text{ инхибиције} = 100 * \frac{A_k - A_y}{A_k} \quad (6)$$

Ак означава апсорпцију зрачења контроле (која садржи све реагенсе, осим тестираног екстракта или стандарда), а Ау је апсорпција зрачења узорка. На основу добијених вредности конструисана је нелинеарна калибрациона крива која је коришћена за одређивање концентрације испитиваног узорка која инхибира 50% DPPH радикала (IC₅₀) (70).

3.1.9.2. Одређивање способности неутралисања хидроксил радикала

Одређивање способности спречавања неспецифичне пероксидације молекула која је посредована хидроксил радикалима је извршено према претходно описаној процедури (71, 72). Раствори екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине су припремљени у концентрацији од 1 mg/mL након чега је за сваки узорак направљена серија двоструких разблажења. Реагенс за експеримент се припрема мешањем два реагенса непосредно пре употребе. Први реагенс садржи фери-хлорид (100 μ M) и етилендиаминтетрасирћетне киселине (EDTA) (104 mM) у односу 1:1 (v/v). Други реагенс садржи 500 μ L раствора 2-деокси-D-рибозе (5.6 mM) у фосфатном пуферу (50 mM, pH 7,4), 100 μ L воденог раствора аскорбинске киселине (1,0 mM) и 100 μ L воденог раствора водоник-пероксида (1,0 mM). У епрувети се најпре помеша по 200 μ L првог реагенса и другог реагенса након чега се додаје 100 μ L раствора испитиване супстанце. Реакциона смеша се вортексује и остави да инкубира на 50°C током 30 минута. Након инкубације у сваку епрувету додаје се по 1,0 mL раствора тиобарбитурне киселине (1%) и трихлорсирћетне киселине (2,8%), након чега се узорак вортексује и остави да инкубира на 50°C током 30 минута. Степен оксидације 2-деоксирибозе одређује се мерењем апсорбанце на таласној дужини од 532 nm. Аскорбинска киселина, гална киселина, тролокс и ВНТ коришћени су као позитивне контроле. Процент инхибиције хидроксил радикала је израчунат према **Једначини 7**:

$$\% \text{ инхибиције} = 100 * \frac{A_k - A_y}{A_k} \quad (7)$$

Ак означава апсорпцију зрачења контроле (која садржи све реагенсе, осим тестираног екстракта или стандарда), а Ау је апсорбанца узорка. На основу добијених вредности конструисана је нелинеарна калибрациона крива која је коришћена за одређивање концентрације испитиваног узорка која инхибира 50% хидроксил радикала (IC_{50}) (70).

3.1.9.3. Одређивање способности неутралисања супероксид-анјон радикала

Степен неутралисања супероксид-анјон радикала за испитиване екстракте лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинску киселину одређен је према претходно описаној процедури (73) уз одређене модификације. Реакциона смеша састоји се од једнаких запремина раствора нитроплаво-тетразолијума (NBT) (155 mM) и никотинамид-аденин-динуклеотида (NADH) (468 mM) у фосфатном пуферу (0,1 M, pH 7,4). У 2 mL ове смеше додаје се 100 μ L раствора испитиване супстанце у различитим концентрацијама (тј. 1000, 500, 250, 125, 62,5 и 31,25 μ g/mL). Да би реакција отпочела додаје се 100 μ L раствора феназин-метосулфата (60 mM) у фосфатном пуферу (0,1 M, pH 7,4). Смеша се након тога инкубира на собној температури током пет минута. Након инкубације мери се апсорбанца на 560 nm у односу на слепу пробу која уместо раствора испитиване супстанце садржи само растварач. Аскорбинска киселина, гална киселина, тролокс и ВНТ коришћени су као позитивне контроле. Смањење апсорбанце указује на повећану способност неутралисања супероксид-анјон радикала, а проценат инхибиције супероксид-анјон радикала рачуна се према **Једначини 8**.

$$\% \text{ инхибиције} = 100 * \frac{A_k - A_y}{A_k} \quad (8)$$

Ак означава апсорпцију зрачења контроле (која садржи све реагенсе, осим тестираног екстракта или стандарда), а Ау је апсорпција зрачења узорка. На основу добијених

вредности конструисана је нелинеарна калибрациона крива која је коришћена за одређивање концентрације испитиваног узорка која инхибира 50% супероксид-анјон радикала (IC₅₀) (70).

3.1.9.4. Одређивање укупног антиоксидационог капацитета

Укупан антиоксидациони капацитет екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине је одређен коришћењем методе са фосфомолибденском киселином, према претходно описаној процедури (72). Експеримент се заснива на редукцији молибден-(VI) јона у молибден-(V) јон под дејством испитиване супстанце у киселој средини. На крају реакције формира се комплексно једињење молибден-(V) јона и фосфата које је интензивне зелене боје и могуће је одредити његову концентрацију спектрофотометријски. Најпре су направљени шток раствори екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине концентрације 1 mg/mL. Реагенс за експеримент прави се мешањем сумпорне киселине (0,6 M), натријум фосфата (28 mM) и амонијум-молибдата (4 mM). У епрувету се додаје 3 mL наведеног реагенса и 0,3 mL раствора испитиване супстанце након чега се реакциона смеша остави да инкубира на воденом купатилу 90 минута при температури од 95°C. Након инкубације, неопходно је да се реакциона смеша охлади до собне температуре након чега се мери апсорбанца на 695 nm у односу на слепу пробу која уместо раствора испитиване супстанце садржи метанол. Као стандард је коришћена аскорбинска киселина, а укупни антиоксидациони капацитет се изражава као милиграми еквивалената аскорбинске киселине по граму сувог екстракта.

3.1.9.5. Одређивање индекса инхибиције липидне пероксидације

Одређивање степена инхибиције липидне пероксидације спроведено је коришћењем методе са тиоцијанатом, према претходно описаној процедури (72). Најпре су направљени шток раствори екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине концентрације 1 mg/mL од којих је у наредном кораку направљена серија стандардних раствора. Као стандарди коришћени су аскорбинска киселина, гална киселина, тролокс ВНТ и α-токоферол. У наредном кораку припремљена је емулзија линолне киселине и то мешањем по 0,5608 g линолне киселине и емулгатора (Tween-20), а након тога растварањем припремљене мешавине у 100 mL фосфатног пуфера (40 mM, pH=7). Овакав раствор је хомогенизован до формирања стабилне емулзије. Од сваког припремљеног раствора екстракта или уснинске киселине одмеравано је по 0,5 mL и мешано са 2,5 mL претходно припремљене емулзије након чега је додавано још 2 mL фосфатног пуфера. Овако припремљена мешавина је инкубирана током 72 сата, при температури од 37°C. Након инкубације, од сваког узорка одмеравано је по 0,1 mL након чега су додавани 0,1 mL FeCl₂ (20 mM), 0,1 mL амонијум-тиоцијаната (30%) и 4,7 mL етанола (75%). Овако припремљена смеша је мешана 3 минута након чега је мерена апсорбанца на 500 nm. У оквиру контроле уместо раствора узорка или стандарда коришћен је растварач (метанол).

Процент инхибиције пероксидације линолне киселине одређен је према **Једначини 9**:

$$\% \text{ инхибиције} = 100 * \frac{A_k - A_u}{A_k} \text{ (9)}$$

Ак означава апсорпцију зрачења контроле (која садржи све реагенсе, осим тестираног екстракта или стандарда), а Ау је апсорпција зрачења узорка. На основу добијених

вредности конструисана је нелинеарна калибрациона крива која је коришћена за одређивање концентрације испитиваног узорка који смањује липидну пероксидацију за 50% (IC₅₀) (70).

3.1.10. Испитивање антимикробне активности екстраката лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине

3.1.10.1. Испитиване супстанце и микроорганизми

Метанолни, ацетонски и н-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, као и уснинска киселина, растворени су у 10% диметил сулфоксиду (DMSO), а онда додатно разблажени у течной хранљивој подлози. DMSO је набављен од фирме *Acros Organics (Fair Lawn, NJ, USA)*, а ресазурин од фирме *Alfa Aesar GmbH & Co. (KG, Karlsruhe, Germany)*. Антибиотици тетрациклин (*Pfizer Inc., New York, NY, USA*), ампицилин и антимикотици амфотерицин Б (*Sigma Chemicals Co., Burlington, MA, USA*) и флуконазол (*Pfizer Inc., New York, NY, USA*) коришћени су као позитивна контрола. Течна хранљива подлога, Милер-Хинтон бујон (*Торлак, Београд, Србија*) коришћена је за раст бактерија и растварање антибиотика, док је за раст гљива и растварање антимикотика коришћен Sabouraud декстрозни бујон (*Торлак, Београд, Србија*).

Антимикробна активност екстраката и уснинске киселине испитана је на 19 микроорганизма. Експериментом је било обухваћено 15 бактеријских сојева, шест стандардних сојева (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063, and *Escherichia coli* ATCC 25922) и девет изолата (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Salmonella Typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus cereus*). Такође, тестирана су и четири соја гљива, два стандардна соја (*Candida albicans* ATCC 10231 и *Aspergillus niger* ATCC 16888) и два изолата (*Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*).

Сви тестирани изолати набављени су са Института за Јавно здравље у Крагујевцу, док су остали микроорганизми и стандардни сојеви (ATCC, *American Type Culture Collection*) обезбеђени из збирке Лабораторије за микробиологију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу.

3.1.10.2. Припрема суспензија микроорганизма

Суспензије бактерија и гљива припремљене су директним методом у 0,85% стерилном физиолошком раствору. Густина почетне суспензије прилагођена је 0,5 McFarland стандарду употребом дензитометра (*DEN-1, BioSan, Riga, Latvia*). Овако припремљена бактеријска суспензија садржи приближно 10⁸ CFU/mL (енгл. *Colony-forming unit*), док суспензија гљива садржи приближно 10⁶ CFU/mL. Припремљено је разблажење почетне суспензија бактерија у стерилном физиолошком у односу 1:100. Суспензија гљива припремљена је пажљивим скидањем спора са мицелија, а финалне суспензије биле су разблажене у односу 1:1000 у стерилном физиолошком раствору (74).

3.1.10.3. Одређивање антимикробне активности микродилуционом методом

Антимикробна активност испитиваних екстраката *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине одређена је помоћу минималне инхибиторне концентрације (енгл. *Minimum*

inhibitory concentration - MIC) и минималне микробицидне концентрације (енгл. *Minimum microbicidal concentration* - MMC) коришћењем микродилуционе методе са ресазурином.

У сваки бунарић микротитар плоче са 96 бунарића (*Торлак, Београд, Србија*) додато је по 100 μL одговарајуће течне хранљиве подлоге (Милер-Хинтон бујона за бактерије, Sabouraud декстрозног бујона за гљиве). У први ред плоче додато је по 100 μL шток раствора испитиваних екстраката и уснинске киселине, након чега је направљена серија двоструких разблажења (75). Коначне испитиване концентрације биле су у опсегу од 10 до 0,08 mg/mL. У одговарајуће бунариће микротитар плоча је додато по 10 μL суспензије тестираних бактерија и гљива. Раст бактерија и гљива праћен је додавањем ресазурина, индикатора раста микроорганизама. Ресазурин је плава, нефлуоресцентна боја која постаје розе и флуоресцентна када се редукује до ресорурфина у присуству вијабилних ћелија. Овако инокулисане плоче су затим инкубиране на 37°C, 20 сати за бактерије, односно на 28°C, 48 сати за гљиве.

Као позитивна контрола, коришћени су антибиотици тетрациклин, ампицилин и амфотерицин Б, односно антимицотик флуконазол. Уочено је да 10% раствор DMSO не инхибира раст микроорганизама (контрола растварача). Осим тога, сваки експеримент подразумевао је и контролу раста и контролу стерилности. Сви тестови су спроведени у дупликату, а вредности минималних инхибиторних концентрација су биле уједначене.

Минимална инхибиторна концентрација (MIC) представља минималну концентрацију тестираног екстракта односно једињења која инхибира раст микроорганизама, тј. спречава промену боје ресазурина из плаве у розе. Минимална микробицидна концентрација (MMC) представља минималну концентрацију тестираног екстракта односно једињења која је неопходна да би се усмртили микроорганизми. Минимална микробицидна концентрација је одређена тако што је 10 μL узорка из бунарића где није дошло до промене боје индикатора, односно где није забележен раст, засејано на одговарајућу хранљиву подлогу. Након периода инкубације, најнижа концентрација где није дошло до појаве колонија сматра се минималном микробицидном концентрацијом (MMC).

3.1.11. Испитивање антибиофилм активности екстраката лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине

3.1.11.1. Формирање биофилма одабраних бактеријских сојева

Способност бактерија *S. aureus* ATCC 6538 и *P. aeruginosa* да формирају биофилм испитана је кристал виолет методом (76). У микротитар плоче са 96 бунарића за културу ткива (енг. Tissue culture (TC) treated microtiter plates) (*Sarstedt, Nümbrecht, Germany*) додато је по 100 μL Милер-Хинтоновог бујона у сваки бунарић. У сваки ред плоче додато је по 10 μL одговарајуће бактеријске суспензије (10^8 CFU/mL). Како би се омогућило формирање биофилма, плоче су инкубиране на 37°C током 48 часова. Након инкубације, садржај сваког бунарића је отклоњен и испран два пута са 200 μL 0,85% стерилним физиолошким раствором како би се отклониле ћелије које се нису причврстиле за подлогу и нису формирале биофилм.

Бактерије које су формирале биофилм обојене су додавањем кристал виолета (0,1% w/v) (*Fluka AG, Buchs, Switzerland*) у микротитар плочу. Након 20 минута инкубације на собној температури, вишак боје је уклоњен вишеструким испирањем дестилованом водом, а затим је додато по 200 mL 96% етанола, како би ћелије отпустиле везану боју. Оптичка густина (енг. Optical density - OD) одређена је коришћењем ELISA читача за микротитрационе плоче (*RT-2100C, Rayto, Shenzhen, China*) на таласној дужини од 630

nm. Како би се неутралисала позадинска апсорбанца, очитана је оптичка густина стерилне хранљиве подлоге, фиксатива и боје. Израчуната је средња вредност ових оптичких густина и одузета од вредности добијених при читавању. Сви експерименти су урађени у дупликату.

3.1.11.2. Одређивање антибиофилм активности

Антибиофилм активност тестираних екстраката *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине, испитана је кристал виолет методом (76). У микротитар плоче са 96 бунарића за културу ткива (*Sarstedt, Nümbrecht, Germany*) додато је по 100 μL Милер-Хинтоновог бујона у сваки бунарић. По 100 μL тестираног екстракта или уснинске киселине концентрације 20 mg/mL додато је у први ред микротитар плоче, након чега је направљена серија двоструких разблажења. У бунариће је додато по 10 μL свеже припремљене бактеријске суспензије, након чега су плоче инкубиране на 37°C током 48 часова. Садржај сваког бунарића је лагано одстрањен, а бунарићи су испрани 0,85% стерилним физиолошким раствором како би се уклониле ћелије које се нису причврстиле за подлогу. Биофилм је обојен додавањем кристал виолета (0,1% w/v) (*Fluka AG, Buchs, Switzerland*), а након 20 минута инкубације на собној температури, вишак боје је испран дестилованом водом. Како би ћелије отпустиле везану боју, додато је по 200 μL 96% етанола у сваки бунарић. Оптичка густина одређена је коришћењем ELISA читача за микротитрационе плоче (*RT-2100C, Rayto, Shenzhen, China*) на таласној дужини од 630 nm. За неутралисање позадинске апсорбанце, одређена је оптичка густина стерилне хранљиве подлоге, екстракта, фиксатива и боје. Израчуната је средња вредност ових оптичких густина и одузета од вредности добијених при читавању. Антибиотици тетрациклин, ванкомицин, цефтриаксон растворени су у течной хранљивој подлози и коришћени као референтна једињења. Сви експерименти су урађени у дупликату.

3.1.11.3. Процена метаболичке активности биофилма

Ресазурин (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide) је индикатор чија боја зависи од вијабилности ћелија и користити се за процену метаболичке активности биофилма (77). Након инкубације микротитар плоча на 37°C током 48 сати, 10 μL раствора ресазурина је додато у сваки бунарић. Плоче су инкубиране на тамном месту, на 37°C током 3 сата. Оптичка густина је измерена коришћењем ELISA читача за микротитар плоче на таласној дужини од 590 nm. Такође, промена боје из плаво-љубичасте у розе указује метаболичку активност формираног биофилма.

3.1.12. Испитивање антитуморске активности екстраката лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине

3.1.12.1. Културе ћелијских линија

Испитивање антитуморског ефекта екстраката лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине је извршено на четири типа ћелијских линија: хумани карцином дојке (MDA-MB231), аденокарцином грлића материце (HeLa), карцином колона (HCT-116) и хумани нетрансформисани фибробласти плућа (MRC-5). Све наведене ћелијске линије су референтне ћелијске линије добијене из *American Type Culture Collection* (ATCC).

Ћелијске линије MDA-MB231, HeLa, HCT-116 и MRC-5 су култивисане у комплетном хранљивом медијуму у једном слоју. Руковање ћелијским линијама обављено је

биолошком сигурносном кабинету класе II A2 (*Biobase Bioindustry, Shandong, China*). Суспензије ћелијских линија су чуване у течном азоту у криотубама запремине 1 mL до тренутка употребе. Садржај сваке криотубе је пре употребе одмрзнут и растворен у 9 mL комплетног хранљивог медијума (енгл. *Dulbecco's modified Eagle's medium - DMEM*), који је обogaћен додатком 10% топлотом-инактивисаног феталног говеђег серума (*fetal bovine serum - FBS*), L-глутамином (2 mM), неесенцијалним аминокиселинама (0,1 mM), пеницилином (100 IU/mL) и стрептомицином (100 µg/mL). Овако припремљена суспензија ћелија и обogaћеног хранљивог медијума је центрифугирана 15 минута на 300×g.

Након центрифугирања одбачен је супернатант, а преципитиране ћелије су ресуспендоване у 5 mL обogaћеног медијума и пренете у Т-25 посуду. Ћелијске културе су узгајане у инкубатору при стандардним условима за култивацију (влажан ваздух, температура 37°C и 5% CO₂). Када се постигне субконфлуентност приступа се обради ћелија. Прво се уклања хранљиви медијум из посуде, а ћелије испирају фосфатним пуфером и након тога се третирају комбинацијом 0,05 mM EDTA и 0,5 mL 0,25% трипсина како би се одвојио слој ћелија. Овако третиране ћелије се инкубирају два минута у стандардним условима након чега се трипсин неутралише додатком 2,5 mL обogaћеног хранљивог медијума при чему се добија суспензија ћелија.

Од овако припремљене суспензије 1 mL се пребацује у нову Т-25 посуду и додаје се 4 mL обogaћеног хранљивог медијума.

3.1.12.2. Припрема раствора испитиваних екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, уснинске киселине и стандарда

Раствори испитиваних екстраката лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, уснинске киселине и доксорубицина су припремљени у концентрацији од 100 mg/mL у DMSO. Овако припремљени раствори чувани су у фрижидеру на 4°C до тренутка употребе. Раствори су разблаживани до испитиваних концентрација непосредно пре употребе и то додатком омогаћеног хранљивог медијума. Концентрација DMSO у испитиваним растворима није била већа од 0,1%.

3.1.12.3. МТТ тест

Ефекат испитиваних екстраката лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на вијабилност ћелијских линија MDA-MB231, HeLa, HCT-116 и MRC-5 испитан је коришћењем МТТ теста према претходно описаној методи (78).

Све наведене ћелијске линије засејане су на микротитар млочу са 96 бунарића и то у концентрацији од 3×10^3 ћелија по бунарићу и инкубиране су током ноћи.

Након инкубације супернатант је замењен са растворима испитиваних екстраката и уснинске киселине и то у 7 различитих концентрација (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 и 100 µg/mL), док је обogaћени хранљиви медијум коришћен као негативна контрола. Као позитивна контрола коришћен је доксорубицин у истим концентрацијама као и испитивани екстракти и уснинска киселина.

Након инкубације током ноћи што се сматра нултим тренутком и након периода инкубације од 24, 48 и 72 сата обogaћени хранљиви медијум или испитивани раствори су одбацивани, а ћелије су третиране раствором МТТ у концентрацији од 0,5 mg/mL у фосфатном пуферу. Након инкубације у трајању од 2 сата у сваки бунарић је додато по 150 µL DMSO у циљу растварања формираних кристала формазана. Микротитар плоче су пажљиво мешане на шејкеру пет минута након чега је прочитана вредност оптичке густине на читачу за микротитар плоче (*MRC UT-2100c, Holon, Israel*) при таласној

дужини од 550 nm. Сваки експеримент је поновљен три пута у квадрилику како би се осигурала тачност резултата.

3.1.12.4. Параметри цитотоксичности

Резултати МТТ теста се изражавају као проценат у односу на вредности контролних узорака за које се арбитрално узима да је вредност 100%. Степен цитотоксичности (C(%)) за испитиване екстракте и уснинску киселину се израчунава према **Једначини 10**.

$$C(\%) = \frac{(A_0 - A) * 100}{A_0} \quad (10)$$

A_0 представља вредност апсорбанције код контролних узорака, а A представља вредност апсорбанције након третмана.

За одређивање опште инхибиторне активности коришћен је параметар IC_{50} који се дефинише као концентрација испитиваног агенса која је неопходна да се биолошка активност испитиваних ћелија смањи за 50%

Индекс селективности се израчунава као однос IC_{50} вредности испитиваних екстраката и уснинске киселине према нетрансформисаној ћелијској линији (MRC-5) и малигним ћелијским линијама (MDA-MB231, HeLa, HCT-116).

Индекс селективности мањи од 2 указује да испитивана супстанца испољава неспецифичну (генералну) токсичност, индекс селективности преко 2 указује да испитивана супстанца испољава селективну токсичност, док индекс селективности преко 3 указује да испитивана супстанца испољава изразито селективну токсичност (79). Вредности GI_{50} , TGI и LC_{50} су израчунате за сваки од испитиваних екстраката и уснинску киселину у складу са водичима Националног института за истраживање малигних болести (National Cancer Institute - NCI).

Вредност потенцијала инхибиције раста (енгл. *Growth inhibitory potential* - GI_{50}) представља концентрацију испитиване супстанце при којој важи **Једначина 11**:

$$\frac{100 * (T - T_0)}{(C - T_0)} = 50 \quad (11)$$

У наведеној једначини T_0 представља вредност апсорбанције у нултом тренутку односно непосредно након додавања испитиване супстанце, а T представља апсорбанцију након 24, 48 и 72 сата изложености ћелија испитиваној супстанци. Параметар C представља измерену оптичку густину у контролном бунарићу.

Вредност укупне инхибиције раста (енгл. *Total growth inhibition* - TGI) представља концентрацију испитиване супстанце при којој важи **Једначина 12**:

$$\frac{100 * (T - T_0)}{(C - T_0)} = 0 \quad (12)$$

У наведеној једначини T_0 представља вредност апсорбанције у нултом тренутку односно непосредно након додавања испитиване супстанце, а T представља апсорбанцију након 24, 48 и 72 сата изложености ћелија испитиваној супстанци. Параметар C представља измерену оптичку густину у контролном бунарићу.

Вредност леталне концентрације 50 (енгл. *Lethal concentration 50* - LC₅₀) представља концентрацију испитиване супстанце при којој важи **Једначина 13**:

$$\frac{100*(T-T_0)}{(C-T_0)} = -50 \quad (13)$$

У наведеној једначини T₀ представља вредност апсорбанције у нултом тренутку односно непосредно након додавања испитиване супстанце, а T представља апсорбанцију након 24, 48 и 72 сата изложености ћелија испитиваној супстанци. Параметар C представља измерену оптичку густину у контролном бунарићу.

Уколико добијене вредности наведених параметара нису у испитиваном опсегу концентрација, њихова вредност је израчена као мања од најмање испитиване концентрације односно већа од највеће испитиване концентрације.

Коначне вредности исхода експеримента изражене су као средња вредност ± стандардна девијација. За израчунавање наведених параметара цитотоксичности (IC₅₀, GI₅₀, TGI и LC₅₀) коришћена је бесплатна апликација за Microsoft Office Excel ED₅₀ plus v1.0 (доступно на <http://www.sciencegateway.org/protocols/cellbio/drug/data/>).

3.2. Испитивање кардиопротективног ефекта екстракта лишаја

Xanthoparmelia stenophylla и уснинске киселина на моделу

доксорубицином изазване кардиотоксичности

У оквиру другог дела дисертације, испитивани су кардиопротективни ефекти екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и дибензофуранског једињења - уснинске киселине, као главног секундарног метаболита испитиваних екстраката, на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности, као и потенцијални механизми кардиопротективног дејства. На основу фитохемијске карактеризације испитиваних екстраката, укупног садржаја фенолних и флавоноидних једињења и њиховог антиоксидационог потенцијала одређеног у *in vitro* условима, за рад са експерименталним животињама одабран је ацетонски екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* као екстракт са најизраженијим антиоксидационим потенцијалом.

3.2.1. Анимални протокол

3.2.1.1. Етички аспекти

Све анализе, процедуре и експерименти који укључују коришћење лабораторијских животиња или анималног биолошког материјала у овој студији одобрене су од стране Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Србија (Број одлуке 01-7540). Такође, све експерименталне процедуре изведене су у складу са директивом Европске уније 86/609/EES за заштиту животиња које се користе у експерименталне и друге научне сврхе, Европском директивом 2010/63/EU за добробит лабораторијских животиња и према етичким принципима Добре лабораторијске праксе (енгл. *Good Laboratory Practice* - GLP).

3.2.1.2. Дизајн студије

У оквиру другог дела истраживања коришћени су одрасли *Wistar albino* пацови мушког пола, старости 6-8 недеља, телесне масе 200-250 g. Све животиње су чуване у строго контролисаним условима (температура $22 \pm 2^\circ\text{C}$, циклус светлости:тама 12:12 часова), док су вода и храна били доступни у довољној количини да их животиње конзумирају према потреби (*ad libitum*). Животиње су насумично разврстане у осам група са по десет животиња и то:

1. Контролна група (CTRL), здраве животиње - без третмана (n=10),
2. Група животиња третирана раствором натријум-карбоксиметилцелулозе у концентрацији од 1% (СМС) (n=10),
3. Група животиња којима је доксорубицином (DOX) изазвана кардиотоксичност (n=10),
4. Група животиња третирана раствором натријум-карбоксиметилцелулозе у концентрацији од 1% (СМС + DOX) у периоду 28 дана, након којег им је доксорубицином изазвана кардиотоксичност (n=10),
5. Група животиња третирана уснинском киселином (UA) у периоду од 28 дана (n=10),
6. Група животиња третирана уснинском киселином (UA + DOX) у периоду 28 дана, након којег им је доксорубицином изазвана кардиотоксичност (n=10),
7. Група животиња третирана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* (E), у периоду од 28 дана (n=10),
8. Група животиња третирана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* (E + DOX) у периоду 28 дана, након којег им је доксорубицином изазвана кардиотоксичност (n=10).

На почетку експерименталног протокола животињама је измерен крвни притисак и урађена је ехокардиографска дијагностика у циљу праћења промене ових параметара на крају експерименталног протокола (методе су детаљније описане у **Поглављу 3.2.2.**).

3.2.1.3. Изазивање кардиотоксичности применом доксорубицина

Животиње које су према планираном експерименталном протоколу припадале групама DOX, СМС + DOX, UA + DOX и E + DOX третиране су доксорубицином 28 дана након почетка експерименталног протокола, а у циљу изазивања кардиотоксичности. Доксорубицин је набављен у облику доксорубицин-хидрохлорида припремљеног у облику раствора за инфузију концентрације 2 mg/mL (*Ebewe Pharm ES.M.V.H NFG. KG, Unterach, Austria*). Изазивање кардиотоксичности применом доксорубицина подразумева примену кумулативне дозе доксорубицина од 15 mg/kg телесне тежине пацова. Ова доза показала се као ефикасна у изазивању кардиотоксичности у претходним истраживањима (80). Доксорубицин се примењивао инјектовањем у интраперитонеални простор. Како би све животиње имале исти третман у групама код којих није било предвиђено изазивање кардиотоксичности животињама је убризгана адекватна запремина физиолошког раствора.

3.2.1.4. Третман животиња ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*

Животиње које су према планираном експерименталном протоколу припадале групама Е и Е + DOX третиране су ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* током периода од 28 дана. Екстракт је за примену припреман тако што је растваран у минималној количини раствора натријум-карбоксиметилцелулозе. Количина раствора екстракта неопходног за примену гаважом одређивана је на основу телесне тежине животиње на дан примене тако да доза буде 125 mg/kg телесне тежине животиње.

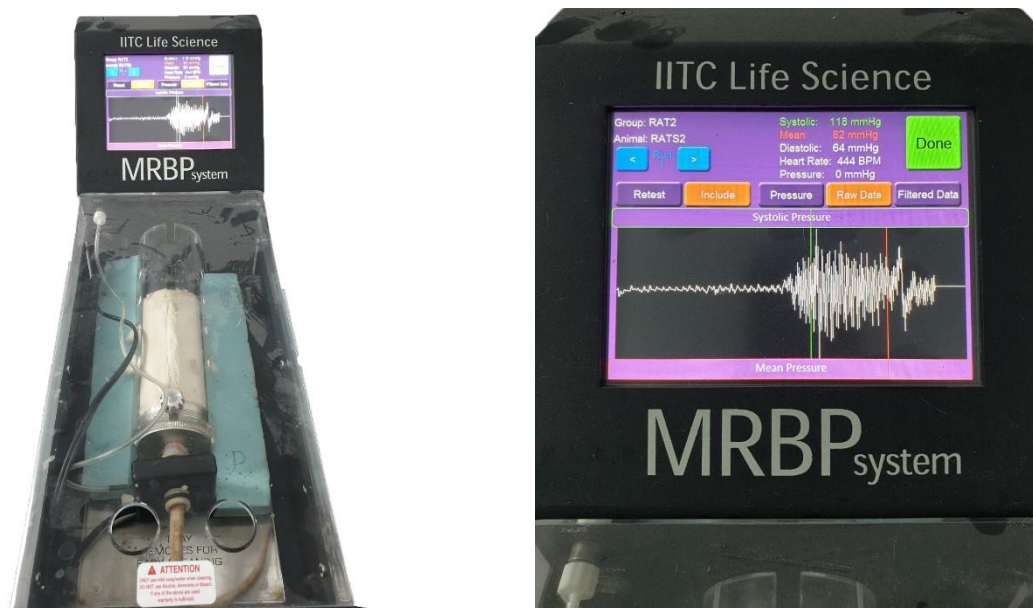
3.2.1.5. Третман животиња уснинском киселином

Животиње које су према планираном експерименталном протоколу припадале групама UA и UA + DOX третиране су уснинском током периода од 28 дана. Уснинска киселина је за примену припремана тако што је растварана у минималној количини раствора натријум-карбоксиметилцелулозе. Количина раствора уснинске киселине неопходног за примену гаважом одређивана је на основу телесне тежине животиње на дан примене тако да доза буде 25 mg/kg телесне тежине животиње.

3.2.2. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на хемодинамске параметре и параметре функције срца *ex vivo*

3.2.2.1. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на крвни притисак

На самом почетку експерименталног протокола (нултог дана), свим животињама измерен је систолни и дијастолни крвни притисак, као и срчана фреквенца методом репне плетизмографије, и то коришћењем неинвазивног система за мерење крвног притиска са репном манжетном, при чему се преко репног сензора региструје крвни притисак унутар крвног суда (*Rat Tail Cuff Method Blood Pressure Systems (MRBP-R)*, IITC Life Science Inc., Los Angeles, CA, USA; **Слика 3**). Пошто није постојала разлика у вредностима систолног и дијастолног крвног притиска и срчане фреквенце на почетку истраживања закључено је да су групе хомогене. Исти поступак поновљен је и на дан жртвовања експерименталних животиња (31. дан) како би се испитао утицај свих примењених супстанци на ове параметре. Мерење крвног притиска свим пацовима спроведено је у минимално 5 понављања, а резултати су изражени као средња вредност свих мерења са стандардном девијацијом.



Слика 3: Мерење крвног притиска и срчане фреквенце код пацова, употребом апарата *Rat Tail Cuff Method Blood Pressure Systems (MRBP-R)*, IITC Life Science Inc., Los Angeles, CA, USA

3.2.2.2. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишља *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на ехокардиографске параметре леве коморе

Утицај примене ацетонског екстракта лишља *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на *in vivo* функцију миокарда код експерименталних животиња процењен је применом поступка трансторакалне ехокардиографије. У циљу провере хомогености група све животиње су подвргнуте овом поступку пре почетка експерименталног протокола (0. дана) и на крају експерименталног протокола (31. дана) непосредно пре жртвовања животиња. Пре почетка експерименталног протокола није утврђено постојање разлике у испитиваним параметрима међу групама чиме је потврђена хомогеност група. Ехокардиографија је извршена применом ултразвучног апарата за мале експерименталне животиње *Hewlett-Packard Sonos 5500* (Andover, Massachusetts, USA; **Слика 4**). Пре ехосонографског прегледа животиње су анестезиране применом комбинованог анестетичког препарата ксилазина (5 mg/kg) и кетамина (75 mg/kg) интраперитонеално. Подешавање уређаја за рад било је следеће: 2D модалитет снимања у дугој парастерналној оси, фреквенција сонде 15,0 MHz, курсор у М модалитету рада постављен је перпендикуларно на интервентрикуларни септум и задњи зид леве коморе (LV) у нивоу папиларних мишића. Мерена је вредност следећих параметара:

- дебљина зида интервентрикуларног септума на крају систоле (IVSs),
- дебљина зида интервентрикуларног септума на крају дијастоле (IVSd),
- унутрашњи димензија леве коморе (LV) на крају систоле (LVIDs)
- унутрашња димензија LV на крају дијастоле (LVIDd),
- дебљина задњег зида LV на крају систоле (LVPWs) и
- дебљина задњег зида LV на крају дијастоле (LVPWd).

Вредности свих наведених параметара изражени су у милиметрима (mm).

Фракционо скраћење израчуната је из М-модалитета рада курсора према **Једначини 14** и изражава се у процентима (FS%):

$$FS=100 \times \frac{(LVIDd-LVIDs)}{LVIDd} \quad (14)$$

Ејекциона фракција се такође изражава у процентима (EF%), а израчуната је према *Teicholz* формули (81), где LVESV и LVEDV представљају ендсistolни и енддијастолни волумен леве коморе, респективно (**Једначини 15**).

$$EF=100 \times \frac{(LVEDV-LVESV)}{LVEDV} \quad LVESV = \frac{(7 \times LVIDs)}{(2.4 \times LVIDs)} \quad LVEDV = \frac{(7 \times LVIDd)}{(2.4 \times LVIDd)} \quad (15)$$



Слика 4: Ехокардиографски уређај за мале експерименталне животиње, *Hewlett-Packard Sonos 5500 (Andover, Massachusetts, USA)*

3.2.2.3. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на параметре функционисања срца *ex vivo*

Један аспект кардиопротективних ефеката ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине испитан је одређивањем кардиодинамских параметара методом по *Langendorff*-у. Метода се заснива на континуираном перфундовању изолованог срца експерименталне животиње темперираним (37°C) *Krebs-Henseleit*-овим раствором. Овај раствор има оптималан однос свих састојака (јона и нутријената) који су неопходни за екстракорпорално функционисање миокарда (82). Супстанце коришћене у овом делу испитивања набављене су од компаније *Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, Burlington, Massachusetts, United States)*. Поред тога у резервоару се раствор континуирано обогаћује гасном смешом кисеоника (95%) и угљен-диоксида (5%). Перфузија миокарда адекватно припремљеним раствором обавља се преко каниле која се пласира кроз аорту. Постоје различити протоколи испитивања функционисања изолованих животињских миокарда методом по *Langendorff*-у, али је за потребе овог истраживања одабрана процедура ауторегулације односно испитивање функције миокарда уз константан проток и промену перфузионог притиска у распону од 40-120 центиметара воденог стуба (cmH₂O) након стабилизације функције миокарда на притиску од 70 cmH₂O (83). Мерење се понавља на задатим вредностима (40, 60, 80, 100 и 120 cmH₂O) два пута при чему се први период сматра контролним, а други експерименталним.

Након изоловања, срце животиње поставља се на уређај за ретроградно перфундовање, док се у леву комору убацује сензор (*Transducer BS4 73-0184, Experimentaria Ltd, Budapest, Hungary*), који након периода стабилизације срца директно и континуирано прати параметре функције леве коморе (Табела 2):

Табела 2: Параметри функционисања срца *ex vivo*

Параметар	Ознака	Мерна јединица
Максимална стопа промене притиска у левој комори	dp/dt max	mmHg/s
Минимална стопа промене притиска у левој комори	dp/dt min	mmHg/s
Систолни притисак леве коморе	SLVP	mmHg
Дијастолни притисак леве коморе	DLVP	mmHg
Срчана фреквенца	HR	bpm
Легенда: mmHg/s – милиметар живиног стуба у секунди; mmHg/s – милиметар живиног стуба; bpm – енгл. <i>Beats per minute</i> – број откуцаја срца у минути		

Подаци о свим наведеним параметра се из сензора прослеђују до рачунара опремљеног софтвером *Spel Advanced HaemoSys v. 3.24* који је намењен континуираном праћењу свих параметара у реалном времену и њиховој накнадној обради.

Вредност коронарног протока (CF) одређивана је флуометријски односно прикупљањем коронарног венског ефлуента током експеримента, а вредност је изражена као запремина ефлуента прикупљена у јединици времена (mL/min). Коронарни венски ефлуент је прикупљен на различитим перфузионим притисцима у опсегу од 40-120 cmH₂O. За сваку тачку прикупљања ефлуента забележени су и претходно наведени кардиодинамски параметри.

3.2.3. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на параметре оксидационог стреса у крви, ефлуенту и ткиву миокарда

По завршетку експерименталног протокола 31. дана односно трећег дана од примене доксорубицина све животиње су анестезиране применом комбинованог анестетичког препарата ксилазина (5 mg/kg) и кетамина (75 mg/kg) интраперитонеално и жртвоване поступком декапитације након ехокардиографског испитивања. У току жртвовања прикупљене су две епрувете крви и то један узорак пуне крви у епрувету са натријум-цитратом као антикоагулансом и други узорак у епрувету са гелом за сепарацију серума. Узорак пуне крви је центрифугиран (3000 rpm, 10 минута) у циљу одвајања крвних елемената од плазме. По одвајању плазме еритроцити су испирани са троструко већом запремином физиолошког раствора при чему је поступак поновљен три пута. На крају се у испране еритроците додаје ледено хладна дестилована вода након чега се узорак вортексује у циљу добијања лизата еритроцита. Сви узорци су подељени у аликвоте мањих запремина и чувани на температури од -20°C до спровођења анализа.

Серум је коришћен за одређивање концентрација срчаних ензима и одређивање параметара инфламације ELISA методом, плазма је коришћена за одређивање системских прооксидационих параметара (индекса липидне пероксидације мереног као TBARS, супероксид-анјон радикала ($\text{O}_2^{\cdot-}$), нитрита (NO_2^-) и водоник-пероксида (H_2O_2)), док је лизат еритроцита коришћен за одређивање концентрације ензима који су укључени у систем антиоксидационе заштите (каталазе (CAT), супероксид-дисмутазе (SOD) и редукованог глутатиона (GSH)). Сва мерења у оквиру овог дела истраживања су спроведена на спектрофотометру *Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Japan)*, а хемикалије су набављене од компаније *Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, Burlington, Massachusetts, United States)*.

3.2.3.1. Спектрофотометријско одређивање прооксидационих параметара (TBARS, $\text{O}_2^{\cdot-}$, NO_2^- и H_2O_2)

Реактив за одређивање индекса липидне пероксидације представља раствор тиобарбитурне киселине (1%) у базној средини која се обезбеђује натријум-хидроксидом. Експеримент се изводи тако што се у коничне микротубе отпипетира 400 μL узорка плазме и 200 μL трихлоретанске киселине (28%). Следећи корак подразумевао је инкубацију на -20°C у трајању од 10 минута, након чега су микротубе центрифугиране (10 минута, 15000 обртаја у минути). Запремина од 400 μL супернатанта који се одвојио након центрифугирања је помешана са 100 μL претходно припремљеног реактива у стакленим епруветама. Реакциона смеша је инкубирана на воденом купатилу (100°C) у трајању од 15 минута, а након тога је хлађена на собној температури у трајању од 10 минута. Мерење апсорбанце вршено је на таласној дужини од 530 nm у односу на слепу пробу која је уместо узорка садржала дестиловану воду.

Припрема реактива за одређивање супероксид-анјон радикала подразумева мешање 0,1 mM EDTA, 0,1 mM NBT, 0,1 mg/mL желатина и 50 mM пуфера који чине хлороводонична киселина и трис(хидроксиетил)-аминометан (TRIS). При самом одређивању меша се 950 μL претходно припремљеног реактива и 50 μL узорка плазме. Мерење апсорбанце врши се на 550 nm и то током три минута при чему се на сваких 60 секунди врши мешање реакционе смеште. Мерење апсорбанце врши се у односу на слепу пробу која уместо узорка плазме садржи дестиловану воду.

Концентрација азот-мооксида мерена је посредно, односно одређивањем концентрације нитрита у узорку. За одређивање концентрације нитрита користи се *Griess*-ов реагенс

који чине једнаке запремине (125 μL) сулфанилне киселине (1%) и N-(1-нафтил)етилендиамин дихидрохлорида (NEDA). Мешањем ових супстанце добија се комплексно једињење љубичасте боје. Приликом извођења експеримента у коничне микротубе додају се редом: перхлорна киселина (100 μL), EDTA (20 mM, 400 μL) и узорак плазме (200 μL). Овако припремљена смеша се вортексује и инкубира на -20°C у трајању од 15 минута, а потом се центрифугира (10 минута, 6000 обртаја у минуту). Настали супернатант се одлива, а у преципитат се додаје калијум-карбонат (220 μL). У нове епрувете пипетира се екстракт преципитата (200 μL), Griess-ов реагенс (250 μL) и пуфер (амонијачни пуфер, pH=9, 125 μL). Након инкубације на собној температури у трајању од 15 минута мери се апсорбанца на 550 nm у односу на слепу пробу која уместо узорка садржи дестиловану воду.

Реакциону смешу приликом одређивања водоник пероксида (H_2O_2) чине редом узорак плазме (200 μL), фенол-црвено (PRS) (800 μL) и пероксидаза рена (енгл. *Horseradish peroxidase* - POD) (10 μL). POD се додаје на крају као иницијатор реакције. Мерење апсорбанце врши се на таласној дужини од 610 nm у односу на слепу пробу која уместо узорка садржи еквивалентну запремину дестиловане воде.

3.2.3.2. Спектрофотометријско одређивање параметара који су укључени у систем антиоксидационе заштите (CAT, SOD и GSH)

Одређивање каталазе, ензима неопходног за неутралисање насталог водоник-пероксида, одвија се у два корака. У првом кораку врши се предприпрема лизата еритроцита за даљи експеримент и то тако што се помешају лизат еритроцита (50 μL), етанол (100 μL) и дестилована вода (10 mL). У нове коничне микротубе отпипетира се пуфер за каталазу (20 mM EDTA, 50 μL), претходно припремљен лизат еритроцита (100 μL) и водоник-пероксид (20 mM, 1 mL). Реакција се прати кинетички на таласној дужини од 230 nm, при чему се за сваки узорак мери апсорбанца у шест тренутака у једнаким временским интервалима. Коначан резултат се израчунава по шеми.

Одређивање ензима SOD се врши тако што се припреми следећа реакциона смеша. Лизат еритроцита (100 μL) се меша са адреналином (100 μL) у присуству карбонатног пуфера (1 mL). Апсорбанца се мери на таласној дужини од 470 nm у односу на слепу пробу која уместо узорка садржи дестиловану воду.

Одређивање концентрације редукованог глутатиона (GSH) заснива се на редокс карактеристикама овој једињења и одвија се у два корака. У првом кораку неопходно је припремити преципитациони пуфер који садржи натријум-хлорид, натријумову со EDTA и метафосфорну киселину. Припремљени преципитациони пуфер (385 μL) се меша са узорком лизата еритроцита (50 μL) и раствором EDTA (0,1%, 100 μL). Овако припремљена смеша остави се да инкубира на -20°C у трајању од 15 минута, након чега су центрифугирани (10 минута, 4000 обртаја у минуту). На овај начин се, у виду супернатанта, добија екстракт лизата еритроцита. У другом кораку одмерава се екстракт лизата еритроцита (300 μL) и меша са раствором натријум-хидрогенфосфата (750 μL) и раствором 5,5-дитиобис-6,2-нитробензојеве киселине (DTNB, 100 μL). Овако припремљена реакциона смеша се остави да инкубира на собној температури у трајању од 10 минута, након чега се мери апсорпција зрачења узорка на таласној дужини од 420 nm у односу на слепу пробу, која уместо узорка садржи слепу пробу. У циљу израчунавања концентрације GSH врши се формирање калибрационе криве мерењем апсорбанце раствора стандарда GSH у серији познатих концентрација.

3.2.3.3. Спектрофотометријско одређивање параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту

У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента при сваком од испитиваних вредности перфузионог притиска спектрофотометријски су одређени биолошки маркери оксидационог стреса: индекс липидне пероксидације мерен као TBARS, супероксид-анјон радикал ($O_2^{\cdot-}$), нитрити (NO_2^-) и водоник-пероксид (H_2O_2). За одређивање су коришћене процедуре описане у **Поглављу 3.2.3.1.** уз модификацију да се уместо узорка серума користи коронарни венски ефлуент и да се као слепа проба користи *Krebs-Henseleit*-ов раствор уместо дестиловане воде.

3.2.3.4. Спектрофотометријско одређивање параметара оксидационог стреса у хомогенату ткива миокарда

Након завршетка испитивања функције миокарда *ex vivo* методом по *Langendorff*-у срце је пажљиво уклоњено са каниле и одвојен је један део миокарда за испитивање параметара оксидационог стреса у самом ткиву миокарда. Узорак миокарда чуван је на $-80^\circ C$ до извођења експеримента. Узорак за анализу припремљен је тако што је одмерено 300 μg ткива миокарда, додато је 3 mL фосфатног пуфера и вршена је хомогенизација коришћењем механичког ротационог хомогенизатора. Након хомогенизације сви узорци су центрифугирани 15 минута на 6000 обртаја и при температури од $4^\circ C$. Након центрифугирања одвојен је супернатант који је у даљем току експеримента коришћен као узорак.

Одређени су следећи параметри: индекс липидне пероксидације мерен као TBARS, супероксид-анјон радикал ($O_2^{\cdot-}$), нитрити (NO_2^-), водоник-пероксид (H_2O_2), каталаза (CAT), супероксид-дисмутаза (SOD) и редуковани глутатион (GSH). За одређивање су коришћене процедуре описане у **Поглављима 3.2.3.1.** и **3.2.3.2.** уз модификацију да се уместо узорка серума и лизата еритроцита користи супернатант ткивног хомогената. Резултати су изражени у односу на масу ткива миокарда.

3.2.4. Испитивање утицаја примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на биохемијске маркере срчане функције и маркере инфламације

Прикупљање узорака крви и њихова припрема за даљу анализу претходно је описана у **Поглављу 3.2.3.**

Из узорака серума одређена је концентрација одговарајућих срчаних ензима, С-реактивног протеина (као системског маркера инфламације) и различитих проинфламаторних (интерлеукин-1 α (IL-1 α) и интерлеукин-8 (IL-8)) и антиинфламаторних (интерлеукин-4 (IL-4), интерлеукин-10 (IL-10) и трансформишући фактор раста β (TGF- β)) цитокина карактеристичних за Th1 и Th2 имунски одговор. Сви наведени параметри одређени су имуноензимским тестом високе осетљивости и селективности (енгл. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA). Ова метода је одабрана због могућности одређивања ниских концентрација специфичних антигена у узорцима серума експерименталних животиња. За извођење ове методе набављени су комерцијално доступни китови компатибилни са антигенима присутним у серуму пацова произвођача.

Sandwich ELISA је један од назаступљенијих типова ензимског имуносорбентног теста код кога се у основи циљани антиген фиксира између два антитела – антитела за хватање (*Capture antibody*) и антитела за детекцију (*Detection antibody*). Антитело за детекцију је

обично коњуговано са ензимом и то најчешће пероксидазом пореклом из рена (енгл. *Horseradish peroxidase* – HRP) и додаје се на крају експеримента пре одређивања концентрације циљаног антигена. Цео експеримент спроводи се у микротитар плочи са 96 бунарића која је обично унапред превучена слојем антитела за хватање. Конкретни кораци у анализи зависе од упутства произвођача за конкретан кит, али су следећи кораци обично саставни елементи сваког од протокола:

1. Припрема стандарда у серији опадајућих двоструких или логаритамских разблажења. Стандарди су неопходни да би се конструисала калибрациона крива и одредила концентрација циљаног антигена у узорку. Поред тога стандарди нам на крају експеримента указују на то да је цела процедура адекватно спроведена.
2. Припрема узорака, обично серума, тако што се разблажују у одговарајућем односу према упутству произвођача (обично у опсегу 4-100 пута).
3. Додавање стандарда и узорака у преинкубирану микротитар плочу при чему се сваки од њих додаје у дупликату. Након додавања узорака и стандарда следи период инкубације.
4. Испирање плоче (аутоматско или мануелно) коришћењем пуфера за испирање (*Wash buffer*). Пуфер за испирање садржи површински активне материје и овај корак има за циљ да уклони антигене који се нису везали за антитело за хватање. Запремина пуфера за испирање, као и број понављања поступка испирања дефинисани су упутством произвођача.
5. Након испирања неопходно је осушити микротитар плочу, али такође треба водити рачуна да бунарићи не остану суви у дужем временском периоду.
6. Додавање антитела за детекцију и инкубација. Инкубација се обично спроводи на собној температури или на 37 °C у инкубатору. Трајање инкубације дефинисано је упутством произвођача.
7. Испирање микротитар плоче (као у корацима 4 и 5)
8. Након поновног испирања у бунариће се додаје ензим коњугован са стрептавидином који ће се везати за биотиниловано антитело за детекцију.
9. Инкубација (према упутству произвођача) и испирање микротитар плоче (као у корацима 4 и 5) у циљу уклањања антитела која нису везала коњугат стрептавидина и HRP.
10. Додавање хромофорног супстрата и то у највећем броју случајева триметилбензидин (ТМВ) који доводи до појаве плаве боје у бунарићима, при чему интензитет обојености директно зависи од концентрације антигена присутне у узорку.
11. Додавање раствора за заустављање реакције (*Stop solution*) који је обично нека јака киселина (хлороводонична (HCl) или сумпорна (H₂SO₄)) при чему долази до промене боје из плаве у жуту.
12. Мерење апсорбанце или оптичке густине узорка на одговарајућим таласним дужинама (обично 450 nm или 492 nm) коришћењем одговарајућег ELISA читача (*Auto Microplate reader (MRC VT 2100C, Holon, Israel; Слика 5)*)
13. Обрада података која подразумева конструисање калибрационе криве на основу измерених концентрација антигена у бунарићима где су се налазили стандарди, одређивање концентрације антигена у испитиваним узорцима и статистичка анализа.



Слика 5: ELISA читач (*Auto Microplate reader (MRC VT 2100C, Holon, Israel)*) (A); Изглед микротитар плоче по додавању раствора за заустављање реакције и промени боје из плаве у жути (Б)

3.2.4.1. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на активност срчаних ензима

На почетку експерименталног протокола свим животињама узет је узорак крви из репне вене у циљу издвајања серума, одређивања концентрације срчаних ензима у серуму и утврђивања хомогености група. Узорковање крви за добијање серума на крају експерименталног протокола претходно је описано у делу 3.2.3. Из серума експерименталних животиња по завршетку протокола одређена је концентрација С-реактивног протеина ((CRP) (ng/mL) Rat hs-CRP (High Sensitivity C-Reactive Protein) ELISA kit (*FineTest, Wuhan, China*)), лактат-дехидрогеназе ((LDH) (ng/mL) Rat Rat LDH α (L-lactate dehydrogenase A chain) ELISA kit (*FineTest, Wuhan, China*)), креатинфосфокиназе МВ ((CK-MB) (pg/mL) Rat CK-MB (Creatine kinase MB isoenzyme) ELISA kit (*FineTest, Wuhan, China*)) и тропонина I ((TnI) (pg/mL) Rat Tn-I/TNNI3 (cardiac troponin I) ELISA kit (*FineTest, Wuhan, China*)). Сви наведени параметри одређени су применом комерцијалних китова према упутству произвођача.

3.2.4.2. Испитивање утицаја примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на маркере инфламације

У циљу испитивања утицаја примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на маркере инфламације коришћени су узорци серума добијени из крви животиња приликом жртвовања као што је описано у делу 3.2.3. Измерене су концентрације различитих проинфламаторних (интерлеукин-1 α (IL-1 α) и интерлеукин-8 (IL-8)) и антиинфламаторних (интерлеукин-4 (IL-4), интерлеукин-10 (IL-10) и трансформишући фактор раста β (TGF- β)) цитокина карактеристичних за Th1 и Th2 имунски одговор. Све анализе урађене су према упутству произвођача.

Како би се проценио утицај примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на Th1 имунски одговор праћена је серумска концентрација проинфламаторних цитокина IL-1 α (pg/mL) и IL-8 (pg/mL) применом следећих комерцијалних китова заснованих на претходно описаној sandwich ELISA методи:

- Rat IL-1 α ELISA Kit (*Cloud - Clone Corporation, Katy, Texas, USA*)
- Rat IL-8 ELISA Kit (*AbClonal, Woburn, Massachusetts, USA*)

Како би се проценио утицај примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на Th2 имунски одговор праћена је серумска концентрација антиинфламаторних цитокина IL-4 (pg/mL) и IL-10 (pg/mL) применом следећих комерцијалних китова заснованих на претходно описаној *sandwich* ELISA методи:

- Rat IL-4 ELISA Kit (*Elabscience, Wuhan, China*)
- Rat IL-10 ELISA DuoSet (*R&D systems, Minneapolis, Minnesota, USA*)

Одређивање IL-10 разликовало се од одређивања свих других интерлеукина пошто је за одређен коришћен сет, а не комерцијални кит што значи да микротитар плоча са 96 бунарића није била унапред припремљена већ је у припреми експеримента у празне бунариће додавано примарно *capture* антитело, након чега је следила инкубација у трајању од 12 часова у инкубатору на 37°C, заштићено од светлости. Након овакве припреме плоче следила је процедура која је у складу са поступком описаним у **Поглављу 3.2.4.** Додатну разлику представља и неопходност додавања агенаса који ће спречити неспецифично везивање антигена за антитело (говећи серумски албумин у концентрацији од 0,1%)

Поред наведених интерлеукина у циљу праћења утицаја примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на функцију миокарда праћена је и концентрација TGF- β (pg/mL) који се карактерише антиинфламаторним својствима и растом у случају постојања ремоделовања ткива миокарда. Концентрација TGF- β је одређена применом комерцијалног кита Rat TGF- β ELISA Kit (*Elabscience, Wuhan, China*) заснованог на претходно описаној *sandwich* ELISA методи.

3.2.5. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на патохистолошке карактеристике ткива миокарда

Након завршетка експерименталног протокола описаног у **Поглављу 3.2.2.3.**, срца су уклоњена са система за ретроградну перфузију, измерена им је маса, а затим је свако срце пресечено на две половине, али тако да у оквиру сваког исечка постоје лева и десна половина срца. Тако припремљени исечци су затим обрађени и припремљени за даљу хистолошку анализу. Исечци срца су најпре фиксирани у 4% неутралном параформалдехиду на собној температури током 24 часа. Након фиксације извршена је дехидратација ткива срца третманом у растућим концентрацијама етанола (70%, 96% и 100%). Потом је извршено посветљавање ткива у ксилолу, док су на крају тако обрађени узорци потопљени у парафин. Температура парафина у тренутку потапања ткива била је у опсегу 56 – 60°C што представља оптималну температуру за импрегнацију парафином јер не доводи до појаве деструктивних промена на ткиву. Ткива срца су након импрегнације укалупљена у парафинске блокове. Коришћењем ротационог микротоме, од укалупљених узорка ткива добијени су пресеци ткива срца дебљине 5 μ m. Овако исечени узорци ткива пренети су у водено купатило загрејано на температуру од 45°C, да би се утврдило да је пресек ткива репрезентативан, без одсечених ивица и без набора након чега су они узорци који задовољавају критеријуме одмах монтирани на плочицу. Овако припремљени узорци остављени су да се осуше на собној температури током 24 часа. Узорци третирани на наведени начин сматрају се припремљеним за бојење различитим хистолошким методама.

3.2.5.1. Испитивање ефеката примене екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на ткиво миокарда- бојење хематоксилин-еозин методом

Ткивни пресеци срца свих животиња обојени су стандардном и најчешће коришћеном хистолошком методом хематоксилин/еозин (Н/Е) у циљу верификације морфолошких промена. Овом методом једра се боје тамно плавом до црном бојом, док се цитоплазма боји розе до бледо љубичастом бојом. Протокол је био следећи: непосредно пре започињања бојења, плочиће са ткивним пресецима су стављене у термостат у трајању од 45 минута на 56°C да се загреју. Након тога је уследило урањање плочица у ксилол 2 пута у трајању од по 5 минута, рехидратација ткива са потапањем плочица у опадајуће концентрације алкохола (2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу (100%), 5 минута у 96% алкохолу и 5 минута у 70% алкохолу). Након рехидратације уследило је испирање плочица дестилованом водом у трајању од 5 минута. Потом су плочице уроњене у раствор хематоксилина (*Mayer*-ов хематоксилин) током 5 минута, испране дестилованом водом, након чега су уроњене у 2% раствор еозина у трајању од 3 минута. Уследило је испирање плочица дестилованом водом, поновна дехидратацију ткива урањањем плочица у растуће концентрације алкохола (70%, 96%, 100%), просветљавање у ксилолу (2 пута по 5 минута) и финално фиксирање ткива, монтирањем покровних стакала на плочице коришћењем DPX-а (мешавина дистирена и ксилена) (*Sigma-Aldrich, Co., USA*).

3.2.5.2. Испитивање ефеката примене екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на фиброзу миокарда и садржај колагена применом *Picrosirius red* методе

Метода бојења *Picrosirius red* коришћена је за детекцију колагених влакана у срчаном ткиву, што је од интереса за процену ефеката примене одабраних екстракта на срчану фиброзу изазване применом доксорубицина. У овој методи, колагена влакна боје се црвено, док се мишићна влакна и цитоплазма боје жуто а једра црном бојом. Протокол подразумева депарафинизацију и рехидратацију ткива срца према на претходно описани начин (**Поглавље 3.2.5.1.**). Након рехидратације, плочице се урањају у раствор *Weigerts*-овог хематоксилина у трајању од 5 минута потом се испирају у дестилованој води у трајању од 10 минута и поново урањају у раствор *PicroSirius Red*-а у трајању од 60 минута. Након тога је уследило испирање у дестилованој води у трајању од 10 минута, затим урањање плочица у 2% раствор глацијалне сирћетне киселине 2 пута по 5 минута. Уследила је дехидратација ткивних пресека урањањем плочица у 96% алкохол 2 пута у трајању од 5 минута и у 100% алкохол 2 пута у трајању од 5 минута, просветљивње у ксилолу 3 пута у трајању од 5 минута. Ткивни пресеци су фиксирани DPX-ом за покровна стакла, и остављени да се суше 24 часа на собној температури. Сви препарати ткива су посматрани и снимани дигиталном камером причвршћеном на светлосни микроскоп (*Olympus BX51*) на увељичању 200x и 400x. Садржај колагених влакана анализиран је у програму *Image Pro-Plus programs* (*Media Cybernetics, USA*). Анализа је извршена на 10 различитих пресека срчаног ткива по животињи. Резултати су представљени у процентима.

3.2.6. Испитивање утицаја примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на релативну експресију гена укључених у оксидациони стрес, апоптозу и инфламацију у левој комори срца

3.2.6.1. Испитивани гени

Супероксид дисмутаза у организму глодара је ензим који спада у класу оксидоредуктаза и задужен је за трансформисање супероксид-анјон радикала до кисеоника и водоник-пероксида у реакцији диспропорционисања. Због свог ефекта овај ензим представља један од најважнијих елемената система антиоксидационе заштите. Постоје три изоформе овог ензима при чему су изоформе 1 и 2 интрацелуларне, а изоформа 3 је смештена екстрацелуларно. Бакар-цинк (Cu-Zn) зависна супероксид дисмутаза која се означава и као SOD-1 кодирана је SOD-1 геном који се налази на хромозому 21 и по синтетисању депонује се у цитоплазми. Манган (Mn) зависна супероксид дисмутаза, позната и као SOD-2 кодирана је геном SOD-2 који се налази на хромозому 6. Након синтезе SOD-2 се депонује у митохондријама. И SOD-1 и SOD-2 активирају се у случају потребе за неутралисањем ROS као главних генератора оксидационог стреса (84). Овај пут инактивисања ROS је од изузетног значаја и у контексту кардиопротективног дејства јер у основи доксорубицин индукује кардиотоксичност повећањем оксидационог стреса.

Ендотелна азот моноксид синтаза (eNOS) је ензим који је смештен у ендотелу крвних судова и одговоран је за синтезу азот монооксида (NO). Синтеза eNOS кодирана је геном NOS3 који се налази на хромозому 4. У физиолошким условима eNOS доводи до синтезе азот монооксида, малог молекула са бројним повољним ефектима на срце и крвне судове од којих се издвајају вазодилатација, регулација пролиферативних и апоптотских процеса и антиоксидациона заштита преко индуковања повећане активности ензима SOD-1 и SOD-2. У случају повећаног присуства ROS, долази до разлагања димерних комплекса eNOS, након чега долази до продуковања супероксид-анјон радикала. У претходним студијама показано је да неке супстанце са антиоксидационим ефектом делују тако што индукују фосфорилацију eNOS чиме се спречава разлагање димерних облика индуковано доксорубицином, а последично се смањује продукција ROS и апоптоза кардиомиоцита (85, 86).

Bcl-2 је један од наважнијих регулаторних протеина који су укључени у процес апоптозе и представља један од најчешће проучаваних антиапоптотских система код сисара. Кодираан је геном BCL2 који се код пацова налази на хромозому 3. Након синтезе функционални протеин смешта се у близини мембране митохондрија где у садејству са другим протеинима врши контролу процеса апоптозе. Претходне студије показале су значајну нисходну регулацију BCL2 гена што опет указује на то да је апоптоза индукована оксидационим стресом односно насталим ROS у случају доксорубицином изазване кардиотоксичности (87, 88).

Bcl-2 удружени протеин X (Bax) је регулаторни протеин који је блиско повезан са индукцијом апоптозе. Код пацова овај протеин кодиран је BAX геном који се налази на хромозому 1. У случају доксорубицином изазване кардиотоксичности примећена је значајна усходна регулација BAX гена различитим механизмима (89, 90).

Каспазе представљају групу протеолитичких ензима који имају значајну улогу у програмираној ћелијској смрти. За потребе овог истраживања испитан је утицај примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на експресију гена за каспазу-3 и каспазу-9. Каспаза-3 је протеин који је код пацова кодиран геном Casp3 који је лоциран на хромозому 16, док је каспаза-9 протеин кодиран геном Casp9 који је лоциран на хромозому 5. Каспаза-9 има улогу у иницијацији апоптозе, док каспаза 9 има улогу у егзекуцији апоптозе. Неколико студија показало је да је активност

ових ензима, као и експресија гена који их кодирају повећана код пацова третираних доксорубицином (91-93).

Нуклеарни транскрипциони фактор Б (енгл. *nuclear factor kappa-light-chain - enhancer of activated B cells*, NF-κB) јесте протеински комплекс и је један од најважнијих фактора у брзом одговору ћелија на спољашње стресне стимулусе као што су оксидациони стрес, продукција цитокина, слободни радикали, радијација итд. Синтеза протеинског комплекса NF-κB код пацова је кодирана геном *Nfkb1* који је лоциран на хромозому 2. Као убиквитарни транскрипциони фактор NF-κB утиче на продукцију цитокина, транскрипцију ДНК, као и ћелијско преживљавање. Претходне студије показале су да долази до значајне повећане експресије NF-κB код пацова код којих је кардиотоксичност изазвана применом доксорубицина (94, 95).

Фактор некрозе тумора α (енгл. *Tumor necrosis factor alpha*, TNF-α) је цитокин са проинфламаторним ефектима који се најчешће продукује у моноцитима и макрофагима. Синтеза TNF-α кодирана је геном *Tnf* који је лоциран на хромозому 20. Литературни подаци указују да долази до значајног повећања експресије *Tnf* гена у ткиву миокарда код животиња третираних доксорубицином (96).

Интерлеукини су разнородна група цитокинских молекула који имају веома важну улогу у регулисању функционисања имунског система, али и у олакшавању комуникације међу ћелијама које учествују у имунском одговору. Интерлеукини су од огромног значаја за координисање функције различитих ћелија у току процеса инфламације, ћелијске пролиферације, као и активације специфичних функција имунског система. Постоји више од 40 различитих интерлеукина и они се уопштено могу поделити на проинфламаторне интерлеукине који стимулишу имунски одговор организма и антиинфламаторне интерлеукине који супримирају имунски одговор. Претходне студије показале су промене у нивоу интерлеукина 1, интерлеукина 10 и интерлеукина 17 у случају доксорубицином индиковане кардиотоксичности (25, 97, 98).

Интерлеукин-1 (IL-1) је један од најважнијих проинфламаторних цитокина који се продукује у многим ћелијама које су укључене у имунски одговор (моноцити, макрофаги, дендритске ћелије, итд.). Синтеза IL-1 кодирана је генима *Il1a* и *Il1b* који су лоцирани на хромозому 3.

Интерлеукин-6 (IL-6) је мултифункционални цитокин који је укључен у различите функције имунског система. Овај интерлеукин продукују и ћелије имунског система какве су моноцити и Т ћелије, али и ћелије које нису примарно укључене у имунски одговор какве су фибробласти, адипоцити или хепатоцити. Синтеза IL-6 кодирана је геном *Il6* који је лоциран на хромозому 13.

Интерлеукин-10 (IL-10) је један од најважнијих анти-инфламаторних и имunosупресивних цитокина. Продукују га доминантно ћелије имунског система, а нарочито регулаторне Т ћелије. Синтеза IL-10 кодирана је геном *Il10* који је лоциран на хромозому 4.

Интерлеукин-13 (IL-13) је цитокин који има различите улоге у активацији и контролисању имунског одговора, али за сада још увек не постоји сагласност око тога да има доминантно проинфламаторну или антиинфламаторну улогу. Такође, постоје подаци да је укључен у процес обнављања оштећених ткива и процесу фиброзе. Синтеза IL-13 кодирана је геном *Il13* који је лоциран на хромозому 10.

Интерлеукин-17 (IL-17) је један од најважнијих проинфламаторних цитокина који се првенствено продукује у Th17 ћелијама. Синтеза IL-17 кодирана је геном *Il17a* који је лоциран на хромозому 9.

3.2.6.2. Одређивање релативне експресије гена

Употребом методе ланчане реакције полимеразе (енгл. *Polymerase chain reaction* - PCR) уз коришћење одговарајућих прајмера (**Табела 3**) одређена је релативна експресија гена укључених у апоптозу (Bcl-2, Вах, Cas-3, Cas-9), оксидациони стрес (SOD-1, SOD-2, eNOS) и инфламацију (NF-κB, TNFα, IL-6, IL-10, IL-13). Процедура одређивања релативне експресије гена из ткива одвија се у следећа три корака:

1. Изолација РНК из ткива миокарда - Ткива миокарда намењена за PCR анализу прикупљена су по завршетку експерименталног протокола одређивања кардиодинамских параметара методом по *Langendorff*-у. Први корак у изолацији РНК подразумевао је уситњавање ткива, након чега је оно третирано TRIzol реагенсом (комбинација фенола и гуанидин-изотиоцијаната) који разара ћелије и омогућава издвајање присутне РНК. По додавању хлороформа дошло је до раздвајања фаза, а за даљи ток експеримента одвојена је и сачувана водена фаза. За пречишћавање укупне РНК из леве коморе ткива миокарда употребљен је кит за изолацију РНК (*Extractme Total RNA kit, Bliirt S.A., Gdansk, Poland*), према упутству произвођача. Након пречишћавања за сваки узорак РНК измерена је добијена концентрација (ng/μL) и степен чистоће РНК коришћењем спектрофотометра уз адаптер за мерење малих запремина (*BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer with Take3 plate adapter (Agilent, Santa Clara, California, USA)*).
2. Реверзна транскрипција (превођење изоловане информационе РНК у комплементарну (једноланчану) ДНК (сDNA) – За реверзну транскрипцију изоловане РНК употребљен је комерцијални комплет (*iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA*) према упутству произвођача. Комерцијални комплет садржи смешу реагенса (нуклеотиди, неспецифични прајмери и др.) који су неопходни са синтезу сDNA од узорка изоловане РНК из ткива миокарда.
3. Квантитативна полимеразна ланчана реакција у реалном времену (енгл. *Real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR*) – За RT-qPCR коришћен је комерцијални комплет *SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)* према упутству произвођача. Поред тога коришћен је и узорак комплементарне ДНК добијен у претходном кораку, као и специфични, комерцијално доступни прајмери (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) чије су секвенце наведене у Табели 5, док је као housekeeping ген коришћен β-актин. Поступак RT-qPCR као и снимање флуоресценције обављено је помоћу уређаја *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)*, а добијени подаци накнадно су анализирани коришћењем програма *Microsoft Excel for Windows* верзија 2016 (*Microsoft, Redmond, Washington, USA*). Релативна експресија гена израчуна та је према $2^{-\Delta\Delta C_t}$ методи коришћењем **Једначина 16** и **17** (99):

$$\Delta C_t = C_t (\text{гена од интереса}) - C_t (\text{housekeeping гена}) \quad (16)$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{доксорубицином изазвана кардиотоксичност}) - \Delta C_t (\text{здрavo срце}) \quad (17)$$

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = \text{релативна промена нивоа експресије гена од интереса у доксорубицином изазваној кардиотоксичности у односу на контролу}$$

За сваки узорак узимана је средња вредност дупликата мерења, док је релативна експресија РНК за сваки узорак представљена као количник експресије гена од интереса и експресије *housekeeping* гена (β-актина).

Табела 3: Прајмери коришћени за RT-qPCR процедуру.

маркер	Леви прајмер (forward)	Десни прајмер (reverse)
Референтни (housekeeping) ген		
<i>β-актин</i>	GATCAGCAAGCAGGAGTACGAT	GTAACAGTCCGCCTAGAAGCAT
Гени укључени у апоптозу		
<i>Bax</i>	GCTACAGGGTTTCATCCAGGAT	ATGTTGTTGTCCAGTTCATCGC
<i>Bcl-2</i>	GCAAAGCACATCCAATAAAAGCG	GTACTTCATCACGATCTCCCGG
<i>Cas-3</i>	GGAAGATCACAGCAAAAGGAGC	GCAGTAGTCGCCTCTGAAGAAA
<i>Cas-9</i>	TGTACTCCAGGGAAGATCGAGA	CGTTGTTGATGATGAGGCAGTG
Гени укључени у оксидциони стрес		
<i>SOD-1</i>	TGAAGAGAGGCATGTTGGAGAC	CACACGATCTTCAATGGACACA
<i>SOD-2</i>	AATCAACAGACCCAAGCTAGGC	CACAATGTCACTCCTCTCCGAA
<i>eNOS</i>	GAGGGAGTCAGCCTAAATCCTG	ATCAAAGCATAACGAAGAGGGCA
Гени укључени у инфламацију		
<i>IL-10</i>	GCAAGAGATCCTGGTCCTGAAG	AGGTCTCTGTTTAGGACGCATG
<i>NF-κB</i>	GTTTGGTTTGAGACATCCCTGC	CTGTCTTATGGCTGAGGTCTGG
<i>TNFα</i>	GAAAGCATGATCCGAGATGTGG	CAGGAATGAGAAGAGGCTGAGG
<i>IL-6</i>	GATACCACCCACAACAGACCAG	GTGCATCATCGCTGTTCATACA
<i>IL-13</i>	GCAAGTGTCTGAAGCAGSTATG	TCTGTCAGCCTCAAAGAACAGG

β-актин – *housekeeping* ген; *Bax* – *Bcl-2* повезани протеин X; *Bcl-2* – Б-ћелијски лимфом 2; *Cas-3* – каспаза 3; *Cas-9* – каспаза 9; *SOD-1* – супероксид димутаза 1; *SOD-2* – супероксид димутаза 2; *eNOS* – ендотелна азот-моноксид синтетаза; *IL-10* –интерлеукин 10; *NF-κB* –нуклеарни транскрипциони фактор капа Б; *TNFα* – фактор некрозе тумора α; *IL-6* –интерлеукин 6; *IL-13* –интерлеукин 13

3.3. Снага студије и величина узорка

Укупан број експерименталних животиња одређен је коришћењем софтвера G Power, а сам прорачун заснован је на резултатима претходно публикованих студија (80, 91, 92). За прорачун је коришћен двострани t-тест за везани узорак, уз претпоставку алфа грешке од 0,05 и снаге студије 0,8 (бета грешка 0,2)

Узимајући у обзир резултате досадашњих истраживања, укупан број експерименталних животиња, *Wistar Albino* пацова, је прорачунат на 64. С обзиром да може доћи до искључивања неких експерименталних животиња из студије, укупан број животиња прерачунат је на 80.

3.4. Статистичка обрада и анализа података

Статистичка обрада података спроведена је коришћењем софтверског пакета *IBM Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS, IBM Corp., Armonk, NY, USA)*, верзија 23.0 за оперативни систем *Windows*. За обраду података и креирање графикона коришћени су софтвери *Microsoft Excel for Windows* верзија 2016 (*Microsoft, Redmond, Washington, USA*) и *GraphPad Prism* верзија 9 (*GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA*). За представљање хемијских структура коришћен је софтвер *ChemOffice Ultra* верзија 12.0 (*PerkinElmer, Inc., Waltham, Massachusetts, USA*). Најпре је извршена процена нормалности расподеле података коришћењем Shapiro-Wilk и Kolmogorov-Smirnov теста, као и конструисањем нормалног QQ графикона и хистограма. У зависности од природе варијабле и нормалности расподеле података за испитивање постојања разлика

међу групама коришћен је одговарајући параметарски (Т-тест независних узорака, упарени Т-Тест, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе са одговарајућим *post hoc* тестовима (*Tukey HSD* и *Bonfferoni*)) или непараметарски (Ман-Витнијев У-тест, Вилкоксон тест, Краскал-Волисов тест) тест. За поређење категоријских варијабли коришћени су Хи-квадрат тест или Фишеров тест тачне вероватноће. За испитивање повезаности међу варијаблама (корелације) коришћени су Пирсонов или Спирманов тест корелације. Вредности $p < 0,05$ сматрале су се статистички значајним, а вредности испитиваних параметара су дате као средња вредност (M) \pm стандардна девијација (SD).

IV РЕЗУЛТАТИ

4.1. Припрема и фитохемијска карактеризација екстракта лишаја

Xanthoparmelia stenophylla и испитивање њихове биолошке

активности

4.1.1. Принос екстракције

Приликом екстракције лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* коришћена су три различита растварача и то ацетон, метанол и *n*-хексан. Добијена су три различита екстракта: ацетонски екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* (АЕ), метанолни екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* (МЕ) и *n*-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* (ХЕ). Подаци о приносу за добијене екстракте приказани су у Табели 4.

Табела 4: Принос екстракције лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* коришћењем ацетона, метанола и *n*-хексана као растварача.

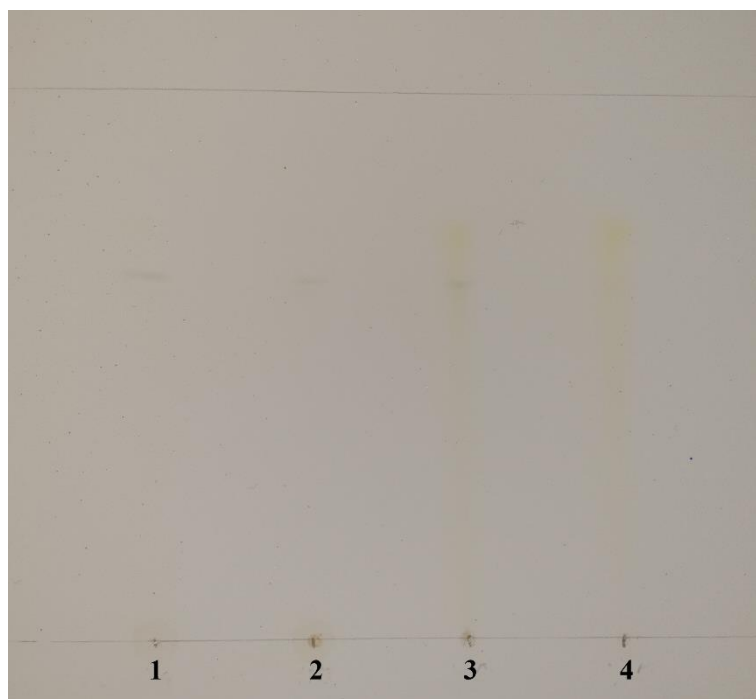
Екстракт	Растварач	Маса сувог лишаја (g)	Маса добијеног сувог екстракта (g)	Принос (%)
АЕ	Ацетон	20,00	1,01	5,05
МЕ	Метанол	20,00	0,422	2,11
ХЕ	<i>n</i> -хексан	20,00	0,182	0,91

АЕ – ацетонски екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; МЕ - метанолни екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; ХЕ - *n*-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*

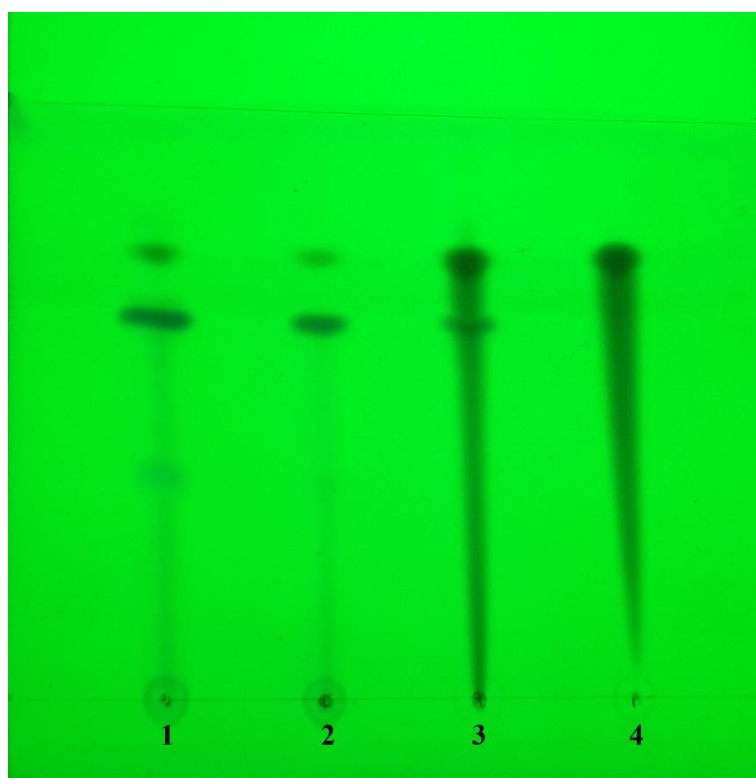
Уочава се да је највећи принос остварен коришћењем ацетона као растварача за екстракцију. Принос је 2,5 пута већи у поређењу са метанолом односно више од 6 пута већи у поређењу са *n*-хексаном као растварачима коришћеним за екстракцију.

4.1.2. Анализа екстракта применом танкослојне хроматографије

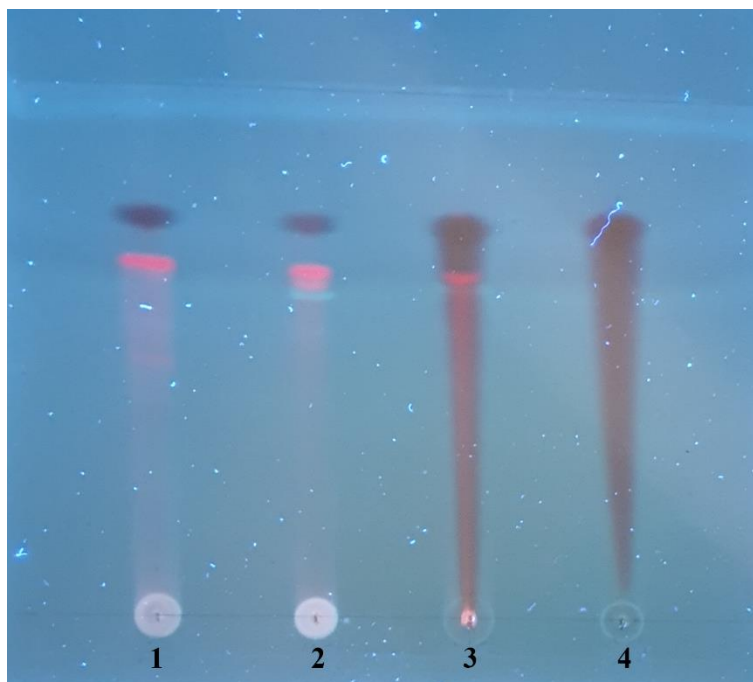
Танкослојна хроматографија представља методу избора када је у питању прелиминарна фитохемијска анализа различитих екстраката дрога, па тако и лишајева. У претходних пола века различити растварачи и смеше растварача су коришћени у развијању хроматограма екстраката лишајева, али се смеша толуена и сирћетне киселине (85:15, *v/v*) издвојила као посебно ефикасна. Након развијања хроматограма мрље су биле слабо уочљиве, па се приступило изазивању хроматограма и то тако што је коришћен 10% раствор сумпорне киселине, након чега је плоча за танкослојну хроматографију загревана на 105°C током пет минута. Након изазивања хроматограма уочена је појава мрља. TLC хроматограм након анализе ацетонског, метанолног и *n*-хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине представљен је на Слици 6. Исти хроматограм посматран под UV светлости таласних дужина 254 nm и 365 nm представљен је на Слици 7 и Слици 8. Може се уочити преклапање појава мрље која потиче од уснинске киселине у сваком од анализираних екстраката са ретенционим фактором од 0,76, као и мрља која потиче од леканорне киселине на ретенционом фактору од 0,64.



Слика 6: TLC хроматограм након анализе ацетонског (1), метанолног (2) и п-хексанског (3) екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине (4)



Слика 7: TLC хроматограм након анализе ацетонског (1), метанолног (2) и п-хексанског (3) екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине (4) при посматрању под UV светлошћу таласне дужине 254 nm



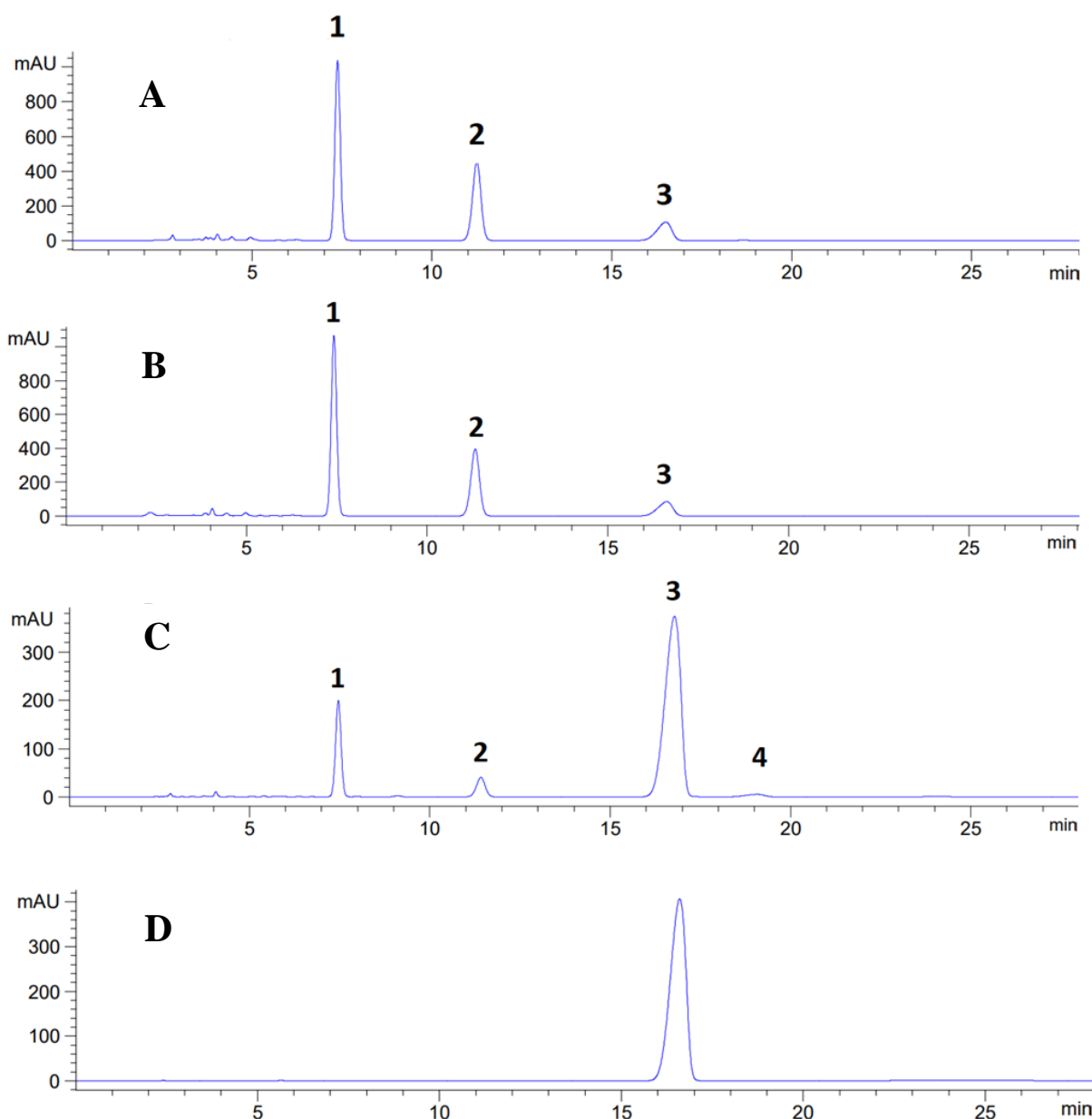
Слика 8: TLC хроматограм након анализе ацетонског (1), метанолног (2) и n-хексанског (3) екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине (4) при посматрању под UV светлошћу таласне дужине 265 nm

4.1.3. Анализа екстракта применом високо-ефикасне течне хроматографије

Хроматограми испитиваних екстракта (АЕ, МЕ и ХЕ) и изолованог секундарног метаболита уснинске киселине су представљени на **Слици 9**. На основу хроматограма, уочава се да АЕ и МЕ имају три главне компоненте и то: леканорну киселину, обтусичну киселину и уснинску киселину, док се код ХЕ уочава и четврта компонента која је идентификована као атранорин.

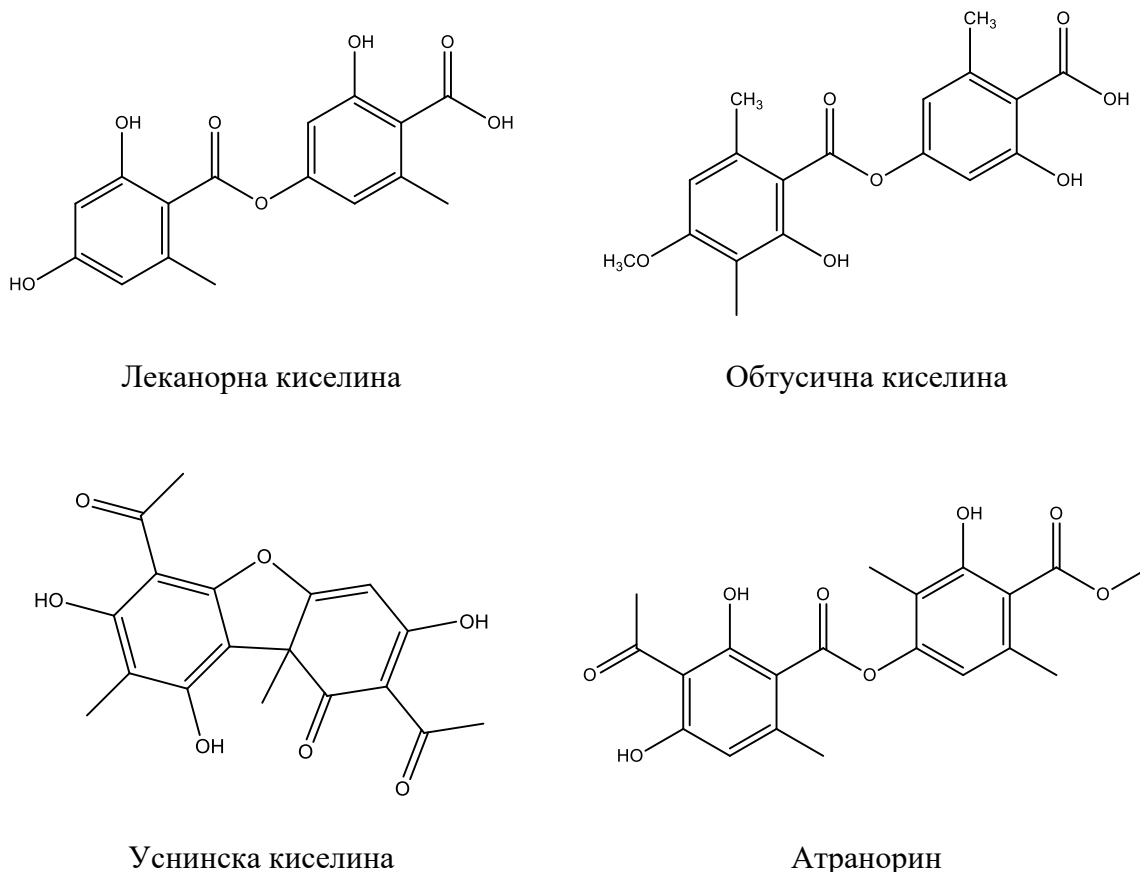
Леканорна киселина је секундарни метаболит лишајева специфичне депсидне структуре, која је идентификована у сва три испитивана екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*. Леканорна киселина је идентификована на приближно истим ретенционим временима ($t_R = 7,42 \pm 0,02$ min), али је садржај леканорне киселине био различит у различитим екстрактима. Највиша концентрација леканорне киселине забележена је у АЕ (4,0%), затим у МЕ (3,0%) и најнижа концентрација у ХЕ (1,7%). Атранорин и обтусична киселина су такође једињења депсидне структуре, али се међусобно разликују по супституентима.

У ХЕ најзаступљеније једињење било је уснинска киселина идентификована на ретенционом времену $t_R = 16,78 \pm 0,02$ min и то у концентрацији од 58,7%. Такође, уснинска киселина се од претходних идентификованих једињења разликује по томе што има дибензофуранску структуру.



Слика 9: HPLC хроматограми ацетонског, метанолног и n-хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и изолованог једињења уснинске киселине. А – хроматограм ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* снимљен на таласној дужини од 254 nm; В – хроматограм метанолног екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* снимљен на таласној дужини од 254 nm; С – хроматограм n-хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* снимљен на таласној дужини од 254 nm; D – хроматограм уснинске киселине изоловане из лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* снимљен на таласној дужини од 254 nm. 1 – леканорна киселина; 2 – обтусична киселина; 3 – уснинска киселина; 4 – атранорин.

Структуре идентификованих секундарних метаболита представљене су на **Слици 10**, док су детаљни подаци о ретенционим временима, апсорпционим максимумима и концентрацији идентификованих једињења представљени у **Табели 5**.



Слика 10: Структурне формуле идентификованих секундарних метаболита у екстрактима лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*.

Табела 5: Ретенциона времена, апсорпциони максимуми и садржај идентификованих секундарних метаболита

Једињење	Ретенционо време ($t_R \pm SD$) [*] (min)	Апсорпциони максимуми (nm)	Садржај (mg/g сувог екстракта)		
			Екстракт		
			АЕ	МЕ	ХЕ
Леканорна киселина	7,42 ± 0,02	213, 270, 304	39,96	29,68	17,45
Обтусична киселина	11,41 ± 0,01	212, 278, 312	24,96	28,87	2,61
Уснинска киселина	16,78 ± 0,02	234, 282	44,47	48,52	587,33
Атранорин	19,07 ± 0,01	210, 252, 262, 320	НД	НД	15,25

АЕ – ацетонски екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; МЕ - метанолни екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; ХЕ - n-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; НД – није детектовано; Вредности ретенционих времена су дате као средње вредности ± стандардна девијација из три мерења.

Присуство наведених секундарних метаболита лишајева у испитиваним екстрактима потврђено је поређењем ретенционих времена и апсорпционих максимума са стандардима добијеним из следећих биолошких извора: леканорна киселина из лишаја *Melanelia subaurifera*, обтусична киселина из лишаја *Physcia semipinnata*, атранорин из

лишаја *Evernia prunastri*, док су за уснинску киселину коришћена два стандарда – један комерцијално доступан произвођача *Sigma Aldrich* док је други изолован из лишаја *Usnea barbata*. Сви претходно наведени стандарди који су изоловани из лишајева изоловани су приликом рада у нашој лабораторији, а њихова структура потврђена је на основу спектралних података (59, 65, 66).

4.1.4. Лимит детекције и лимит квантификације

Лимит детекције (LOD) и лимит квантификације (LOQ) одређени су за коришћену хроматографску методу, као и за сваки од идентификованих секундарних метаболита појединачно. Једначина праве, линеарност, опсег линеарности, лимит детекције и лимит квантификације за хроматографску методу коришћену за анализу једињења идентификованих у екстрактима лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* представљени су у Табели 6.

Табела 6: Једначина праве, линеарност, опсег линеарности, лимит детекције и лимит квантификације за хроматографску методу коришћену за анализу једињења идентификованих у екстрактима лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*

Једињење	Једначина праве	Линеарност (R ²)	ОЛ (µg/mL)	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Леканорна киселина	Y=20,435*X-6,494	0,9998	7,81-500	3,025	9,167
Обтусична киселина	Y=11,502*X-2,052	0,9993	1,56-100	0,590	1,787
Уснинска киселина	Y=2,468*X+0,233	0,9999	1,56-100	1,177	3,566
Атранорин	Y=3,175*X+1,569	0,9998	0,78-50	1,010	3,061

R² – коефицијент корелације за калибрациону криву; ОЛ – опсег линеарности; LOD – лимит детекције; LOQ – лимит квантификације

Коефицијент корелације је преко 0,999 за сва испитивана једињења. Употребљена хроматографска метода је најосетљивија за обтусичну киселину, а најмање осетљива за леканорну киселину. Најшири опсег линеарности био је код леканорне киселине (7,81-500 µg/mL), нешто ужи и идентичан је био за обтусичну киселину и уснинску киселину (1,56-100 µg/mL), док је најужи опсег линеарности био за атранорин (0,78-50 µg/mL).

4.1.5. Укупан садржај фенолних и флавоноидних једињења у испитиваним екстрактима лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*

Резултати одређивања укупног садржаја фенолних и флавоноидних једињења у испитиваним екстрактима лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* представљени су у Табели 7.

Табела 7: Укупан садржај фенолних и флавоноидних једињења у испитиваним екстрактима лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*

Екстракт	Укупан садржај фенола (mg GAE/g сувог екстракта)	Укупан садржај флавоноида (mg QE/g сувог екстракта)	Укупан садржај флавоноида (mg RE/g сувог екстракта)
АЕ	167,03 ± 1,12	178,84 ± 0,93	320,18 ± 1,86
МЕ	94,70 ± 0,86 ^a	116,06 ± 0,31 ^a	217,46 ± 1,34 ^a
ХЕ	34,31 ± 0,52 ^{a,b}	73,28 ± 0,29 ^{a,b}	147,45 ± 1,02 ^{a,b}

GAE – еквиваленти галне киселине; QE – еквиваленти кверцетина; RE – еквиваленти рутина; АЕ – ацетонски екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; МЕ – метанолни екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; ХЕ – n-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; Сва мерења су урађена у трипликату. Вредности су дате као средње вредности ± стандардна девијација из три мерења; а – статистички значајна разлика (p < 0,05) у односу на АЕ; b – статистички значајна разлика (p < 0,05) у односу на МЕ.

Може се уочити да највећи садржај укупних фенолних и флавоноидних једињења има АЕ, нешто мањи садржај свих испитиваних параметара има МЕ, док најмањи садржај има ХЕ.

4.1.6. Антиоксидациона активност екстраката лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине

Одређивање антиоксидационе активности испитиваних екстраката лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине извршено је применом пет различитих метода и то: Одређивање способности неутралисања DPPH радикала, хидроксил радикала и супероксид-анјон радикала, одређивање укупног антиоксидационог капацитета и одређивања индекса инхибиције липидне пероксидације. Вредности испитиваних параметара представљене су у Табели 8 и Табели 9.

Табела 8: Укупан антиоксидациони капацитет испитиваних екстраката лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*

Екстракт	Укупан антиоксидациони капацитет (mg ААЕ/g сувог екстракта)
АЕ	151,92 ± 2,15
МЕ	85,15 ± 1,26 ^a
ХЕ	28,62 ± 0,92 ^{a,b}

ААЕ – еквиваленти аскорбинске киселине; АЕ – ацетонски екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; МЕ – метанолни екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; ХЕ – n-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; Сва мерења су урађена у трипликату. Вредности су дате као средње вредности ± стандардна девијација из три мерења; а – статистички значајна разлика (p < 0,05) у односу на АЕ; b – статистички значајна разлика (p < 0,05) у односу на МЕ.

Резултати укупног антиоксидационог капацитета у сагласности су са укупним садржајем фенолних и флавоноидних једињења у испитиваним екстрактима лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, односно највећи укупни антиоксидациони капацитет показује АЕ, док најмањи укупни антиоксидациони капацитет показује ХЕ.

Табела 9: Антиоксидациона активност испитиваних екстраката лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на основу одређивања способности неутралисања DPPH радикала, хидроксил радикала, супероксид-анјон радикала и индекса инхибиције липидне пероксидације

Екстракт/ једињење	Неутралисање DPPH радикала (IC ₅₀ (µg/mL))	Неутралисање хидроксил радикала (IC ₅₀ (µg/mL))	Неутралисање супероксид-анјон радикала (IC ₅₀ (µg/mL))	Индекс инхибиције липидне пероксидације (IC ₅₀ (µg/mL))
АЕ	81,22 ± 0,54	134,48 ± 0,76	107,39 ± 0,58	69,22 ± 0,94
МЕ	89,47 ± 0,66	145,75 ± 0,61	116,53 ± 0,74	75,47 ± 0,86
ХЕ	95,55 ± 0,45 ^{ab}	154,16 ± 0,69 ^a	125,16 ± 0,55 ^a	79,55 ± 0,85 ^a
Уснинска киселина	64,92 ± 1,06 ^{a,b,c}	120,05 ± 0,85 ^{a,b,c}	90,32 ± 0,95 ^{a,b,c}	115,51 ± 1,02 ^{a,b,c}
Гална киселина	3,72 ± 0,65 ^{a,b,c,d}	45,12 ± 0,51 ^{a,b,c,d}	68,55 ± 0,45 ^{a,b,c,d}	124,43 ± 1,25 ^{a,b,c}
Аскорбинска киселина	6,31 ± 0,78 ^{a,b,c,d}	155,91 ± 0,64 ^{a,c,d}	105,62 ± 0,84 ^{c,d,e}	> 1000 ^{a,b,c,d,e}
Тролокс	10,79 ± 0,83 ^{a,b,c,d}	131,45 ± 0,56 ^{c,e}	135,14 ± 0,88 ^{a,b,d,e,f}	> 1000 ^{a,b,c,d,e}
ВНТ	16,55 ± 0,91 ^{a,b,c,d,e,f}	65,91 ± 1,85 ^{a,b,c,d,e,f,g}	71,83 ± 1,68 ^{a,b,c,d,f,g}	2,34 ± 0,61 ^{a,b,c,d,e,f,g}
α-токоферол	/	/	/	1,12 ± 0,48 ^{a,b,c,d,e,f,g}

АЕ – ацетонски екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; МЕ - метанолни екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; ХЕ - n-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; ВНТ – бутил-хидрокситолуен; / - није испитивано; Сва мерења су урађена у трипликату. Вредности су дате као средње вредности ± стандардна девијација из три мерења; IC₅₀ вредности су одређене коришћењем нелинеарне регресионе анализе; а – статистички значајна разлика (p < 0,05) у односу на АЕ; b – статистички значајна разлика (p < 0,05) у односу на МЕ; c – статистички значајна разлика (p < 0,05) у односу на ХЕ; d – статистички значајна разлика (p < 0,05) у односу на Уснинску киселину; e – статистички значајна разлика (p < 0,05) у односу на Галну киселину; f – статистички значајна разлика (p < 0,05) у односу на Аскорбинску киселину; g – статистички значајна разлика (p < 0,05) у односу на Тролокс; h – статистички значајна разлика (p < 0,05) у односу на ВНТ.

4.1.7. Антимикробна и антибиофилм активност екстраката лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине

4.1.7.1. Антимикробна активност

Резултати *in vitro* одређивања антимикробне активности испитиваних екстраката лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, уснинске киселине као и позитивне контроле, антибиотика (ампицилина и тетрациклина) и антимикотика (флуконазола и амфотерицина Б) представљени су у Табели 10 (антибактеријска активност) и Табели 11 (антифунгална активност).

Табела 10: Антибактеријска активност ацетонског, метанолног и n-хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине

Бактеријски сој	G	Екстракт/једињење											
		АЕ		МЕ		ХЕ		УК		ТЕТ		АМП	
		МИС	ММС	МИС	ММС	МИС	ММС	МИС	ММС	МИС	ММС	МИС	ММС
<i>E. coli</i> ATCC 25922	G-	>10	>10	>10	>10	10	10	>10	>10	4	6	0,37	0,5
<i>E. coli</i>	G-	>10	>10	>10	>10	10	>10	>10	>10	2	6	2,1	1,2
<i>S. enterica</i>	G-	>10	>10	>10	>10	10	10	>10	>10	2	2	1	1
<i>S. Typhimurium</i>	G-	>10	>10	10	10	10	10	>10	>10	2	2	2	2
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	G-	5	5	10	>10	5	7,5	>10	>10	2	4	4	4
<i>P. mirabilis</i>	G-	10	10	10	10	5	5	>10	>10	>128	>128	>128	>128
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 70063	G-	>10	>10	>10	>10	10	>10	>10	>10	4	64	>128	>128
<i>K. pneumoniae</i>	G-	>10	>10	>10	>10	7,5	10	>10	>10	4	32	>128	>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	G-	2,5	10	10	>10	5	10	10	>10	4	32	>128	>128
<i>P. aeruginosa</i>	G-	5	10	10	>10	10	10	10	>10	>128	>128	>128	>128
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	G+	10	>10	>10	>10	<0,08	<0,08	<0,08	<0,08	0,25	0,37	3	4
<i>B. subtilis</i>	G+	5	10	10	>10	<0,08	<0,08	<0,08	<0,08	<0,06	0,25	16	128
<i>B. cereus</i>	G+	2,5	10	5	>10	<0,08	<0,08	<0,08	<0,08	0,25	0,5	4	6
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	G+	10	>10	>10	>10	0,625	0,625	0,3125	0,625	3	6	0,25	0,75
<i>S. aureus</i>	G+	>10	>10	>10	>10	0,3125	0,3125	0,156	0,156	<0,06	<0,06	<0,06	<0,06

АЕ – ацетонски екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; МЕ - метанолни екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; ХЕ - n-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; УК – уснинска киселина; G – Класификација бактеријских сојева по Граму; ТЕТ – тетрациклин; АМП – ампицилин; МИС – минимална инхибиторна концентрација; ММС - минимална микробицидна концентрација; Вредности су дате у mg/mL за испитиване екстракте лишаја и уснинску киселину, а у µg/mL за антибиотике.

Антибактеријска активност испитиваних екстраката лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине тестирана је на 15 бактеријских сојева, и то шест стандарних сојева и девет клиничких изолата. Вредности МИС и ММС биле су у опсегу од <0,08 mg/mL до >10 mg/mL за испитиване екстракте и уснинску киселину, односно од <0,06 µg/mL до

>128 µg/mL за тестиране антибиотике. Ниво антибактеријске активности варирао је у зависности од врсте микроорганизама и врсте испитиване супстанце.

Ацетонски екстракт показао је бољу антибактеријску активност у односу на метанолни екстракт. Грам-позитивне бактерије показале су већу осетљивост на тестиране екстракте. У тестираном опсегу концентрација, ацетонски екстракт није испољио антимикуробно дејство према Грам-негативним бактеријама (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli*, *S. enterica*, *S. Typhimurium*, *K. pneumoniae* ATCC 70063, *K. pneumoniae* and *S. aureus* (MIC and MMC > 10 mg/mL)). MIC и MMC вредности осталих тестираних бактерија биле су између 2.5 и 10 mg/mL. Метанолни екстракт је показао антибактеријску активност само када је у питању бактерија *B. cereus* (MIC 5 mg/mL, MMC >10 mg/mL). У случају осталих бактерија вредности MIC и MMC биле су изнад 10 mg/mL.

Најизраженију антибактеријску активност показао је п-хексански екстракт. Грам-позитивне бактерије *B. subtilis* ATCC 6633, *B. subtilis*, и *B. cereus* показале су високу осетљивост на п-хексански екстракт, а вредности MIC и MMC биле су <0,08 mg/mL. Осетљивост су показале и бактерије *S. aureus* ATCC 6538 (MIC и MMC 0,625 mg/mL) и клинички изолат *S. aureus* (MIC и MMC 0,3125 mg/mL). У случају Грам-негативних бактерија, најосетљивије бактерије биле су *P. mirabilis* ATCC 12453, *P. mirabilis* и *P. aeruginosa* ATCC 27853 (MIC 5 mg/mL, MMC 10 mg/mL).

Уснинска киселина испољила је јак антимикуробни ефекат према врстама из рода *Bacillus* (MIC и MMC <0,08 mg/mL), док је ефекат према врстама из рода *Staphylococcus* био између 0,156 mg/mL и 0,3125 mg/mL. У тестираном опсегу концентрација, уснинска киселина није испољила антимикуробни ефекат према Грам-негативним бактеријама (MIC и MMC >10 mg/mL). Изузетак је стандардни сој *P. aeruginosa* ATCC 27853 и клинички изолат *P. aeruginosa* (MIC 10 mg/mL, MMC >10 mg/mL).

На основу добијених резултата и поређења са контролом (тетрациклин и ампицилин), тестирани екстракти и уснинска киселина имају слаб (метанолни екстракт и уснинска киселина) и умерен (ацетонски и п-хексански екстракт) ефекат. Свакако, уснинска киселина и п-хексански екстракт имају јак ефекат на Грам-позитивне бактерије. DMSO у концентрацији од 10% који је коришћен као растварач за екстракте и уснинску киселину није инхибирао раст микроорганизама.

Табела 11: Антифунгална активност ацетонског, метанолног и п-хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине

Фунгални сој	Екстракт/једињење											
	АЕ		МЕ		ХЕ		УК		АБ		ФК	
	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC
<i>S. cerevisiae</i>	10	10	10	10	1.25	2.5	5	10	/	/	7,81	7,81
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1,125	5	2.5	10	0,625	5	10	>10	0,49	1,95	31,25	31,25
<i>C. albicans</i>	10	10	10	10	1,25	5	10	>10	0,98	1,95	62,5	62,5
<i>A. niger</i> ATCC 16888	10	10	10	10	0,156	2,5	10	>10	0,98	0,98	250	500

АЕ – ацетонски екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; МЕ - метанолни екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; ХЕ - п-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; УК – уснинска киселина; АБ – амфотерицин Б; ФК – флуконазол; MIC – минимална инхибиторна концентрација; MMC - минимална фунгицидна концентрација; / - није испитивано; Вредности су дате у mg/mL за испитиване екстракте лишаја и уснинску киселину, а у µg/mL за антимикуробике.

Антифунгална активност испитиваних екстраката лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине тестирана је на 4 соја гљива, и то два стандарна соја и два клиничка изолата.

Ацетонски екстракт испољио је слабу антифунгалну активност (МИС и ММС 10 mg/mL) за скоро све испитиване сојеве гљива, осим у случају стандардног соја *C. albicans* ATCC 10231 када је вредност МИС била 1,125 mg/mL, а вредност ММС 5 mg/mL. Сличну активност показао је и метанолни екстракт, такође са изузетком МИС вредности у случају стандардног соја *C. albicans* ATCC 10231 (МИС 2,5 mg/mL, ММС 10 mg/mL).

Н-хексански екстракт испољио је најснажнију антифунгалну активност, и то према стандардним сојевима *A. niger* ATCC 16888 (МИС 0,156 mg/mL, ММС 2,5 mg/mL) и *C. albicans* ATCC 10231 (МИС 0,625 mg/mL, ММС 5 mg/mL).

У тестираном опсегу концентрација, уснинска киселина није испољила јаку антифунгалну активност према испитиваним сојевима гљива (МИС 10 mg/mL, ММС >10 mg/mL), осим у случају изолата *S. cerevisiae* када је вредност МИС била 5 mg/mL, а ММС 10 mg/mL.

DMSO у концентрацији од 10% који је коришћен као растварач за екстракте и уснинску киселину није инхибирао раст микроорганизама.

4.1.7.2. Антибиофилм активност

У циљу откривања природних компоненти способних да инхибирају и превенирају формирање бактеријског биофилма, ацетонски, метанолни и п-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, и уснинске киселине су испитани на бактеријским сојевима *P. aeruginosa* и *S. aureus* ATCC 6538 (Табели 12).

Табела 12: Антибиофилм активност ацетонског, метанолног и п-хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине

Екстракт/једињење	Ниво ВИС	Бактеријски сој	
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 6538
АЕ	ВИС ₅₀	>10000	156
	ВИС ₉₀	>10000	1250
МЕ	ВИС ₅₀	>10000	234
	ВИС ₉₀	>10000	2500
ХЕ	ВИС ₅₀	>10000	1250
	ВИС ₉₀	>10000	3750
УК	ВИС ₅₀	>10000	1750
	ВИС ₉₀	>10000	5000
ТЕТ	ВИС ₅₀	>1000	249
	ВИС ₉₀	>1000	>1000
ВАН	ВИС ₅₀	733,8	62,6
	ВИС ₉₀	>1000	>1000
ЦЕФ	ВИС ₅₀	116,2	475,4
	ВИС ₉₀	>1000	>1000

АЕ – ацетонски екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; МЕ - метанолни екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; ХЕ - п-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; УК – уснинска киселина; ТЕТ – тетрациклин; ВАН – ванкомицин; ЦЕФ – цефтриаксон; ВИС – биофилм инхибиторна концентрација; ВИС₅₀ - биофилм инхибиторна концентрација неопходна да се формирање биофилма смањи за 50%; ВИС₉₀ - биофилм инхибиторна концентрација неопходна да се формирање биофилма смањи за 90%; Вредности су изражене као µg/mL.

У одсуству испитиваних екстраката и уснинске киселине, тестирани бактеријски сојеви формирају умерен биофилм. У њиховом присуству, способност Грам-негативне бактерије *P. aeruginosa* није измењена ($ВIC_{50}$ и $ВIC_{90} > 10000 \mu\text{g/mL}$). На формирање биофилма Грам-позитивне бактерије *S. aureus* ATCC 6538 најачи ефекат имао је ацетонски екстракт ($ВIC_{50} = 156 \mu\text{g/mL}$ и $ВIC_{90} = 1250 \mu\text{g/mL}$), затим метанолни ($ВIC_{50} = 234 \mu\text{g/mL}$ и $ВIC_{90} = 2500 \mu\text{g/mL}$), па n-хексански екстракт ($ВIC_{50} = 1250 \mu\text{g/mL}$ и $ВIC_{90} = 3750 \mu\text{g/mL}$). Уснинска киселина имала је најслабији ефекат на формирање биофилма *S. aureus* ATCC 6538 ($ВIC_{50} = 1750 \mu\text{g/mL}$ и $ВIC_{90} = 5000 \mu\text{g/mL}$).

Метаболичка активност биофилма *P. aeruginosa* (График 1) и *S. aureus* ATCC 6538 (График 2) у присуству тестираних екстраката лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине испитана је додавањем индикатора ресазурина.

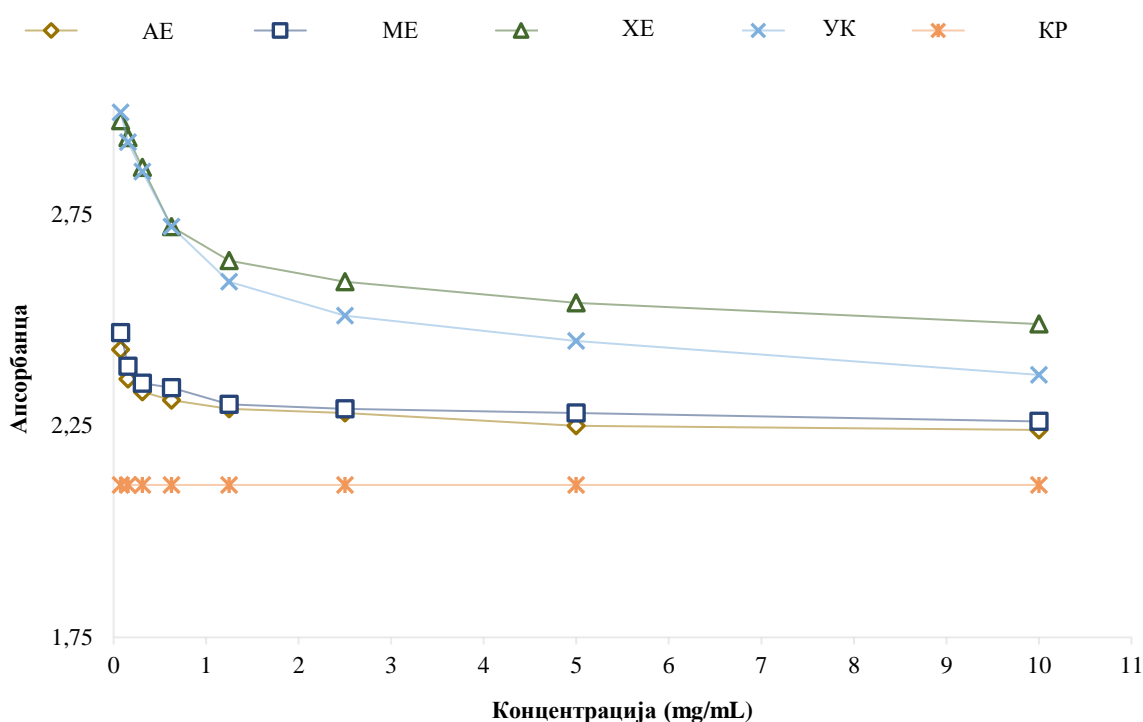


График 1: Утицај испитиваних екстраката лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на метаболичку активност биофилма бактеријског соја *P. Aeruginosa*. АЕ – ацетонски екстракт лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla*; МЕ - метанолни екстракт лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla*; ХЕ - n-хексански екстракт лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla*; УК – уснинска киселина; КР – контрола раста

Маса биофилма и његова метаболичка активност биле су у директној позитивној корелацији, односно што је биофилм имао већу масу његова метаболичка активност је била већа и обратно. Тако је уочено да је метаболичка активност биофилма *P. aeruginosa* била већа у присуству тестираних екстраката и уснинске киселине, у поређењу са контролом раста (График 1), док је метаболичка активност биофилма *S. aureus* ATCC 6538 била смањена у присуству тестираних екстраката и уснинске киселине у поређењу са контролом раста (График 2).

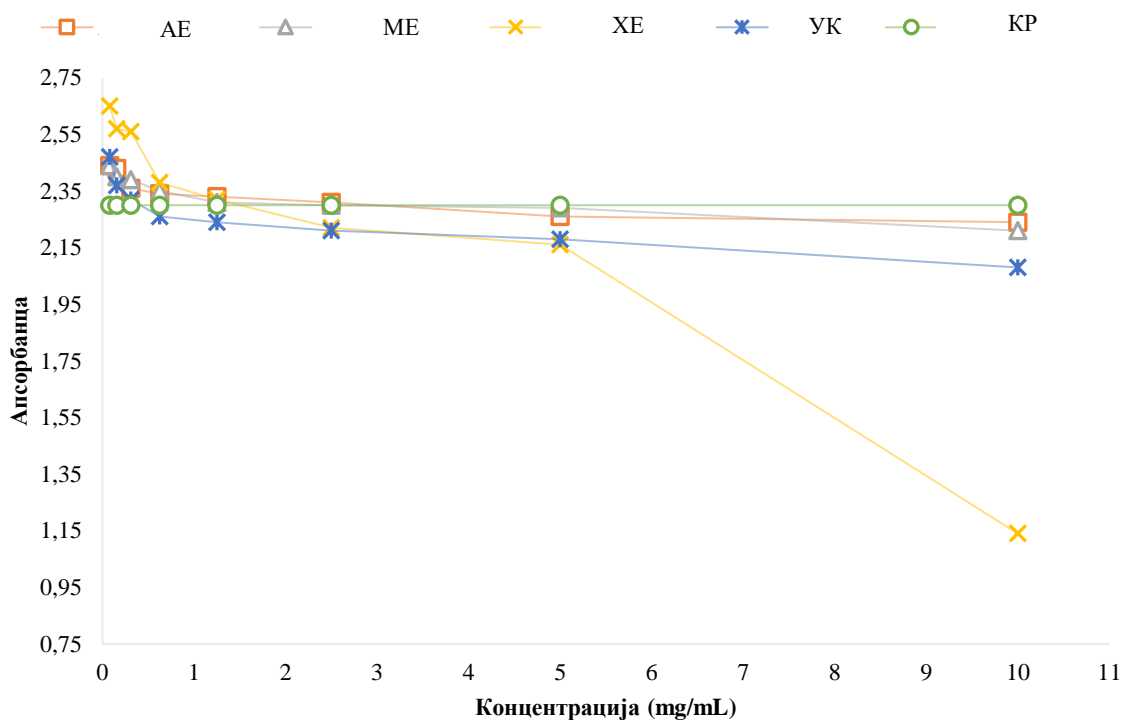


График 2: Утицај испитиваних екстракта лишља *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на метаболичку активност биофилма бактеријског соја *S. aureus* ATCC 6538. АЕ – ацетонски екстракт лишља *Xanthoparmelia stenophylla*; МЕ – метанолни екстракт лишља *Xanthoparmelia stenophylla*; ХЕ – п-хексански екстракт лишља *Xanthoparmelia stenophylla*; УК – уснинска киселина; КР – контрола раста

4.1.8. Антитуморска активност екстраката лишља *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине

Антитуморска активност екстраката лишља *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине тестирана је коришћењем МТТ колориметријског теста и то на панелу од три хумане канцерске ћелијске линије (MDA-MB 231, HeLa и HCT-116), као и на нетрансформисаној ћелијској линији хуманих фибробласта (MRC-5). На основу добијених резултата конструисане су криве концентрација-одговор, а изражени су следећи параметри: IC₅₀, SI, GI₅₀, TGI и LC₅₀.

Уснинска киселина, АЕ и ХЕ довели су до значајног ($p < 0,05$) смањења вијабилности ћелија и то према концентрационо-зависном принципу на свакој од испитиваних ћелијских линија и у свим временским тачкама посматрања са изузетком ХЕ након трајања третмана од 24 часа. МЕ није показао смањење вијабилности ћелија ни по концентрационо-зависном принципу ни по временски-зависном принципу. Криве концентрација-одговор добијене МТТ тестом након примене испитиваних екстраката лишља *Xanthoparmelia stenophylla*, уснинске киселине и доксорубицина на ћелијском линијама MDA-MB 231, HeLa, HCT 116 и MRC-5 након 24, 48 и 72 часа примене представљене су на **Графицима 3-7**.

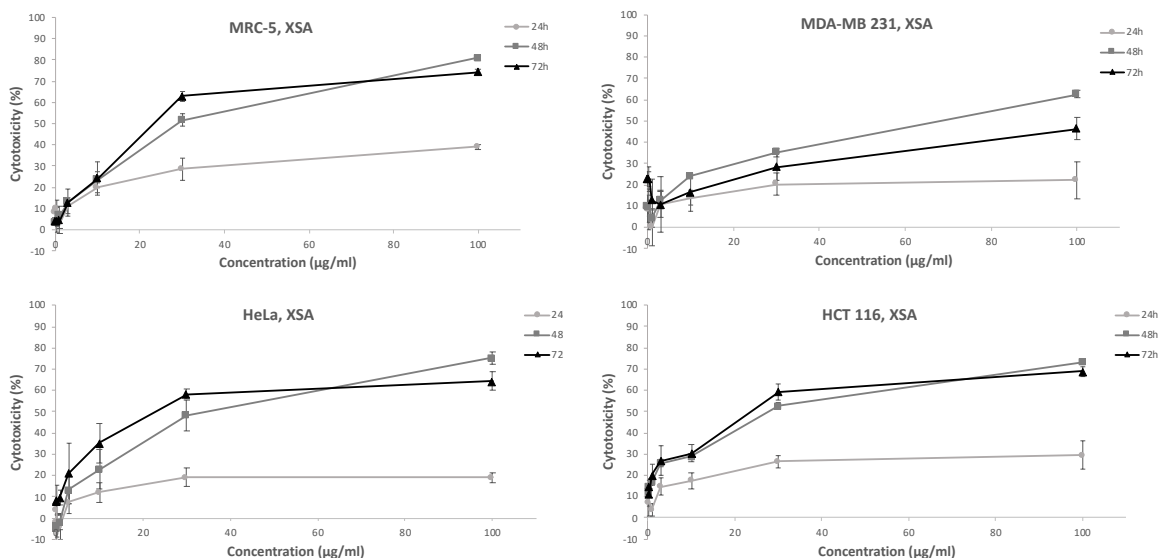


График 3: Крива доза-одговор МТТ теста након 24, 48 и 72 сата примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* на ћелијске линије MRC-5, MDA-MB 231 HeLa и HCT 116. Сва мерења су урађена у квадрипликату. Вредности су дате као средње вредности ± стандардна девијација из четири мерења из три независна експеримента.

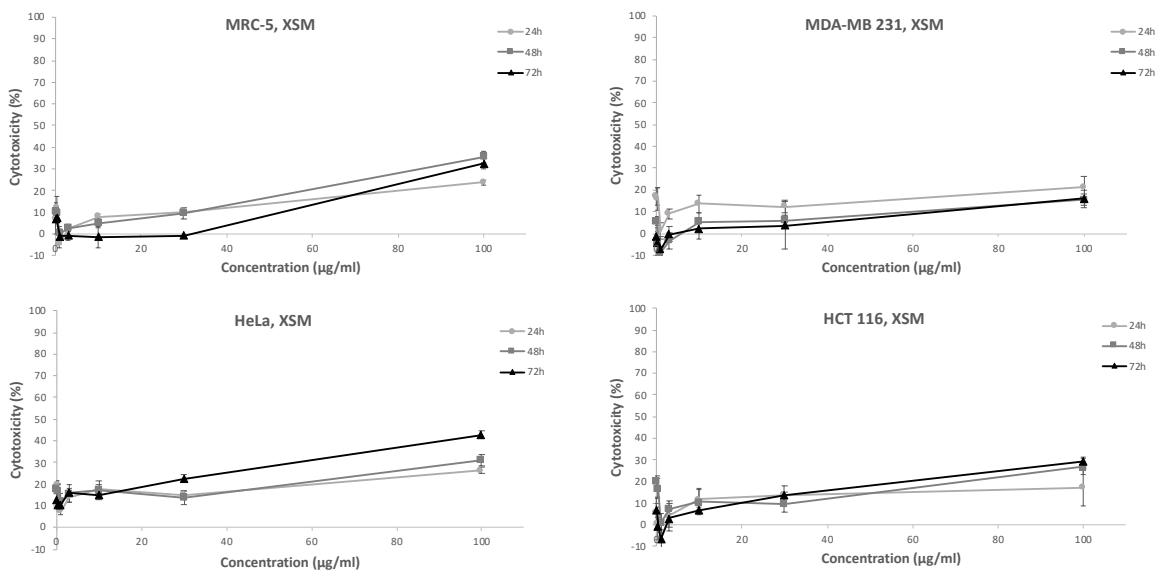


График 4: Крива доза-одговор МТТ теста након 24, 48 и 72 сата примене метанолног екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* на ћелијске линије MRC-5, MDA-MB 231 HeLa и HCT 116. Сва мерења су урађена у квадрипликату. Вредности су дате као средње вредности ± стандардна девијација из четири мерења из три независна експеримента.

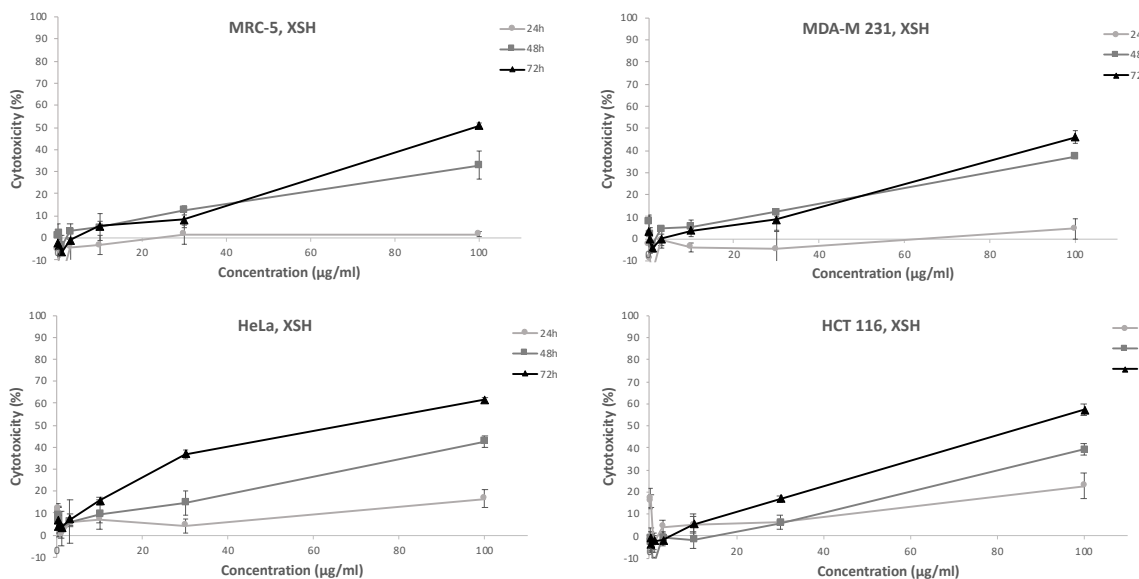


График 5: Крива доза-одговор МТТ теста након 24, 48 и 72 сата примене п-хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* на ћелијске линије MRC-5, MDA-MB 231 HeLa и HCT 116. Сва мерења су урађена у квадрипликату. Вредности су дате као средње вредности ± стандардна девијација из четири мерења из три независна експеримента.

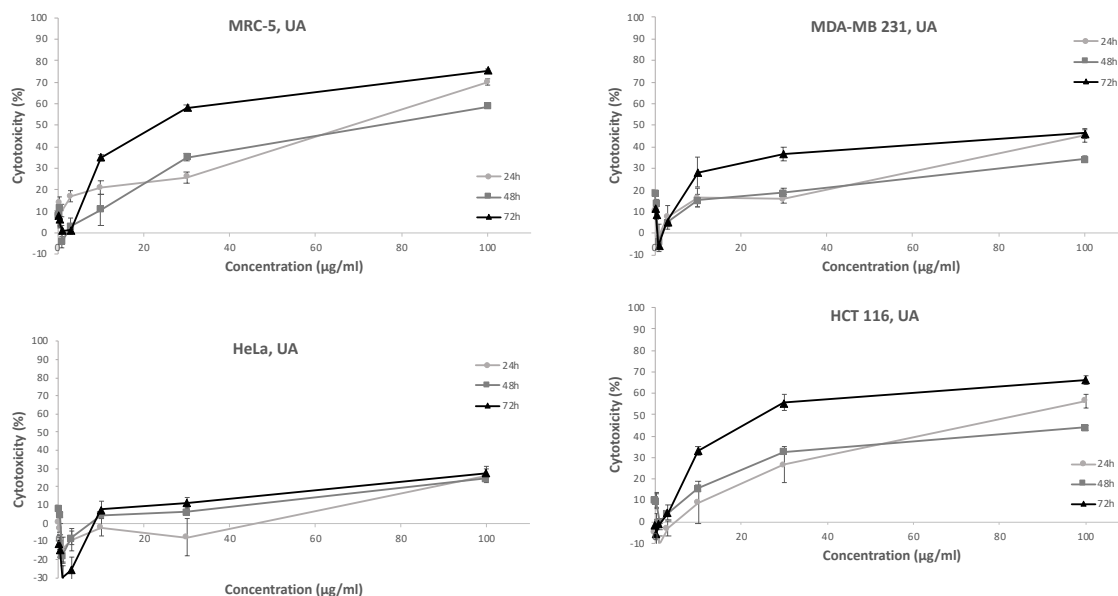


График 6: Крива доза-одговор МТТ теста након 24, 48 и 72 сата примене уснинске киселине на ћелијске линије MRC-5, MDA-MB 231 HeLa и HCT 116. Сва мерења су урађена у квадрипликату. Вредности су дате као средње вредности ± стандардна девијација из четири мерења из три независна експеримента.

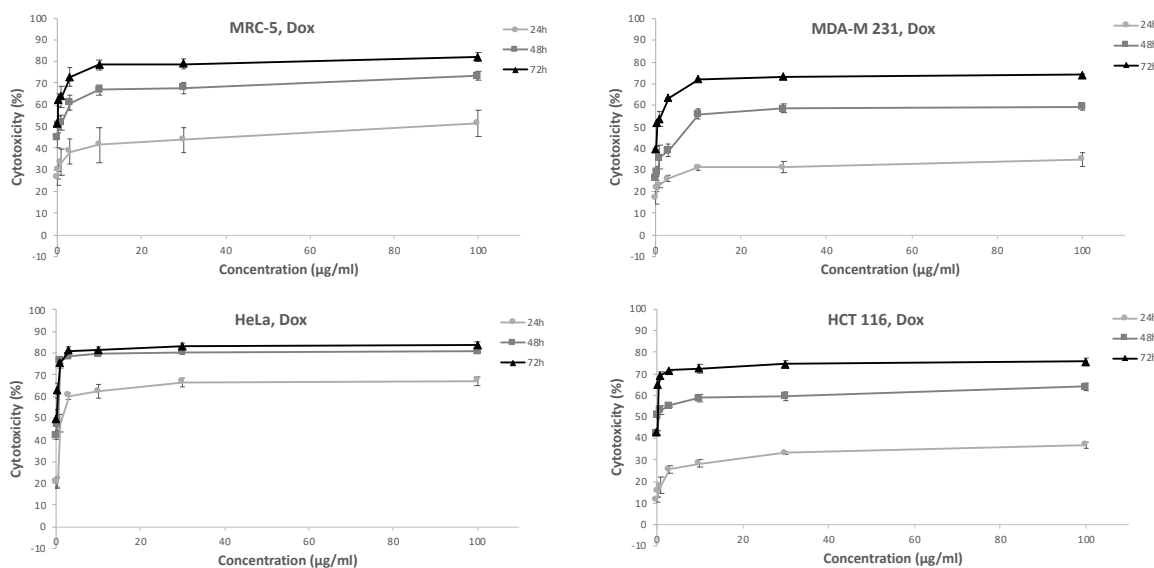


График 7: Крива доза-одговор МТТ теста након 24, 48 и 72 сата примене доксорубицина на ћелијске линије MRC-5, MDA-MB 231 HeLa и HCT 116. Сва мерења су урађена у квадрипликату. Вредности су дате као средње вредности \pm стандардна девијација из четири мерења из три независна експеримента.

Параметар IC_{50} користи се као мера инхибиције раста ћелијских линија када није познат иницијални број ћелија и одређује се ради процене општег инхибиторног потенцијала испитиваних супстанци. Уочено је да испитивани екстракти лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинска киселина испољавају различиту инхибиторну активност према испитиваним ћелијским линијама. АЕ је показао највећи утицај на HeLa ћелијску линију, која је посебно изражена након третмана у трајању од 48 и 72 сата. Нешто слабију активност испољио је ХЕ након трајања третмана од 72 сата, док је ефекат уснинске киселине био занемарљив ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$).

Ћелијска линија HCT-116 изразито је осетљива на дејство АЕ и уснинске киселине након трајања третмана од 72 сата, али са друге стране отпорна је на деловање ХЕ у свим испитиваним временским интервалима. Установљено је и да АЕ испољава подједнаку активност и према HeLa ћелијској линији и према HCT-116 ћелијској линији након трајања третмана од 72 сата.

Испитивања су показала да је ћелијска линија MRC-5 ћелија занемарљиво осетљива на дејство ХЕ ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$), а умерено осетљива на дејство АЕ и уснинске киселине са вредностима IC_{50} од $51,63 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$ и $53,14 \pm 1,04 \mu\text{g/mL}$ респективно. МЕ није показао значајан ефекат ни према једној од испитиваних ћелијских линија. Уочено је да ниједан од испитиваних екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, као ни уснинска киселина нису показали укупан инхибиторни ефекат који је упоредив са стандардном супстанцом (доксорубицином), али је селективна токсичност била израженија, када се узме у обзир ефекат према малигним ћелијским линијама и ћелијској линији неизмењених фибробласта (MRC-5). Највећу селективност испољио је АЕ према ћелијској линији HCT-116 ћелија ($SI = 2,40$), затим АЕ према ћелијској линији HeLa ћелија ($SI = 2,36$) и на крају уснинска киселина према ћелијској линији HCT-116 ћелија ($SI = 2,23$). Измерене IC_{50} вредности за испитиване екстракте лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинску киселину представљени су у **Табели 13**. Активност било ког од испитиваних екстраката и уснинске киселине према MDA-MB 231 ћелијској линији је занемарљиво мала тако да те вредности нису представљене.

Табела 13: IC₅₀ (µg/mL) вредности и индекс селективности за ацетонски и хексански екстракт лишја *Xanthoparmelia stenophylla*, уснинску киселину и доксорубицин након 24, 48 и 72 часа третмана MRC-5, HeLa и HCT 116 ћелијских линија

Испитивани екстракт / једињење	АЕ			ХЕ		УА		DOX	
	В	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI
MRC-5									
24h	>100	НП	>100	НП	66,18 ± 1,72	НП	86,87 ± 17,17	НП	
48h	52,96 ± 2,48	НП	>100	НП	78,54 ± 0,87	НП	0,96 ± 0,10	НП	
72h	51,63 ± 0,19	НП	>100	НП	53,14 ± 1,04	НП	0,1 ± 0,05	НП	
HeLa									
24h	>100	0,51	>100	0,94	>100	0,36	22,92 ± 3,05	3,8	
48h	32,31 ± 3,14	1,63	>100	1,29	>100	0,41	1,04 ± 0,06	0,92	
72h	21,17 ± 1,85	2,36	51,37 ± 0,69	1,95	>100	0,38	0,14 ± 0,01	0,71	
HCT 116									
24h	>100	0,68	>100	1,52	>100	0,62	152,92 ± 9,69	0,57	
48h	28,45 ± 0,17	1,86	>100	1,24	83,99 ± 4,22	0,93	126,04 ± 8,96	1,09	
72h	21,48 ± 3,55	2,40	87,31 ± 1,44	1,03	23,79 ± 2,10	2,23	0,41 ± 0,16	0,24	

АЕ – ацетонски екстракт лишја *Xanthoparmelia stenophylla*; ХЕ – n-хексански екстракт лишја *Xanthoparmelia stenophylla*; УА – уснинска киселина; DOX – доксорубицин; В – време трајања третмана; SI – индекс селективности; НП – није примењиво; вредности су изражене као средња вредност ± стандардна девијација за три мерења.

Испитивани су и параметри који могу да укажу да ли испитивана супстанца испољава цитостатски (параметри GI₅₀, TGI) или цитотоксични (LC₅₀) ефекат на испитиване ћелијске линије. Ниједан од испитиваних екстраката није испољио цитотоксичну активност без обзира на врсту ћелијске линије односно вредности LC₅₀ су у свим испитиваним случајевима биле веће од 100 µg/mL. Веома изражен антипролиферативни ефекат уочен је код АЕ и то посебно према ћелијама у HeLa ћелијској линији при чему је вредност GI₅₀ била мања од најмање испитиване концентрације, а вредност TGI параметра била је 14,08 ± 2,54 µg/mL након третмана у трајању од 72 сата. АЕ је такође показао значајну инхибицију раста ћелија у ћелијској линији HCT-116 при чему је вредност GI₅₀ била мања од 0,1 µg/mL. Када се узме у обзир параметар који се односи на укупну инхибицију раста показано је да АЕ има значајно израженији ефекат према HeLa ћелијској линији у поређењу са HCT-116 ћелијском линијом. Укупна инхибиција ћелијског раста испитивана на MRC-5 ћелијској линији показала је да је ефекат АЕ израженији у поређењу са ХЕ и уснинском киселином. Уснинска киселина показала је изражен антипролиферативни ефекат према ћелијама HCT-116 ћелијске линије, док је ХЕ показао умерени ефекат према ћелијама HeLa ћелијске линије. Параметри испитивања цитостатског и цитотоксичног ефекта на испитиване ћелијске линије представљени су у Табели 14.

Табела 14: Концентрације ацетонског и хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, уснинске киселине и доксорубицина ($\mu\text{g/mL}$) потребне да се инхибира 50% раста ћелија (GI_{50}) и укупна инхибиција раста ћелија (TGI) након 24, 48 и 72 часа третмана MRC-5, HeLa и HCT 116 ћелијских линија

Испитивани екстракт / једињење	Тип ћелија	АЕ		ХЕ		УА		DOX		
		В	GI_{50}	TGI	GI_{50}	TGI	GI_{50}	TGI	GI_{50}	TGI
MRC-5										
	24h	37.73 \pm 0,54	89.12 \pm 0,44	>100	>100	42.97 \pm 1.56	>100	<0,1	54.71 \pm 4.65	
	48h	30,79 \pm 1.22	75.81 \pm 0,58	91.02 \pm 11.06	>100	41.31 \pm 0,56	93.25 \pm 0,08	<0,1	6.34 \pm 2.90	
	72h	11.38 \pm 5.76	69.62 \pm 7.70	60,04 \pm 1.57	>100	36.73 \pm 0,92	89.15 \pm 0,25	<0,1	2.35 \pm 0,35	
HeLa										
	24h	38.43 \pm 2.21	84.05 \pm 11.17	67.83 \pm 9.93	>100	>100	>100	<0,1	<0,1	
	48h	11.48 \pm 5.64	57.31 \pm 3.34	51.41 \pm 5.41	>100	99.16 \pm 15.59	>100	<0,1	<0,1	
	72h	<0,1	14.08 \pm 2.54	39.24 \pm 0,83	91.38 \pm 0,22	64.28 \pm 8.34	86.91 \pm 5.42	<0,1	<0,1	
HCT 116										
	24h	27.24 \pm 0,45	88.98 \pm 0,51	68.79 \pm 18.15	>100	41.94 \pm 3.12	79.12 \pm 1.18	<0,1	<0,1	
	48h	17.35 \pm 2.52	75.92 \pm 0,15	61.4 \pm 3.53	>100	27.21 \pm 1.94	63.58 \pm 0,90	<0,1	<0,1	
	72h	<0,1	55.65 \pm 4.49	51.89 \pm 0,15	99.48 \pm 3,45	15.87 \pm 2.89	64.91 \pm 1.44	<0,1	<0,1	

АЕ – ацетонски екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; ХЕ – п-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*; УА – уснинска киселина; DOX – доксорубицин; В – време трајања третмана; вредности су изражене као средња вредност \pm стандардна девијација за три мерења.

4.2. Испитивање ефеката доксорубицина на кардиоваскуларни систем пацова и изазивање кардиотоксичности

4.2.1. Испитивање ефеката примене доксорубицина на хемодинамске параметре и параметре функције срца *ex vivo*

4.2.1.1. Испитивање ефеката примене доксорубицина на крвни притисак пацова

Вредности систолног крвног притиска, дијастолног крвног притиска и срчане фреквенције одређене су на почетку експеримента и на крају експеримента пре самог жртвовања животиња што је приказано у Табели 15. Вредности наведених параметара нултог дана указују да су формиране групе хомогене. Са друге стране, вредности наведених параметара које су измерене последњег дана експеримента указују да постоји утицај примењеног третмана. Групе третиране доксорубицином без примене неког од третмана имају значајно снижене вредности систолног и дијастолног крвног притиска док промена срчане фреквенције није била значајно измењена.

Табела 15: Вредности систолног крвног притиска, дијастолног крвног притиска и срчане фреквенције на почетку експеримента и на крају експеримента према испитиваним групама

Група	Почетак експеримента (Дан 0)		
	SP (mmHg)	DP (mmHg)	HR (bpm)
CTRL	121,55 ± 9,12	81,26 ± 6,01	333,29 ± 26,54
СМС	119,33 ± 6,03	76,00 ± 9,17	329,67 ± 33,47
DOX	120,45 ± 9,04	82,78 ± 6,15	328,50 ± 25,21
СМС + DOX	121,67 ± 5,04	79,12 ± 7,52	324,57 ± 16,81
Група	3 дана након примене доксорубицина (Дан 31)		
	SP (mmHg)	DP (mmHg)	HR (bpm)
CTRL	123,67 ± 9,71	83,11 ± 6,56	338,33 ± 28,15
СМС	122,23 ± 8,15	83,27 ± 6,95	325,53 ± 27,12
DOX	95,67 ± 7,64 ^{a,b}	65,33 ± 8,08 ^{a,b}	315 ± 15,52 ^{a,b}
СМС + DOX	94,13 ± 8,10 ^{a,b}	63,66 ± 7,81 ^{a,b}	320 ± 16,75 ^a

Легенда: SP – систолни притисак; DP – дијастолни притисак; HR – срчана фреквенција; mmHg – милиметар живиног стуба; bpm – број откуцаја у минути; a – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); b – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; СМС – група третирана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; DOX – група третирана доксорубицином; СМС + DOX – група третирана доксорубицином након третмана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе.

4.2.1.2. Испитивање ефеката примене доксорубицина на ехокардиографске параметре леве коморе

Ехокардиографско испитивање представља незаменљив алат у процени утицаја примењених третмана на функцију миокарда *in vivo*. Параметар који се посебно издваја јесте фракциони скраћење који се изражава у процентима и које у значајној мери зависи од претходног и накнадног оптерећења срца. Јасно се може уочити да примена доксорубицина доводи до значајног редуковања свих испитиваних параметара са изузетком дебљине зида интервентрикуларног септума на крају систоле (LVIDs). Резултати ехокардиографског тестирања испитиваних група представљени су у **Табели 16**.

Табела 16: Вредности ехокардиографских параметара на почетку експеримента и на крају експеримента према испитиваним групама

ИП	CTRL		СМС		DOX		СМС + DOX	
	Дан 0	Дан 31	Дан 0	Дан 31	Дан 0	Дан 31	Дан 0	Дан 31
IVSd (mm)	1,51±0,09	1,54±0,07	1,41±0,04	1,48±0,05	1,57±0,07	1,29±0,12 ^{a,b}	1,57±0,08	1,24±0,14 ^{a,b}
LVIDd (mm)	6,44±0,53	6,45±0,54	6,31±0,38	6,36±0,41	6,56±0,71	5,85±0,35 ^{a,b}	6,41±0,66	5,96±0,36 ^{a,b}
LVPWd (mm)	1,55±0,08	1,55±0,08	1,61±0,06	1,58±0,08	1,49±0,03	1,28±0,08 ^{a,b}	1,51±0,04	1,28±0,04 ^{a,b}
IVSs (mm)	2,69±0,14	2,72±0,12	2,78±0,14	2,80±0,12	2,59±0,08	2,39±0,12 ^{a,b}	2,62±0,10	2,46±0,10 ^{a,b}
LVIDs (mm)	3,22±0,26	3,25±0,30	3,27±0,35	3,31±0,39	3,17±0,20	3,33±0,46	3,26±0,08	3,37±0,57
LVPWs (mm)	2,83±0,19	2,88±0,14	2,86±0,27	2,92±0,17	2,79±0,10	2,44±0,15 ^{a,b}	2,83±0,09	2,38±0,16 ^{a,b}
FS (%)	57,5±4,64	57,8±4,49	56,7±1,47	57,1±1,76	58,3±7,05	45,7±2,53 ^{a,b}	58,1±7,07	46,3±1,62 ^{a,b}

Легенда: ИП – испитивани параметар; IVSd – дебљина зида интервентрикуларног септума на крају дијастоле; LVIDd – унутрашња димензија леве коморе на крају дијастоле; LVPWd – дебљина задњег зида леве коморе на крају дијастоле; IVSs – дебљина зида интервентрикуларног септума на крају систоле; LVIDs – дебљина зида интервентрикуларног септума на крају систоле; LVPWs – дебљина задњег зида леве коморе на крају систоле; FS – проценат фракционог скраћења леве коморе; a – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); b – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; СМС – група третирана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; DOX – група третирана доксорубицином; СМС + DOX – група третирана доксорубицином након третмана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе.

4.2.1.3. Испитивање ефеката примене доксорубицина на параметре функционисања срца *ex vivo*

Параметри функционисања миокарда у протоколу ауторегулације указују на способност миокарда да се прилагоди промени спољашњих чинилаца и при томе задржи способност одржавања циркулације и снабдевања миокарда кисеоником и хранљивим материјама. Уколико миокард задржи вредности забележене током протокола промене притиска у првом тренутку (PPP 1) и током протокола промене притиска у другом тренутку (PPP 2) може се сматрати да су функционалне способности миокарда очуване.

У контролној групи измерене су сличне вредности кардиодинамских параметара током оба протокола промене притиска са изузетком коронарног протока при притиску од 80 cmH₂O.

Вредности кардиодинамских параметара током протокола ауторегулације у CTRL групи представљене су на **Графику 8**.

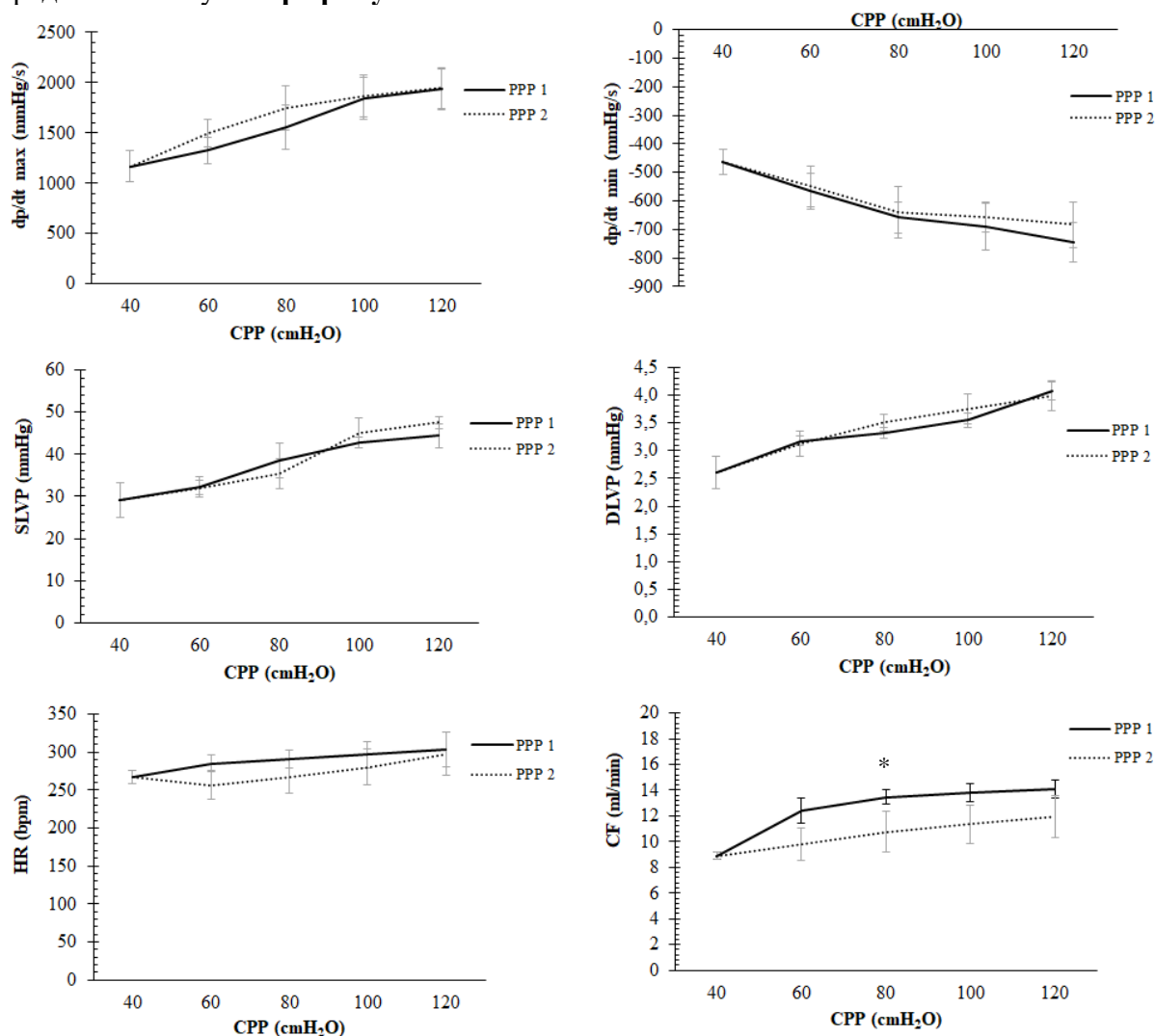


График 8: Вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR, CF) у контролној групи (CTRL) у два узастопна протокола промене притиска, dp/dt max – максимална стопа промене притиска у левој комори; dp/dt min – минимална стопа промене притиска у левој комори; SLVP – систолни притисак леве коморе, DLVP – дијастолни притисак леве коморе, HR – срчана фреквенција, CF – коронарни проток; CPP – коронарни перфузиони притисак; * – статистички значајна разлика при истом перфузионом притиску у оквиру различитих протокола ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); PPP 1 – протокол промене притиска у првом тренутку; PPP 2 – протокол промене притиска у другом тренутку; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација.

У групи третираној вехикулумом (СМС група) забележен је сличан тренд као и у CTRL групи, односно појава да мерени кардиодинамски параметри не варирају значајно током PPP 1 и PPP 2. Изузетак је био дијастолни притисак у левој комори, који је био нижи при притисцима од 80-120 cmH₂O током PPP 2.

Вредности кардиодинамских параметара током протокола ауторегулације у СМС групи представљене су на **Графику 9**.

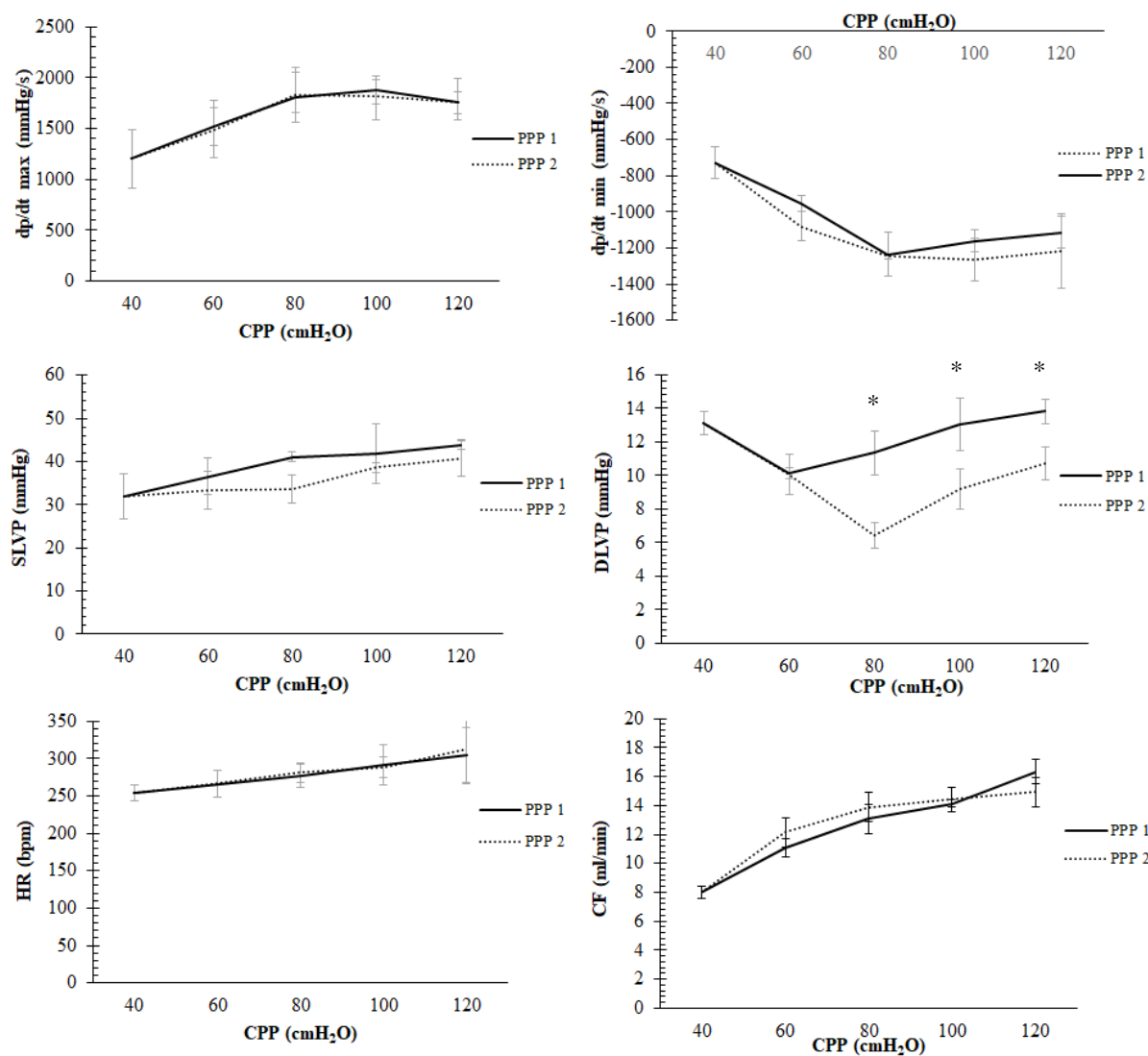


График 9: Вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR, CF) у групи третираној 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе (СМС) у два узастопна протокола промене притиска, dp/dt max – максимална стопа промене притиска у левој комори; dp/dt min – минимална стопа промене притиска у левој комори; SLVP – систолни притисак леве коморе, DLVP – дијастолни притисак леве коморе, HR – срчана фреквенција, CF – коронарни проток; CPP – коронарни перфузионни притисак; * – статистички значајна разлика при истом перфузионном притиску у оквиру различитих протокола ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); PPP 1 – протокол промене притиска у првом тренутку; PPP 2 – протокол промене притиска у другом тренутку; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација.

У групи третираној доксорубицином забележене су значајне разлике у параметрима dp/dt max, dp/dt min и CF између PPP 1 и PPP 2 при перфузионим притисцима од 60 до 120 cmH_2O , док код осталих параметара није забележена значајна разлика.

Вредности кардиодинамских параметара током протокола ауторегулације у DOX групи представљене су на **Графику 10**.

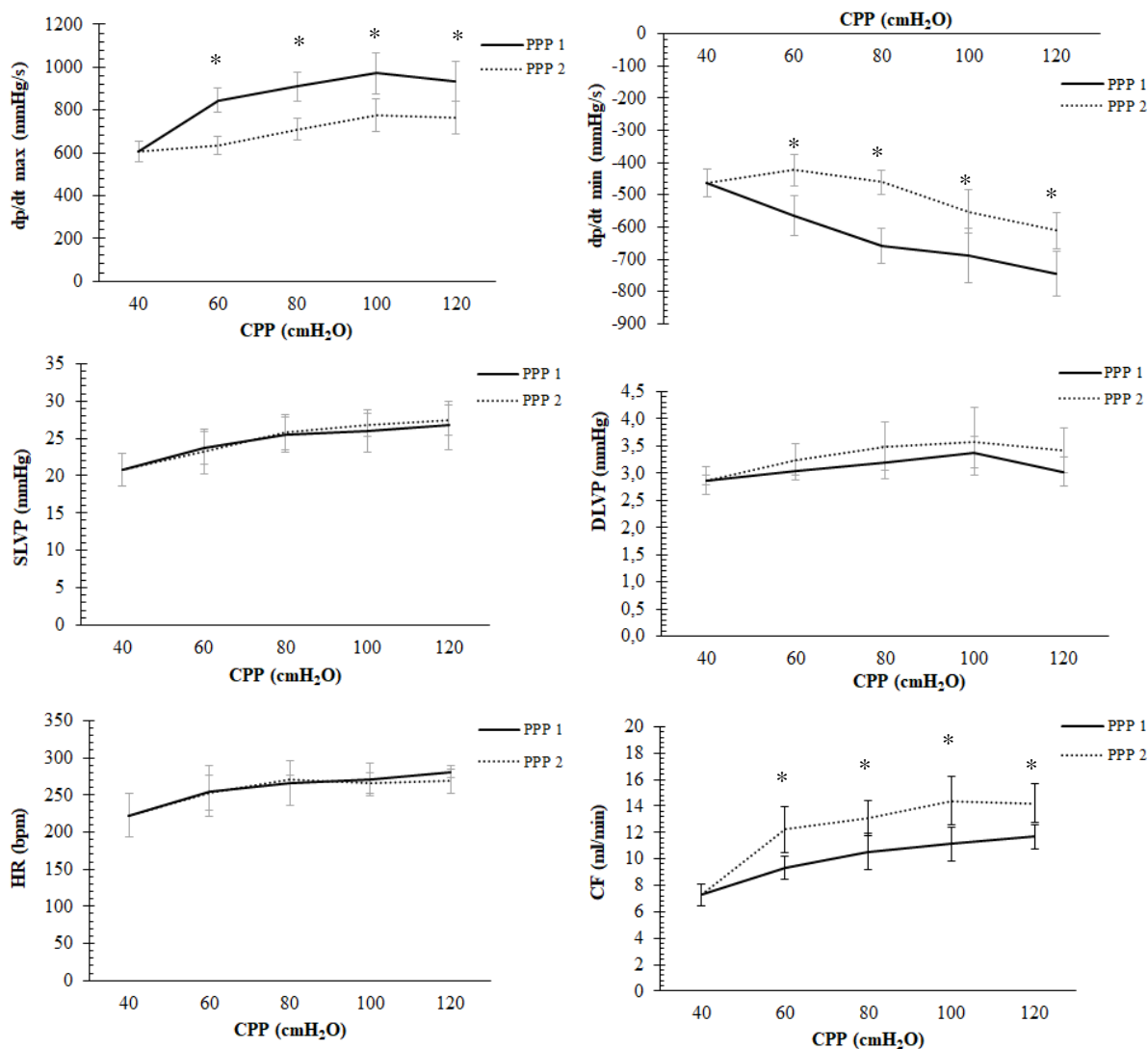


График 10: Вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR, CF) у групи третираној доксорубицином (DOX) у два узастопна протокола промене притиска, dp/dt max – максимална стопа промене притиска у левој комори; dp/dt min – минимална стопа промене притиска у левој комори; SLVP – систолни притисак леве коморе, DLVP – дијастолни притисак леве коморе, HR – срчана фреквенција, CF – коронарни проток; CPP – коронарни перфузиони притисак; * – статистички значајна разлика при истом перфузионим притиску у оквиру различитих протокола ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); PPP 1 – протокол промене притиска у првом тренутку; PPP 2 – протокол промене притиска у другом тренутку; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација.

У групи третираној вехикулумом пре примене доксорубицина (СМС + DOX) забележен је сличан тренд као и у DOX групи, односно значајна разлика у параметрима контрактилности ($dp/dt \max$ и $dp/dt \min$) током PPP 1 и PPP 2 при перфузионим притисцима од 60 до 120 cmH_2O , док код осталих параметара није забележена значајна разлика.

Вредности кардиодинамских параметара током протокола ауторегулације у СМС + DOX групи представљене су на **Графику 11**.

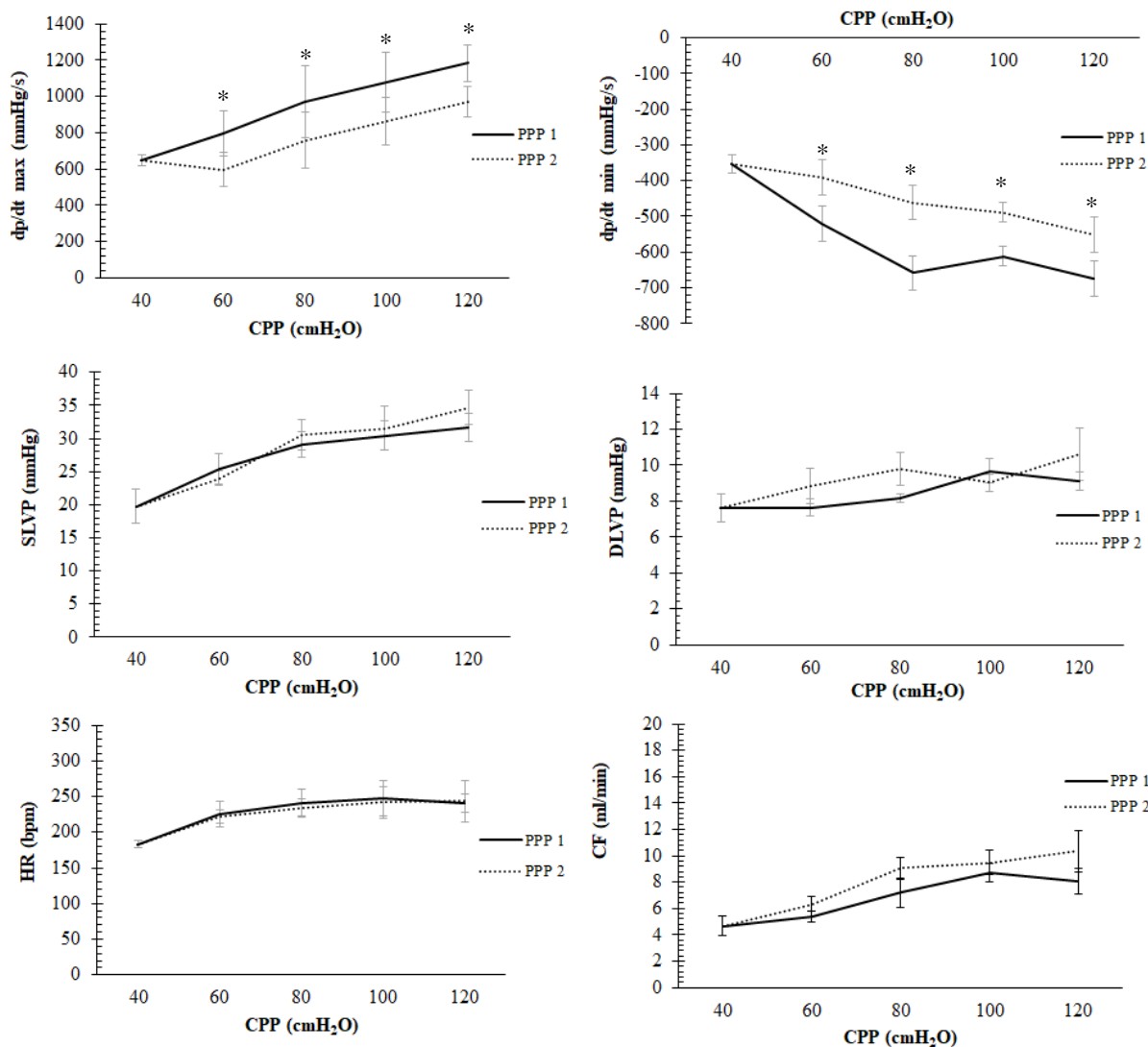


График 11: Вредности кардиодинамских параметара ($dp/dt \max$, $dp/dt \min$, SLVP, DLVP, HR, CF) у групи третираној доксорубицином након третмана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе (СМС + DOX) у два узастопна протокола промене притиска, $dp/dt \max$ – максимална стопа промене притиска у левој комори; $dp/dt \min$ – минимална стопа промене притиска у левој комори; SLVP – систолни притисак леве коморе, DLVP – дијастолни притисак леве коморе, HR – срчана фреквенција, CF – коронарни проток; CPP – коронарни перфузиони притисак; * – статистички значајна разлика при истом перфузионом притиску у оквиру различитих протокола ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); PPP 1 – протокол промене притиска у првом тренутку; PPP 2 – протокол промене притиска у другом тренутку; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација.

Упоредни приказ вредности праћених кардиодинамских параметара јасно указује да доксорубицин делује изразито депресорно на миокард и то при свим перфузионим притисцима на шта указују статистички значајне разлике у вредностима параметара dp/dt max, dp/dt min и SLVP измерених у DOX и CMC + DOX групи у поређењу са онима измереним у CTRL и CMC. Такође, коронарни проток био је нижи у DOX и CMC + DOX групи док је срчана фреквенца била значајно нижа само у DOX групи.

Упоредни приказ вредности кардиодинамских параметара током PPP 1 периода протокола ауторегулације у CTRL, CMC, DOX и CMC + DOX групи представљен је на Графику 12.

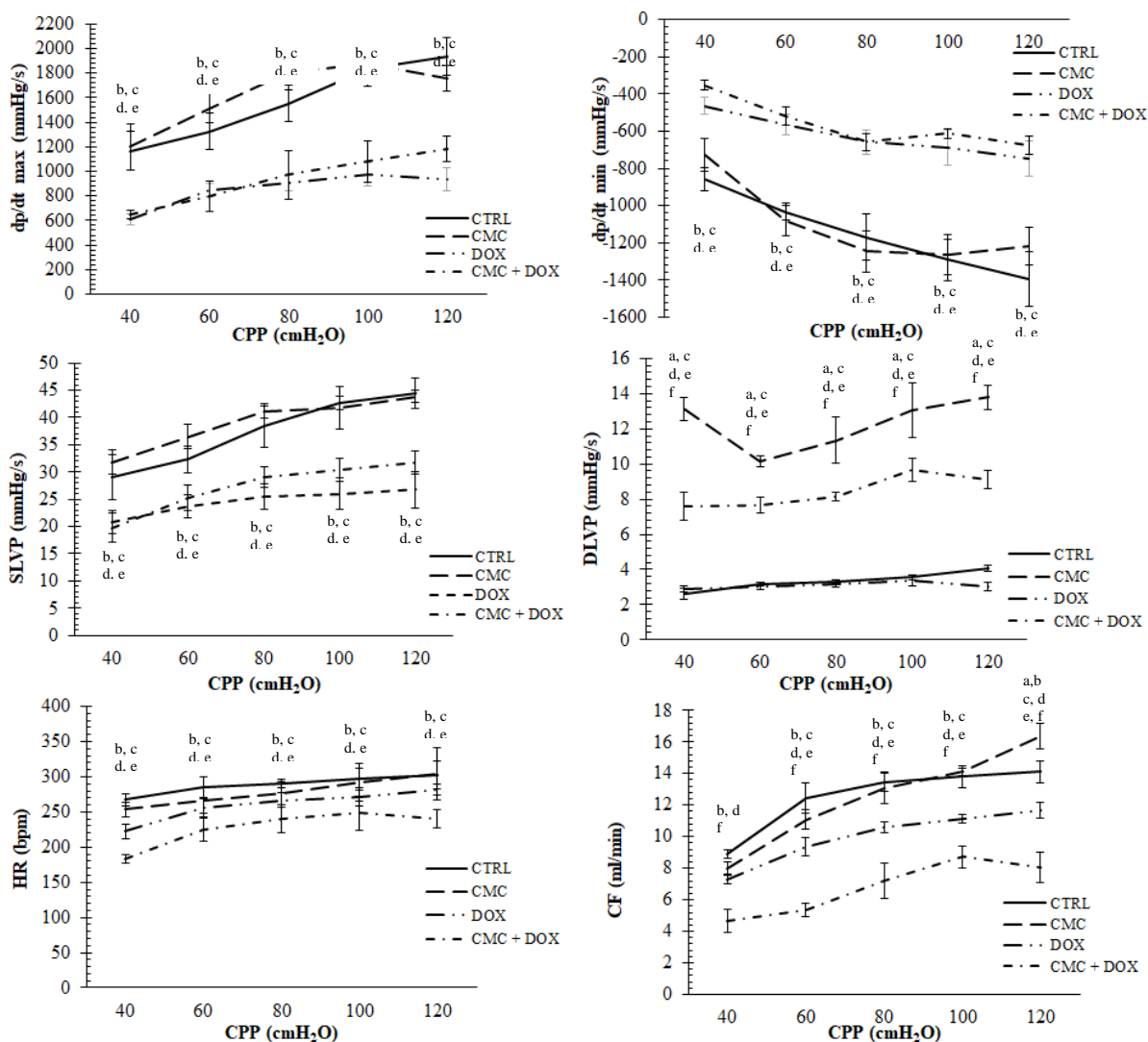


График 12: Упоредни приказ вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR, CF) у контролној групи (CTRL), у групи третираној 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе (CMC), у групи третираној доксорубицином (DOX) и у групи третираној доксорубицином након третмана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе (CMC + DOX) у протоколу промене притиска у првом тренутку, а – статистички значајна разлика између CTRL групе и CMC групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); б – статистички значајна разлика између CTRL групе и DOX групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); с – статистички значајна разлика између CTRL групе и CMC + DOX групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); д – статистички значајна разлика између CMC групе и DOX групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); е – статистички значајна разлика између CMC групе и CMC + DOX групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); ф – статистички значајна разлика између DOX групе и CMC + DOX групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); dp/dt max – максимална стопа промене притиска у левој комори; dp/dt min – минимална стопа промене притиска у левој комори; SLVP – систолни притисак леве коморе, DLVP – дијастолни притисак леве коморе, HR – срчана фреквенција, CF – коронарни проток; CPP – коронарни перфузиони притисак; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација.

4.2.2. Испитивање ефеката примене доксорубина на параметре оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту, крви и ткиву миокарда

4.2.2.1. Спектрофотометријско одређивање параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту

Параметри оксидационог стреса праћени су и у коронарном венском ефлуенту и то током оба протокола промене притиска (PPP 1 и PPP 2). У CTRL групи уочава се тренд пораста концентрације испитиваних параметара са повећањем перфузионог притиска. Такође, уочено је да су вредности свих испитиваних параметара са изузетком супероксид анјон радикала веће током PPP 2 него током PPP 1. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2) у коронарном венском ефлуенту у CTRL групи у два узастопна протокола промене притиска представљене су на **Графику 13**.

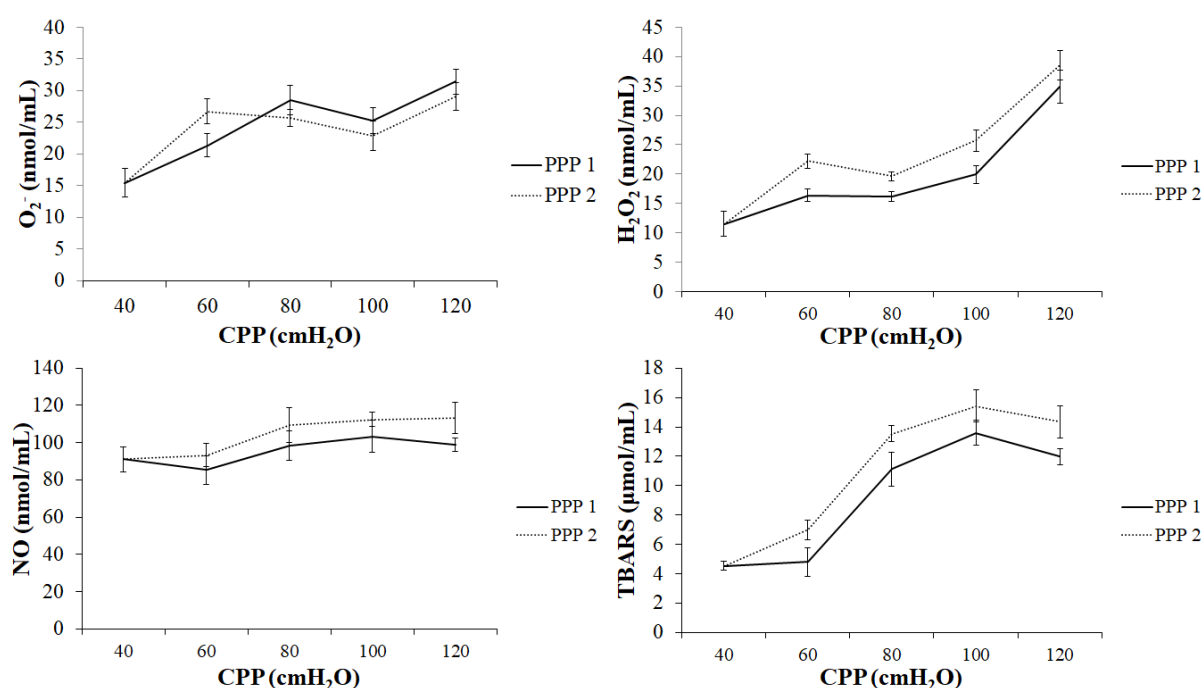


График 13: Вредности прооксидационих параметара (TBARS, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2) у коронарном венском ефлуенту у контролној (CTRL) групи у два узастопна протокола промене притиска, * – статистички значајна разлика при истом перфузионом притиску у оквиру различитих протокола ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); PPP 1 – протокол промене притиска у првом тренутку; PPP 2 – протокол промене притиска у другом тренутку; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација.

Код измерених вредности у СМС групи уочава се сличан тренд као и у CTRL групи, односно пораст вредности са порастом перфузионог притиска, као и веће вредности измерене током PPP 2. Код СМС групе изузетак се појавио у случају нитрита.

Вредности прооксидационих параметара (TBARS, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2) у коронарном венском ефлуенту у СМС групи у два узастопна протокола промене притиска представљене су на **Графику 14**.

У DOX групи уочава се значајан пад вредности свих параметара током PPP 2. Такође, уочава се да је пад вредности измерених параметара највећи при перфузионом притиску од 60 cmH₂O. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2) у коронарном венском ефлуенту у DOX групи у два узастопна протокола промене притиска представљене су на **Графику 15**.

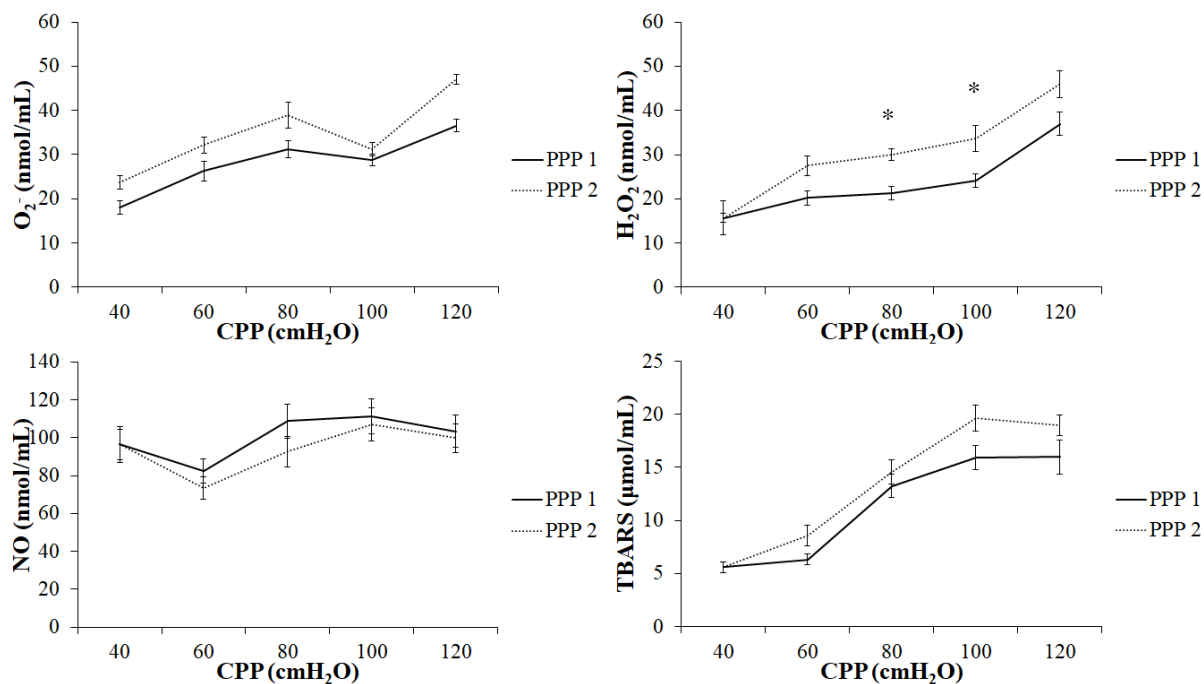


График 14: Вредности прооксидационих параметара ($TBARS$, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2) у коронарном венском ефленту у групи третираној 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе (CMC) у два узастопна протокола промене притиска * – статистички значајна разлика при истом перфузионом притиску у оквиру различитих протокола ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); PPP 1 – протокол промене притиска у првом тренутку; PPP 2 – протокол промене притиска у другом тренутку; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација.

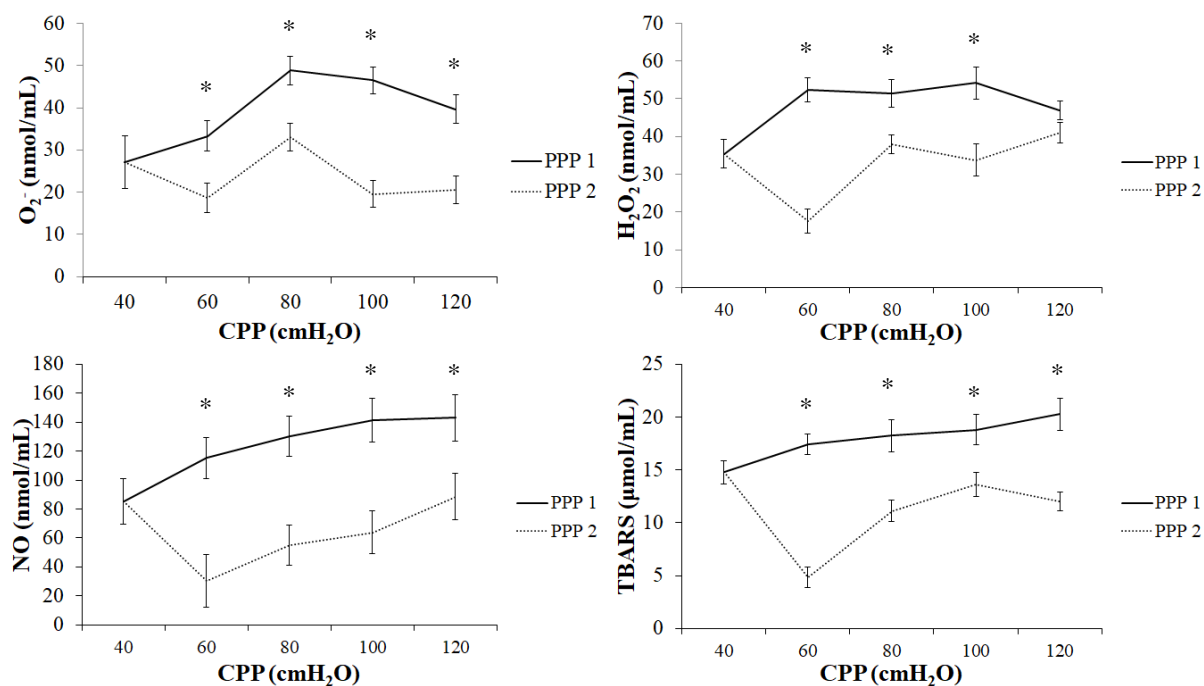


График 15: Вредности прооксидационих параметара ($TBARS$, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2) у коронарном венском ефленту у групи третираној доксорубицином (DOX) у два узастопна протокола промене притиска * – статистички значајна разлика при истом перфузионом притиску у оквиру различитих протокола ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); PPP 1 – протокол промене притиска у првом тренутку; PPP 2 – протокол промене притиска у другом тренутку; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација.

Сличан тренд вредности прооксидационих параметара као и у DOX групи забележен је и у СМС + DOX групи, односно значајно смањење свих вредности током PPP 2, а посебно при вредностима перфузионог притиска од 100 cmH₂O у случају водоник-пероксида, односно 60 cmH₂O у случају свих осталих параметара. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, O₂⁻, NO₂⁻ и H₂O₂) у коронарном венском ефлуенту у СМС + DOX групи у два узастопна протокола промене притиска представљене су на **Графику 16**.

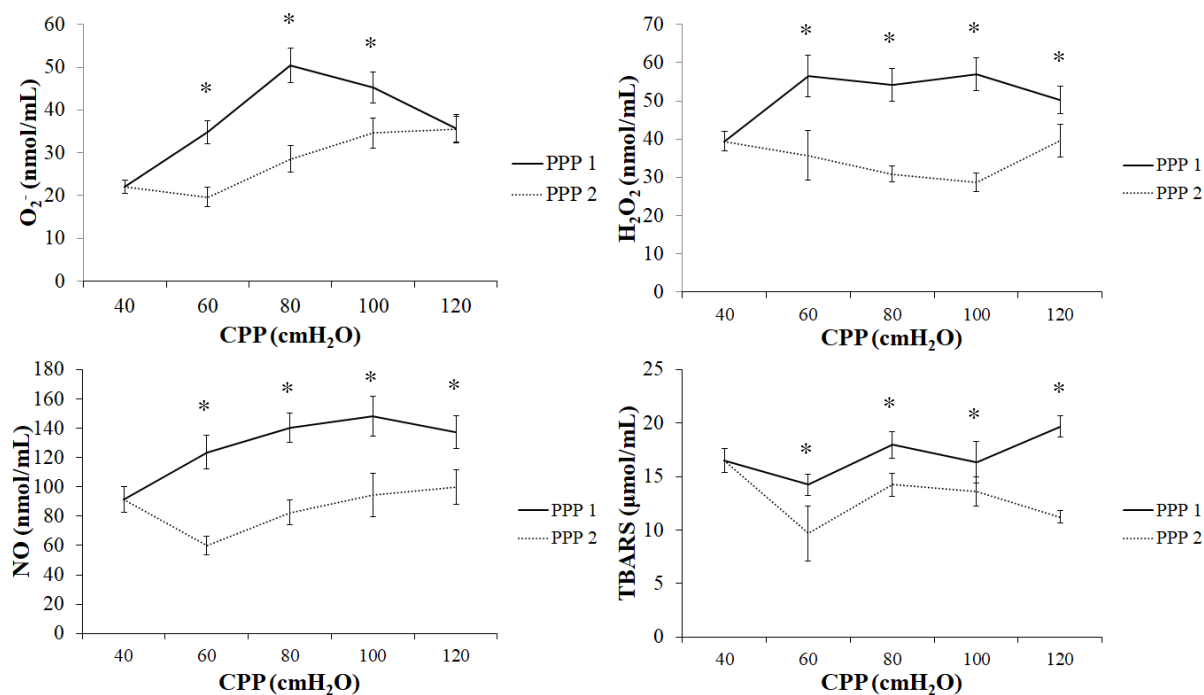


График 16: Вредности прооксидационих параметара (TBARS, O₂⁻, NO₂⁻ и H₂O₂) у коронарном венском ефлуенту у групи третираној доксорубицином након третмана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе (СМС + DOX) у два узастопна протокола промене притиска * – статистички значајна разлика при истом перфузионом притиску у оквиру различитих протокола (p < 0,05 према Tukey HSD тесту); PPP 1 – протокол промене притиска у првом тренутку; PPP 2 – протокол промене притиска у другом тренутку; вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација;

Вредности прооксидационих параметара (TBARS, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2) у коронарном венском ефлуенту за све испитиване групе током протокола промене притиска 1 представљене су на **Графику 17**. Може се уочити да постоји значајна разлика у вредности свих испитиваних параметара и то при готово свим перфузионим притисцима између CTRL и CMC групе и DOX и CMC + DOX групе.

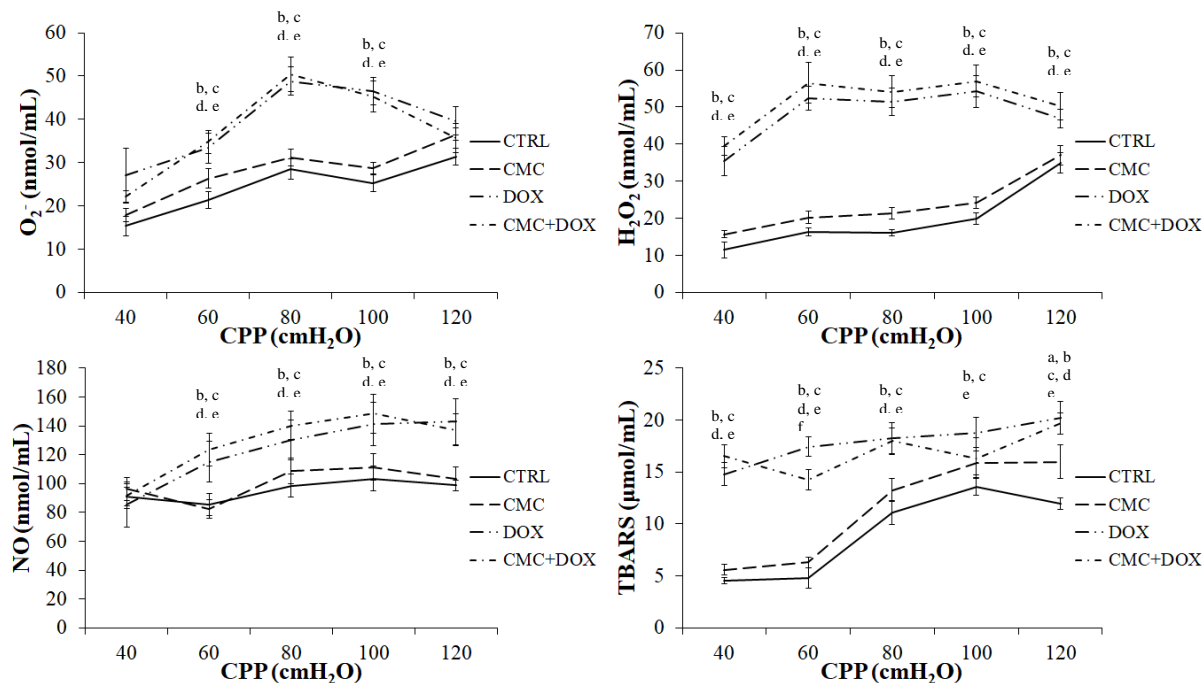


График 17: Комбиновани приказ вредности прооксидационих параметара (TBARS, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2) у коронарном венском ефлуенту у свим испитиваним групама током PPP 1; a – статистички значајна разлика између CTRL групе и CMC групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту) при истом перфузионом притиску; b – статистички значајна разлика између CTRL групе и DOX групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту) при истом перфузионом притиску; c – статистички значајна разлика између CTRL групе и CMC + DOX групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту) при истом перфузионом притиску; d – статистички значајна разлика између CMC групе и DOX групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту) при истом перфузионом притиску; e – статистички значајна разлика између CMC групе и CMC + DOX групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту) при истом перфузионом притиску; f – статистички значајна разлика између DOX групе и CMC + DOX групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту) при истом перфузионом притиску;; CTRL – контролна група; CMC – група третирана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; DOX – група третирана доксорубицином; CMC + DOX – група третирана доксорубицином након третмана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; PPP 1 – протокол промене притиска у првом тренутку; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација.

4.2.2.2. Спектрофотометријско одређивање прооксидационих параметара (TBARS, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2)

Сви испитивани параметри значајно су повећани у DOX групи у поређењу са CTRL и CMC групом. Вредности сва четири испитивана параметра не разликују се значајно у CTRL и CMC групи. У случају водоник-пероксида не постоји значајна разлика између CTRL, CMC и CMC + DOX групе. Вредности индекса липидне пероксидације у CMC + DOX групи не разликују се значајно у поређењу са вредностима у CTRL и CMC групи, али се разликују у поређењу са вредностима у DOX групи (График 18).

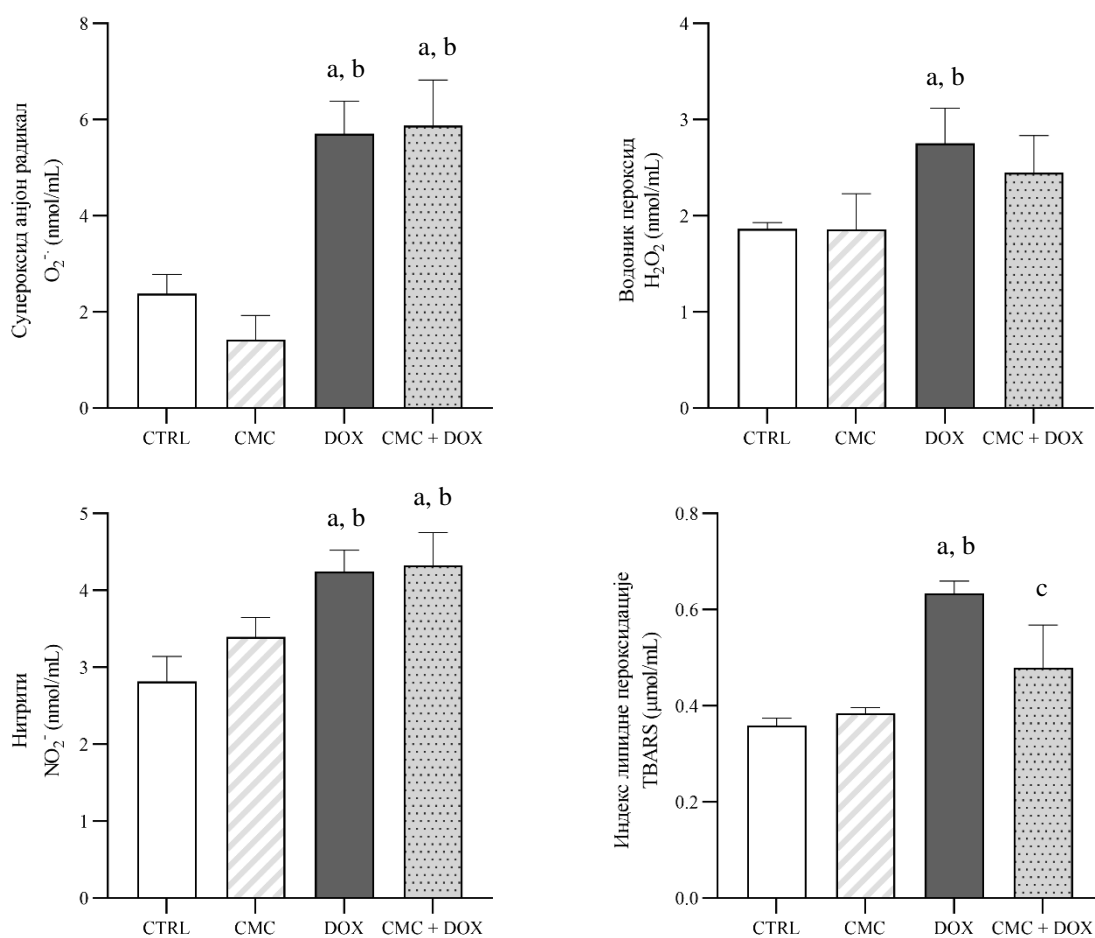


График 18: Вредности системских прооксидационих параметара (TBARS, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2). а – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); б – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); с – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; CMC – група третирана раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; DOX – група третирана доксорубицином; CMC + DOX – група третирана доксорубицином након третмана раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; $n = 10$.

4.2.2.3. Спектрофотометријско одређивање параметара који су укључени у систем антиоксидационе заштите (CAT, SOD и GSH)

Сви испитивани параметри значајно су снижени у DOX групи у поређењу са CTRL и СМС групом. Вредности нивоа редукованог глутатиона и каталазе биле су ниже и у поређењу са СМС + DOX групом, док у случају супероксид дисмутазе није забележена значајана разлика. Вредности испитиваних параметара не разликују се значајно у CTRL и СМС групи изузев у случају каталазе где су у СМС групи забележене ниже вредности нивоа овог параметра у лизату еритроцита. У случају редукованог глутатиона, најнижа вредност забележена је код DOX групе, која се значајно разликовала од остале три, при чему између CTRL, СМС и СМС + DOX групе није било значајне разлике (График 19).

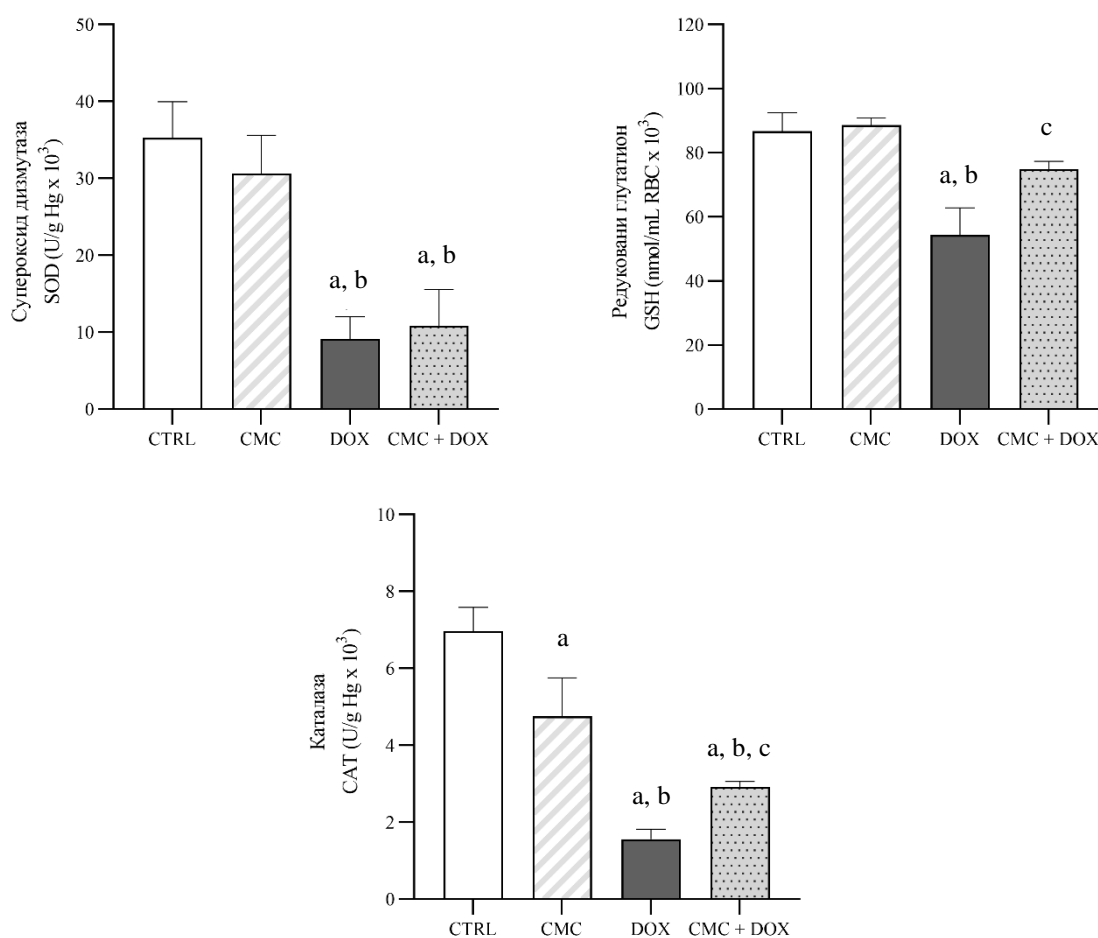


График 19: Вредности системских параметара који су укључени у систем антиоксидационе заштите (CAT, SOD и GSH). a – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); b – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); c – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; DOX – група третирана доксорубицином; СМС – група третирана раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; СМС + DOX – група третирана доксорубицином након третмана раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; $n = 10$.

4.2.2.4. Спектрофотометријско одређивање параметара оксидационог стреса у хомогенату ткива миокарда

У случају супероксид анјон радикала вредности у DOX групи и CMC + DOX групи биле су 3-4 пута више у поређењу са вредностима у CTRL и CMC групи. Вредности водоник пероксида биле су највише у DOX групи, али је разлика била значајна само у односу на CTRL групу. Вредности у DOX групи биле су највише и у случају индекса липидне пероксидације, али је разлика била значајна у односу и на CTRL и на CMC групу. Вредности нитрита нису се значајно разликовале међу испитиваним групама (**График 20**).

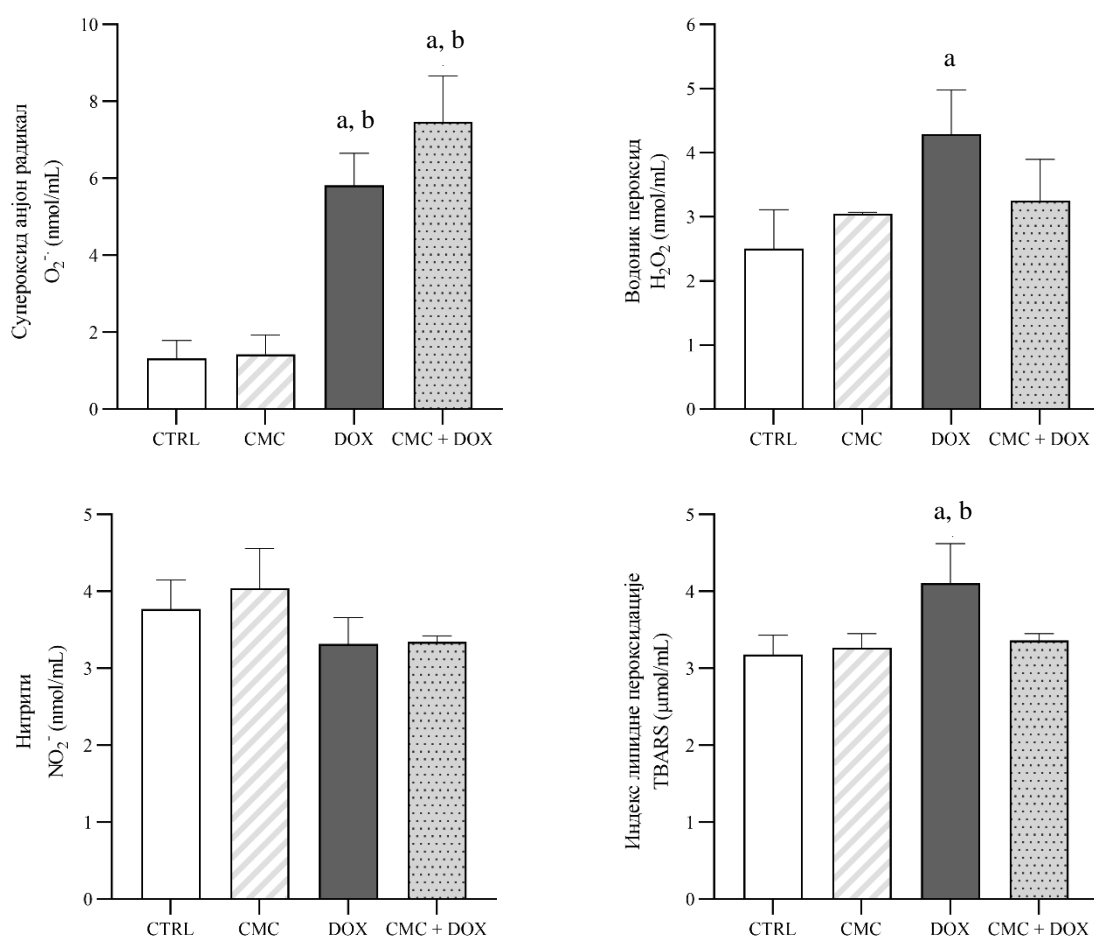


График 20: Вредности прооксидационих параметара (TBARS, $O_2^{\cdot -}$, NO_2^- и H_2O_2) у хомогенату ткива миокарда. а – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); б – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); с – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; DOX – група третирана доксорубицином; CMC – група третирана раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; CMC + DOX – група третирана доксорубицином након третмана раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; $n = 10$.

4.2.2.5. Спектрофотометријско одређивање параметара који су укључени у систем антиоксидационе заштите (CAT, SOD и GSH) у хомогенату ткива миокарда

Вредности свих параметара антиоксидационе заштите биле су значајно снижене у DOX групи и CMC + DOX групи у поређењу са CTRL групом. Највећи пад забележен је у код ензима супероксид-дисмутазе где је вредност у DOX групи била двоструко нижа него у CTRL групи (График 21).

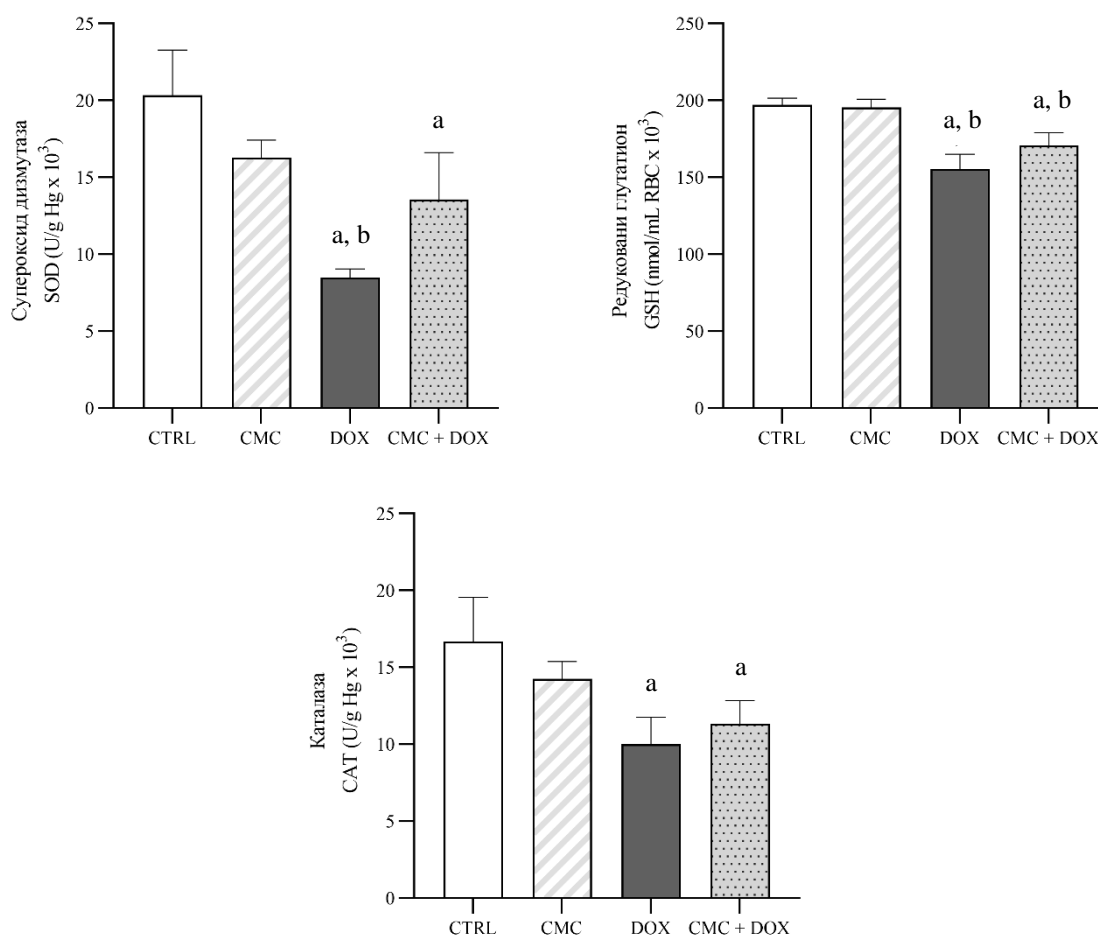


График 21: Вредности параметара који су укључени у систем антиоксидационе заштите (CAT, SOD и GSH) у хомогенату ткива миокарда. а – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); б – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); с – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; DOX – група третирана доксорубицином; CMC – група третирана раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; CMC + DOX – група третирана доксорубицином након третмана раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; $n = 10$.

4.2.3. Испитивање ефеката примене доксорубина на биохемијске маркере срчане функције и маркере инфламације

4.2.3.1. Испитивање ефеката примене доксорубина на активност срчаних ензима

У оквиру одређивања активности срчаних ензима код експерименталних животиња одређени су следећи параметри: С-реактивни протеин (CRP) као општи маркер инфламаторног процеса у организму, лактатна-деhidрогеназа (LDH) као системски показатељ оштећења мишићног ткива, креатинфосфокиназа МВ (СК-МВ), која такође указује на оштећење мишићног ткива и тропонин I (ТnI) који указује на специфично оштећење миокарда.

На почетку експеримента одређене су просечне вредности CRP, LDH, СК-МВ и СТn-I за све експерименталне животиње нултог дана истраживања. Ова вредност не разликује се значајно у односу на вредности измерене у контролној групи на крају експеримента за било који од испитиваних параметара. Овакви подаци указују да су све групе на почетку експеримента биле хомогене и међусобно упоредиве.

На **Графику 22** представљене су вредности нивоа високо специфичног С-реактивног протеина (CRP), ензима лактатне дехидрогеназе (LDH), ензима креатин-фосфокиназе МВ (СК-МВ) и тропонина I (СТn-I) у серуму према експерименталним групама

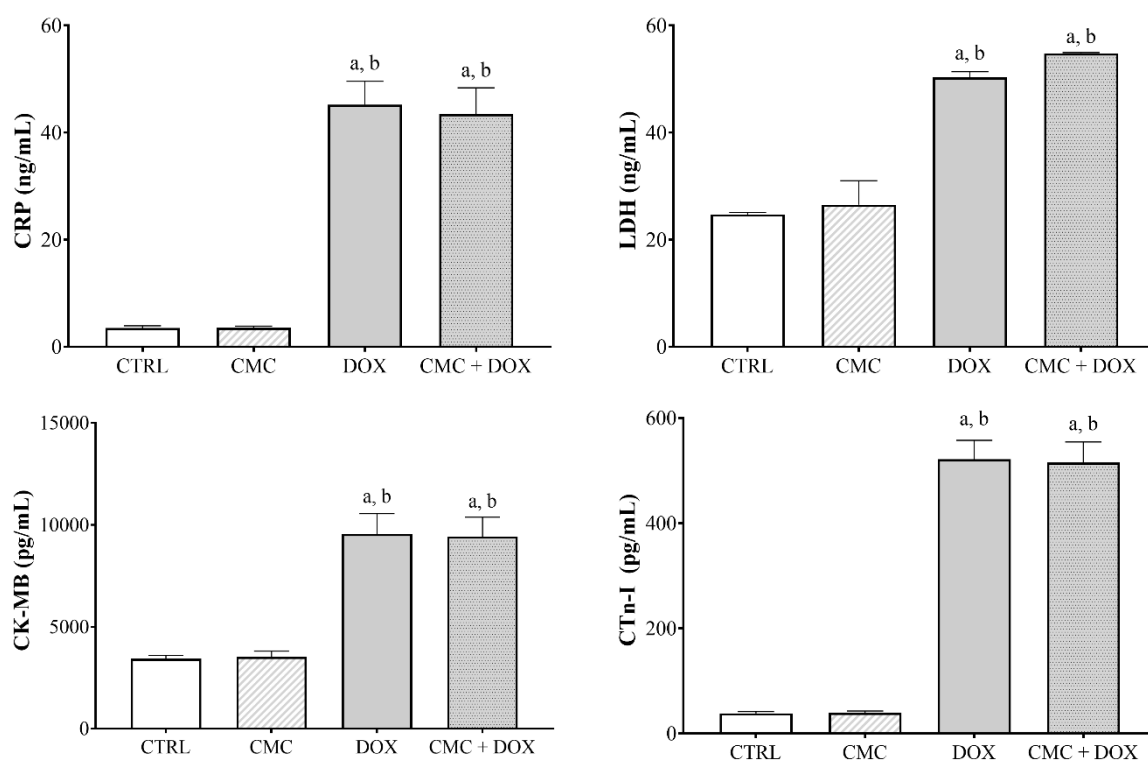


График 22: Вредности нивоа високо специфичног С-реактивног протеина (CRP), ензима лактатне дехидрогеназе (LDH), ензима креатин-фосфокиназе МВ (СК-МВ) и тропонина I (СТn-I) у серуму изражене у нанограмима по милилитру за CRP и LDH (ng/mL) и у пикограмима по милилитру за СК-МВ и СТn-I (pg/mL) према експерименталним групама; а – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); б – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; CMC – група третирана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; DOX – група третирана доксорубицином; CMC + DOX – група третирана доксорубицином након третмана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; $n = 10$.

Вредности нивоа високо специфичног С-реактивног протеина су уједначене и ниске у групама које нису биле третиране доксорубицином. Највише вредности нивоа високо специфичног С-реактивног протеина уочавају се код DOX групе и СМС + DOX групе, а вредности су и до 10 пута веће у поређењу са CTRL и СМС групом. За поређење вредности међу групама искоришћен је тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест), при чему је $F=340,80$, а $p<0,001$.

Вредности LDH значајно више у DOX и СМС + DOX групи у поређењу са референтним групама које нису третиране доксорубицином или у поређењу са CTRL и СМС групом. За поређење вредности међу групама искоришћен је тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест), при чему је $F=331,40$, а $p<0,001$.

Вредности ензима СК-МВ уједначене су у CTRL и СМС групи. Обе групе третиране доксорубицином имају значајно повишене вредности ензима СК-МВ. За поређење вредности међу групама искоришћен је тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест), при чему је $F=154,90$, а $p<0,001$.

Може се уочити да су вредности СТп-I у серуму и до 12 пута више у групама које су третиране доксорубицином у поређењу са групама које нису третиране доксорубицином током експерименталног протокола. За поређење вредности међу групама искоришћен је тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест), при чему је $F=733,90$, а $p<0,001$.

4.2.3.2. Испитивање утицаја примене доксорубицина на маркере инфламације

У оквиру одређивања маркера инфламације код експерименталних животиња одређени су следећи параметри: Проинфламаторни цитокини карактеристични за Th1 имунски одговор и то интерлеукин-1 α (IL-1 α) и интерлеукин 8 (IL-8), антиинфламаторни цитокини карактеристични за Th2 имунски одговор и то интерлеукин-4 (IL-4) и интерлеукин 10 (IL-10), као и трансформишући фактор раста β (TGF β).

Тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест) коришћен је за поређење вредности међу групама за проинфламаторне цитокине при чему су добијене вредности $F=108,20$ ($p<0,001$) за IL-1 α и $F=181,90$ ($p<0,001$) за IL-8.

На **Графику 23** представљене су вредности проинфламаторних цитокина интерлеукина-1 α (IL-1 α) и интерлеукина 8 (IL-8) према експерименталним групама.

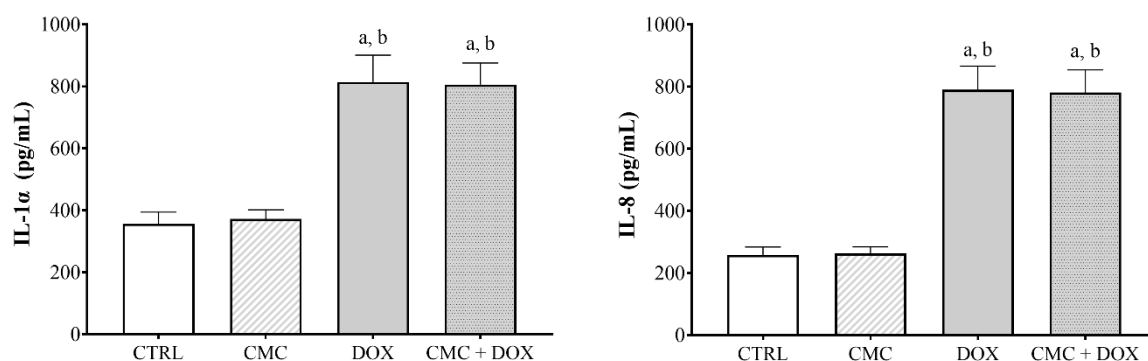


График 23: Вредности проинфламаторних цитокина интерлеукина-1 α (IL-1 α) и интерлеукина 8 (IL-8) у серуму, према експерименталним групама.; a – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p<0,05$ према Tukey HSD тесту); b – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе ($p<0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; СМС – група третирана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; DOX – група третирана доксорубицином; СМС + DOX – група третирана доксорубицином након третмана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; $n = 10$.

Код оба мерена проинфламаторна цитокина уочено је да су вредности двоструко више у DOX групи и CMC + DOX групи у поређењу са CTRL групом и CMC групом. Између CTRL и CMC група, као и између DOX и CMC + DOX групе није постојала значајна разлика у измереним вредностима ових параметара.

Тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест) коришћен је за поређење вредности међу групама за антиинфламаторне цитокине при чему су добијене вредности $F=32,84$ ($p<0,001$) за IL-4, $F=180,50$ ($p<0,001$) за IL-10 α и $F=45,65$ ($p<0,001$) за TGF β .

На **Графику 24** представљене су вредности антиинфламаторних цитокина интерлеукина-4 (IL-4), интерлеукина-10 (IL-10) и трансформишућег фактора раста β (TGF β) према експерименталним групама.

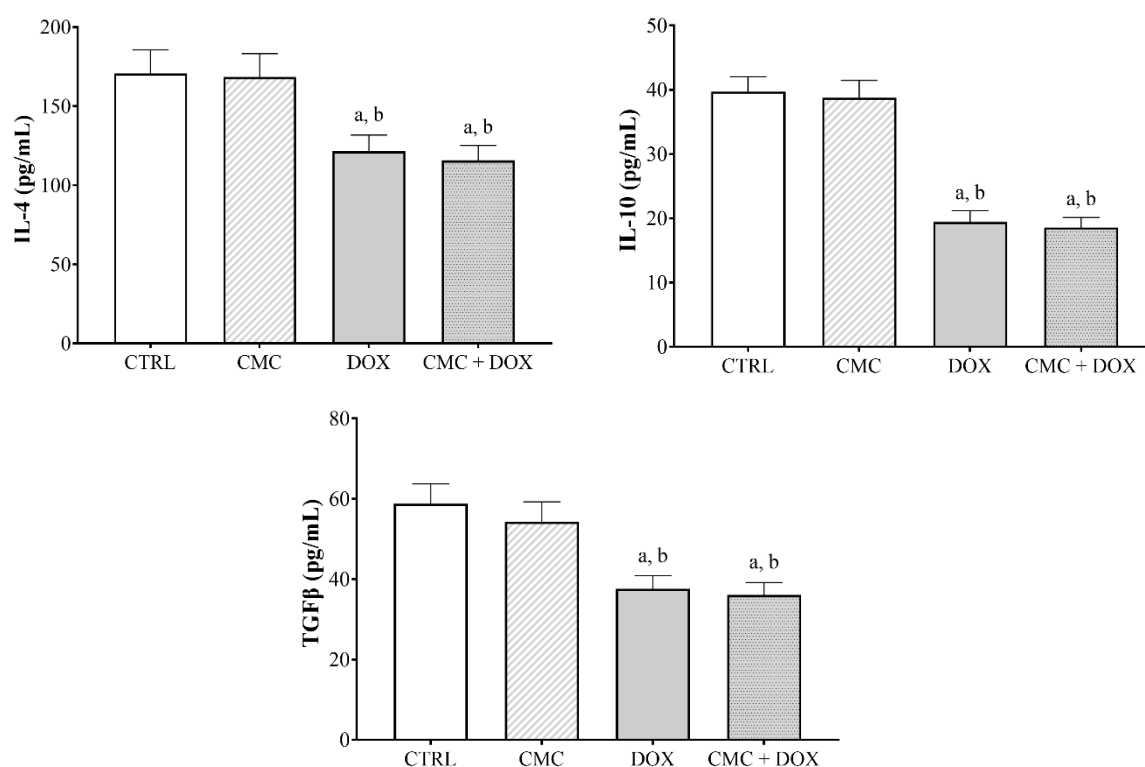


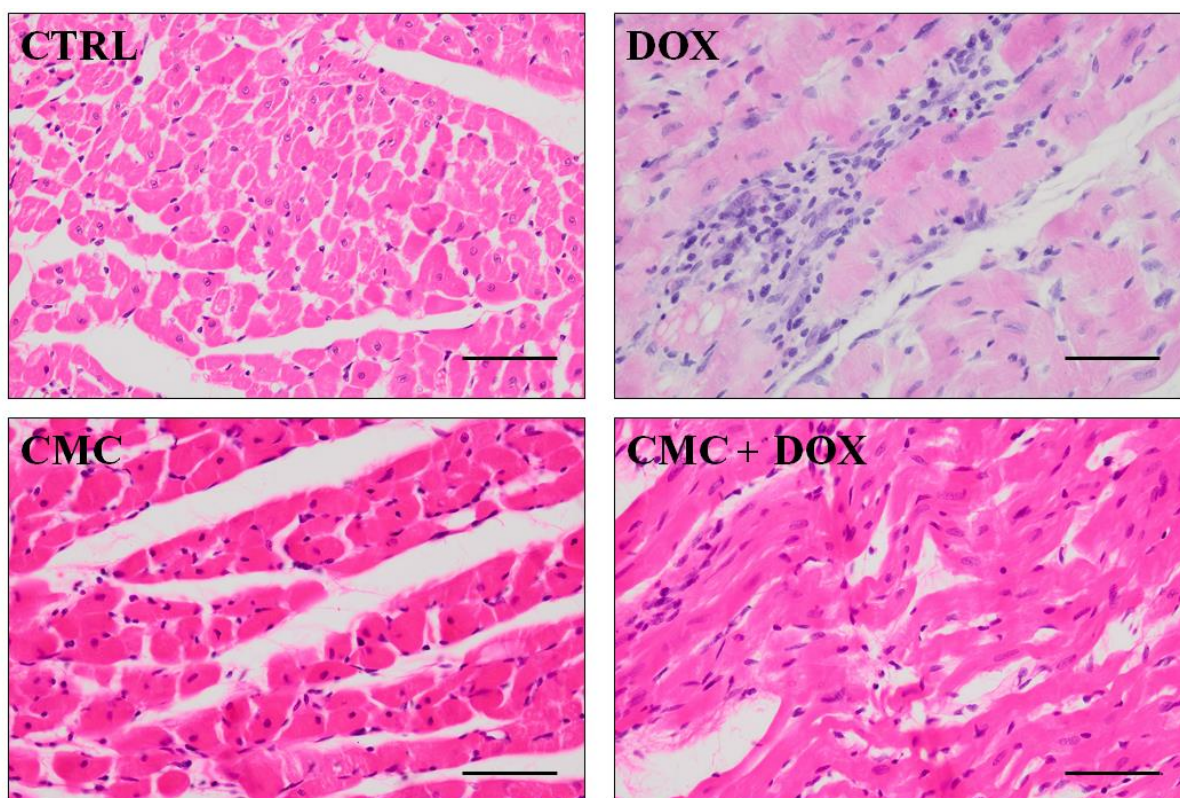
График 24: Вредности антиинфламаторних цитокина интерлеукина-4 (IL-4), интерлеукина-10 (IL-10) и трансформишућег фактора раста β (TGF β) у серуму, према експерименталним групама.; a – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p<0,05$ према Tukey HSD тесту); b – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе ($p<0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; CMC – група третирана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; DOX – група третирана доксорубицином; CMC + DOX – група третирана доксорубицином након третмана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; $n = 10$

Код свих мерених антиинфламаторних цитокина карактеристичних за Th2 имунски одговор уочен је сличан тренд добијених вредности и то да су вредности у групама третираним доксорубицином (DOX група и CMC + DOX група) значајно ниже у поређењу са CTRL и CMC групом. Између CTRL и CMC групе, као и између DOX и CMC + DOX групе није постојала значајна разлика у измереним вредностима ових параметара.

4.2.4. Испитивање ефеката примене доксорубицина на патохистолошке карактеристике ткива миокарда

4.2.4.1. Испитивање ефеката примене доксорубицина на ткиво миокарда- бојење хематоксилин-еозин методом

У контролној групи пацова (CTRL) уочава се регуларна морфолошка грађа срца, без присуства морфолошких промена. Распоред мишићних влакана је регуларан, једра су еухроматична, не уочава се хипертрофија и присуство таласастих влакана, као ни присуство дегенеративних промена, инфламације, ћелијског инфилтрата и едема интерстицијума. У групи третираној доксорубицином (DOX) уочава се хипертрофија мишићних влакана, таласаста влакна, ћелијски инфилтрат, издужена једра и едем интерстицијума. У групи третираној раствором натријум-карбоксиметил целулозе (СМС) уочава се регуларан распоред мишићних влакана без присуства таласастих влакана, инфламације и едема интерстицијума односно налаз сличан оном у CTRL групи. У групи животиња третираној доксорубицином након примене раствора натријум-карбоксиметил целулозе (СМС+DOX) уочава се хипертрофија мишићних влакана са хипертрофијом појединачних једара, имфламација, таласаста влакна, едем интерстицијума и издужена једра. Овакав налаз указује да натријум-карбоксиметилцелулоза самостално нема протективни ефекат у контексту доксорубицином изазване кардиотоксичности. Ткивни пресеци миокарда испитиваних група бојени хематоксилин/еозин техником представљени су на **Слици 11**.



Слика 11: Ткивни пресеци миокарда испитиваних група бојени хематоксилин/еозин техником. CTRL – контролна група; DOX – група третирана доксорубицином; СМС – група третирана раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; СМС + DOX – група третирана доксорубицином након третмана раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; Е – група третирана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; Е + DOX – група третирана доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA – група третирана уснинском

киселином у дози 25 mg/kg; UA + DOX – група третирана доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; коришћено увећање 40x; величина скале 10 μ m.

4.2.4.2. Испитивање ефеката примене доксорубицина на фиброзу миокарда и садржај колагена применом Picosirius red методе

Садржај колагена у срчаном мишићу повећан је у већини експерименталних група у поређењу са вредностима забележеним у контролној групи (CTRL). У групи третираној доксорубицином (DOX) забележено је повећање садржаја колагена за 118%, односно за 127% у групи животиња третираној натријум-карбоксиметилцелулозом након које је примењена кумулативна доза доксорубицина (СМС + DOX). У групи третираној само натријум-карбоксиметилцелулозом (СМС) садржај колагена смањено се за 3% у поређењу са контролном групом. Утврђено је да постоји значајна разлика у садржају колагена међу испитиваним групама ($F=54,13$; $p<0,001$). Садржај колагена у ткивним исечцима миокарда према испитиваним групама представљен је на **Графику 25**. Ткивни пресеци миокарда свих испитиваних група бојени применом Picosirius red методе у циљу откривања фиброзе и идентификације колагена представљени су на **Слици 12**.

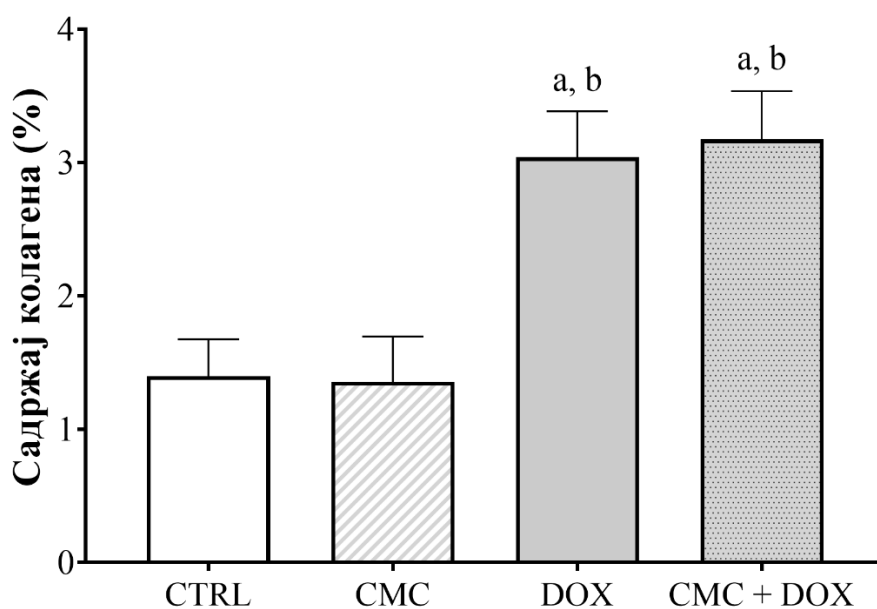
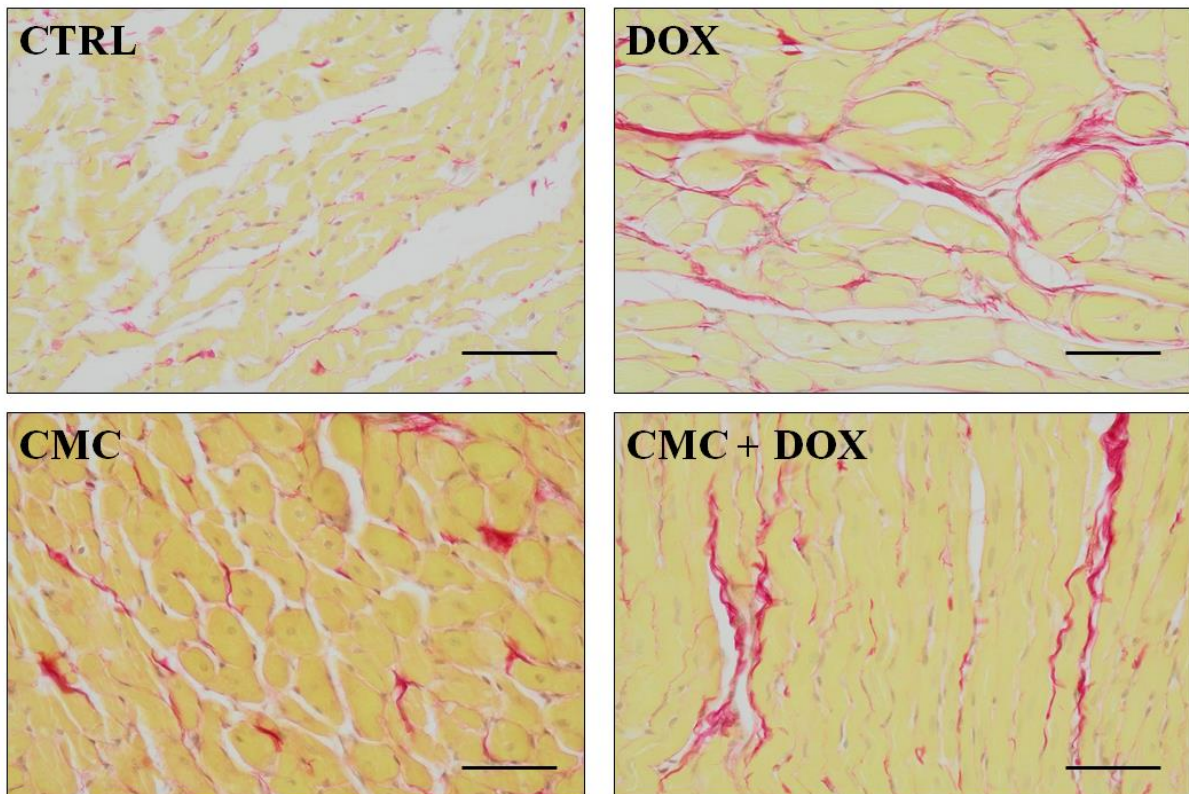


График 25: Садржај колагена у процентима у ткивним исечцима миокарда према испитиваним групама. а – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p<0,05$ према Tukey HSD тесту); b – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе ($p<0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; СМС – група третирана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; DOX – група третирана доксорубицином; СМС + DOX – група третирана доксорубицином након третмана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе.



Слика 12: Ткивни пресеци миокарда испитиваних група бојени Picrosirius Red техником. CTRL – контролна група; DOX – група третирана доксорубицином; CMC – група третирана раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; CMC + DOX – група третирана доксорубицином након третмана раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; E – група третирана ацетонским екстрактом лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; E + DOX – група третирана доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA – група третирана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; UA + DOX – група третирана доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; коришћено увећање 40x; величина скале 10 μ m.

4.2.5. Испитивање ефеката примене доксорубина на релативну експресију гена укључених у оксидациони стрес, апоптозу и инфламацију у левој комори срца

4.2.5.1. Релативна експресија гена укључених у оксидациони стрес у левој комори срца

Испитана је релативна експресија следећих гена укључених у оксидациони стрес: ген за супероксид дисмутазу 1 (SOD-1), ген за супероксид дисмутазу 2 (SOD-2) и ген за ендотелну азот-моноксид синтетазу (eNOS).

Тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест) коришћен је за поређење вредности међу групама за све испитиване гене при чему су добијене вредности $F=64,61$ ($p<0,001$) за SOD-1, $F=75,73$ ($p<0,001$) за SOD-2 и $F=81,98$ ($p<0,001$) за eNOS. Релативна експресија гена удружених са оксидационим стресом (SOD-1, SOD-2 и eNOS) представљена је на **Графику 26**.

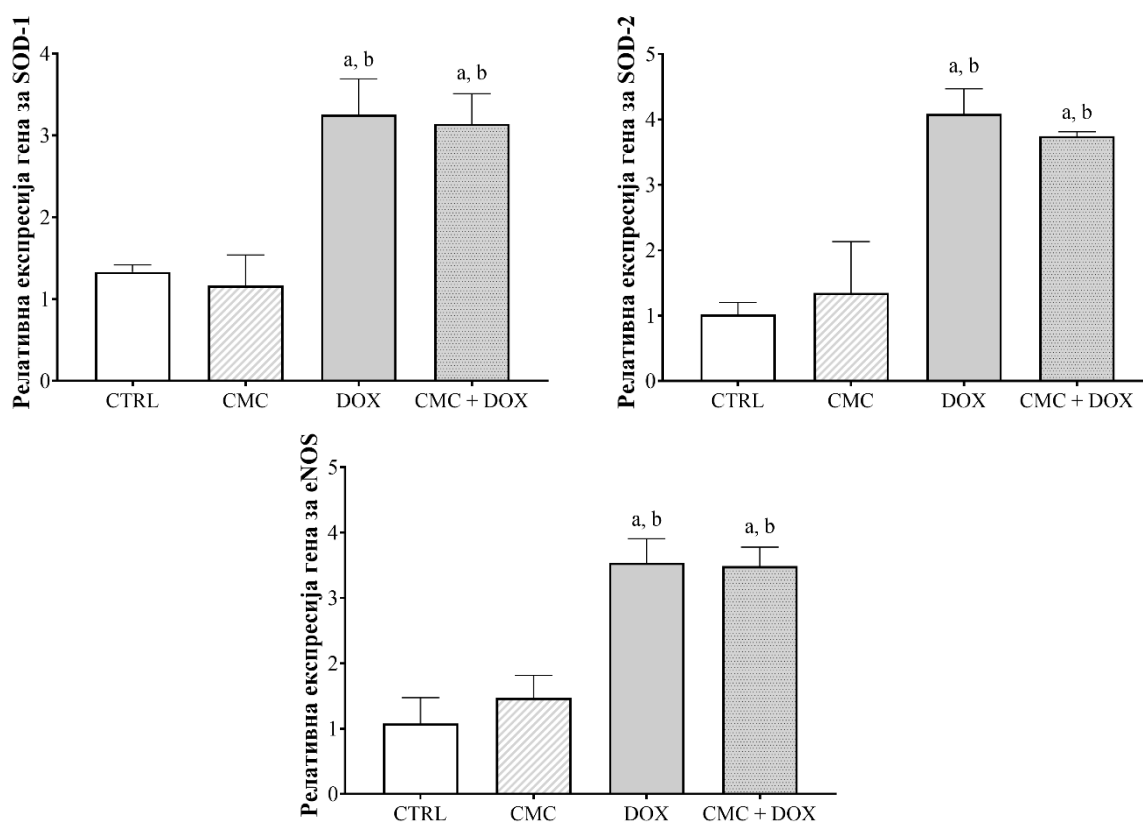


График 26: Релативна експресија гена удружених са оксидационим стресом (ген за супероксид дисмутазу 1 (SOD-1), ген за супероксид дисмутазу 2 (SOD-2) и ген за ендотелну азот-моноксид синтетазу (eNOS)) према експерименталним групама; а – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p<0,05$ према Tukey HSD тесту); б – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе ($p<0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; CMC – група третирана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; DOX – група третирана доксорубицином; CMC + DOX – група третирана доксорубицином након третмана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација; $n = 10$

Код свих испитиваних гена забележен је сличан тренд вредности релативне експресије гена удружених са оксидационим стресом, односно појава да су у групама третираним доксорубицином релативне експресије гена више у поређењу са CTRL групом и CMC групом. Најниже вредности забележене су у контролној групи и групи третираној натријум-карбоксиметилцелулозом, након чега следе вредности у групама третираним доксорубицином. Уочава се да примена доксорубина доводи до повећања релативне

експресије гена удружених са оксидационим стресом за 3-4 пута у поређењу са контролном групом. Такође, није уочено постојање значајне разлике у релативној експресији наведених гена између CMC + DOX и DOX групе.

4.2.5.2. Релативна експресија гена укључених у процес апоптозе у левој комори срца

Испитана је релативна експресија следећих гена укључених у процес апоптозе: ген за Bcl-2 повезани протеин X (Bax), ген за Б-ћелијски лимфом 2 (Bcl-2), ген за каспазу 3 (Cas-3) и ген за каспазу 9 (Cas-9).

Тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест) коришћен је за поређење вредности међу групама за све испитиване гене при чему су добијене вредности $F=225,70$ ($p<0,001$) за Bax, $F=2,25$ ($p=0,113$) за Bcl-2, $F=22,13$ ($p<0,001$) за Cas-3 и $F=58,92$ ($p<0,001$) за Cas-9. Релативна експресија гена удружених са апоптозом (Bax, Bcl-2, Cas-3 и Cas-9) представљена је на **Графику 27**.

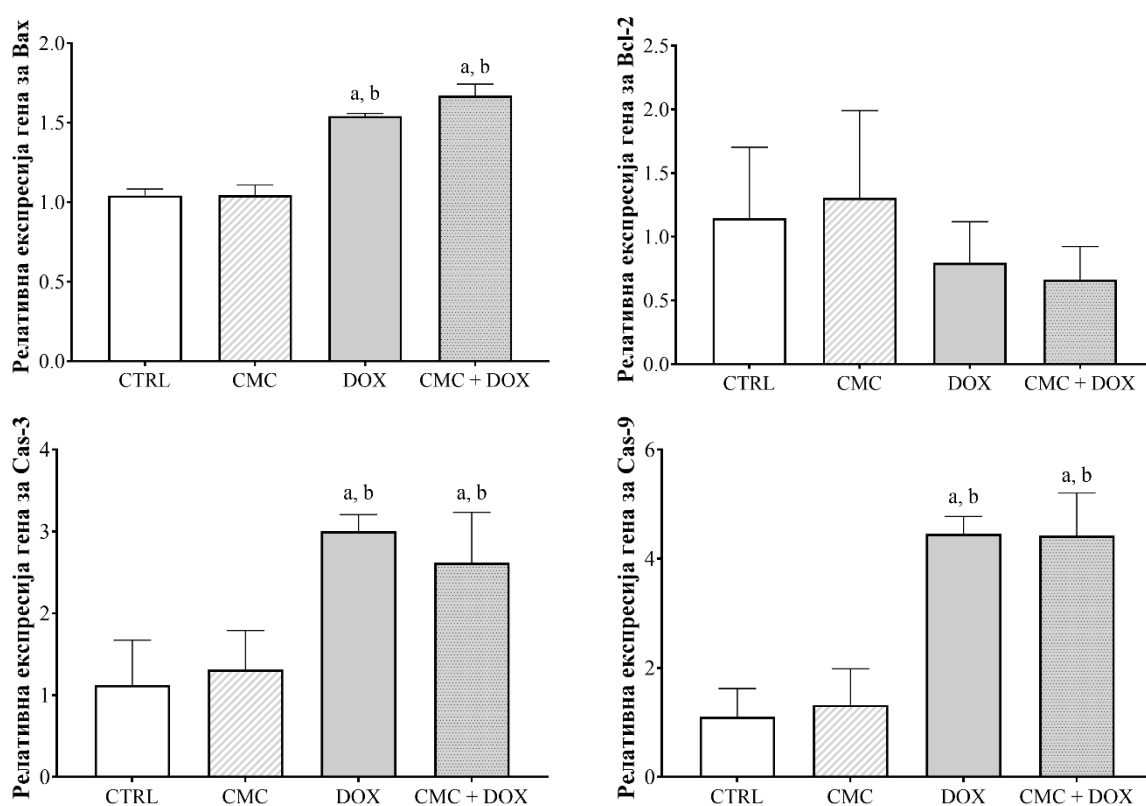


График 27: Релативна експресија гена удружених са апоптозом (ген за Bcl-2 повезани протеин X (Bax), ген за Б-ћелијски лимфом 2 (Bcl-2), ген за каспазу 3 (Cas-3) и ген за каспазу 9 (Cas-9)) према експерименталним групама; a – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p<0,05$ према Tukey HSD тесту); b – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе ($p<0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; CMC – група третирана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; DOX – група третирана доксорубицином; CMC + DOX – група третирана доксорубицином након третмана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација; $n = 10$

Релативна експресија свих проапоптотских гена (Bax, Cas-3 и Cas-9) значајно је увећана у CMC + DOX групи и DOX групи у поређењу са CTRL групом и CMC групом. У случају антиапоптотског гена (Bcl-2) није забележена значајна разлика у релативној експресији гена у свим испитиваним групама, али су вредности у CMC + DOX групи и DOX групи

нешто ниже у поређењу са CTRL групом и СМС групом. Није забележена статистички значајна разлика у релативној експресији свих испитиваних гена како између CTRL групе и СМС групе, тако и између СМС + DOX групе и DOX групе.

4.2.5.3. Релативна експресија гена укључених у процес инфламације у левој комори срца

Испитана је релативна експресија следећих гена укључених у процес инфламације: ген за интерлеукин 6 (IL-6), ген за интерлеукин 10 (IL-10), ген за интерлеукин 13 (IL-13), ген за нуклеарни транскрипциони фактор капа Б (NF-κB) и ген за фактор некрозе тумора α (TNFα).

Тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест) коришћен је за поређење вредности међу групама за све испитиване гене при чему су добијене вредности $F=124,60$ ($p<0,001$) за IL-6, $F=1,82$ ($p=0,176$) за IL-10, $F=13,98$ ($p<0,001$) за IL-13, $F=34,33$ ($p<0,001$) за NF-κB и $F=72,42$ ($p<0,001$) за TNFα. Релативна експресија гена удружених са апоптозом (IL-6, IL-10, IL-13, NF-κB, и TNFα) представљена је на **Графику 28**.

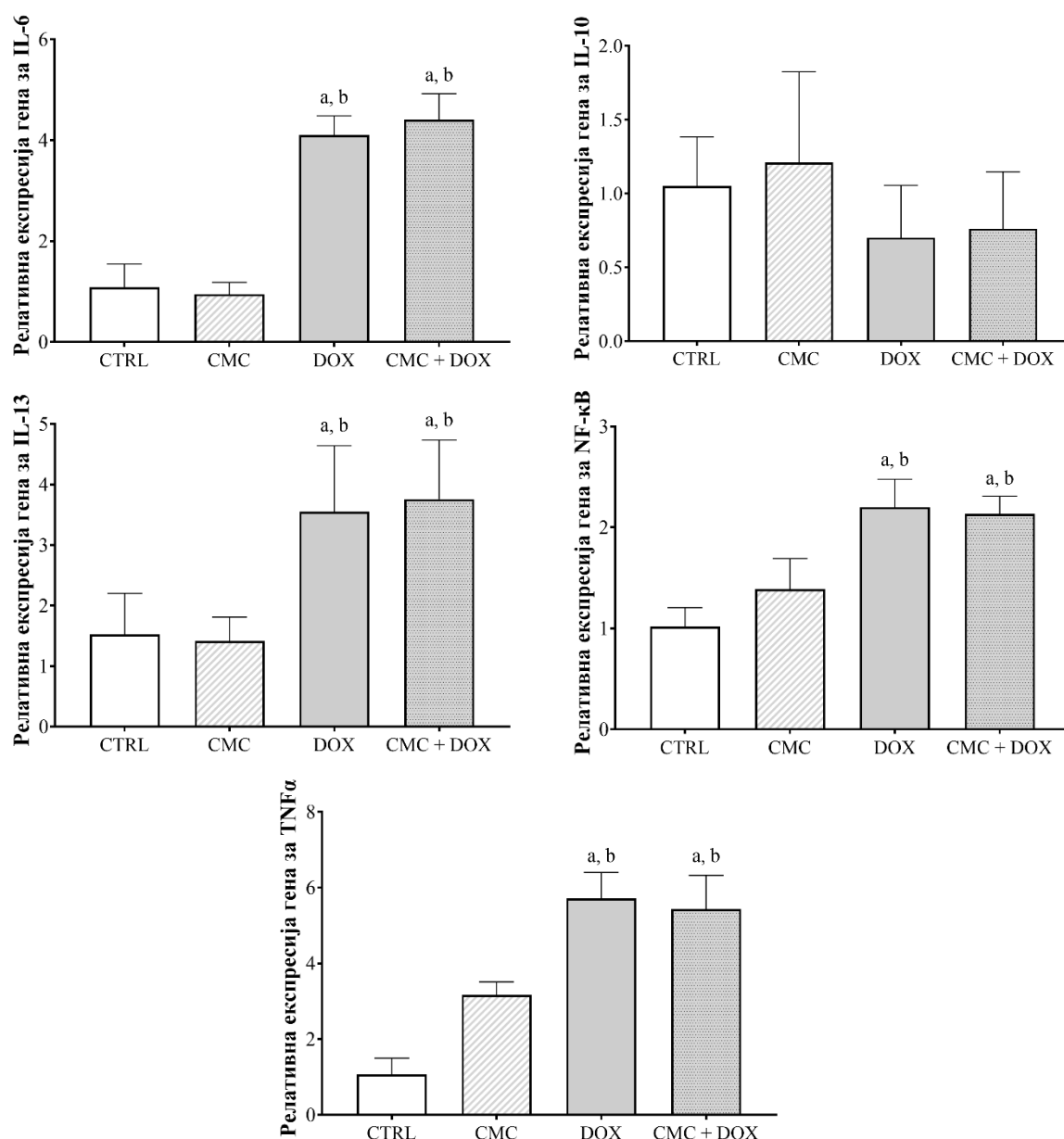


График 28: Релативна експресија гена удружених са инфламацијом (ген за интерлеукин 6 (IL-6), ген за интерлеукин 10 (IL-10), ген за интерлеукин 13 (IL-13), ген за нуклеарни транскрипциони фактор капа Б (NF-κB) и ген за фактор некрозе тумора α (TNFα)) према експерименталним групама; а – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); b – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; СМС – група третирана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; DOX – група третирана доксорубицином; СМС + DOX – група третирана доксорубицином након третмана 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе; вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација; n = 10

Релативна експресија свих проинфламаторних гена (IL-6, IL-13, NF-κB, и TNFα) значајно је увећана у СМС + DOX групи и DOX групи у поређењу са CTRL групом и СМС групом. У случају антиинфламаторног гена (IL-10) није забележена значајна разлика у релативној експресији гена у свим испитиваним групама, али су вредности у СМС + DOX групи и DOX групи нешто ниже у поређењу са CTRL групом и СМС групом. Није забележена статистички значајна разлика у релативној експресији свих испитиваних гена како између CTRL групе и СМС групе, тако и између СМС + DOX групе и DOX групе.

4.3. Испитивање ефекта примене екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на кардиоваскуларни систем пацова

4.3.1. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на хемодинамске параметре и параметре функције срца *ex vivo*

4.3.1.1. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на крвни притисак

Вредности систолног крвног притиска, дијастолног крвног притиска и срчане фреквенције одређене су како је описано у Поглављу 4.2.1.1.. Може се уочити да ацетонски екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинска киселина не утичу значајно на крвни притисак и срчану фреквенцу. Вредности систолног крвног притиска, дијастолног крвног притиска и срчане фреквенције на почетку експеримента и на крају експеримента у испитиваним групама представљене су у Табели 17.

Табела 17: Вредности систолног крвног притиска, дијастолног крвног притиска и срчане фреквенције на почетку експеримента и на крају експеримента према испитиваним групама

Група	Почетак експеримента (Дан 0)		
	SP (mmHg)	DP (mmHg)	HR (bpm)
CTRL	121,55 ± 9,12	81,26 ± 6,01	333,29 ± 26,54
Е	123,67 ± 6,03	78,33 ± 7,02	321,67 ± 17,21
UA	118,12 ± 9,21	79,56 ± 5,86	324,14 ± 25,64
Група	3 дана након примене доксорубицина (Дан 31)		
	SP (mmHg)	DP (mmHg)	HR (bpm)
CTRL	123,67 ± 9,71	83,11 ± 6,56	338,33 ± 28,15
Е	126,16 ± 5,30	81,12 ± 6,24	324,44 ± 16,34
UA	125,75 ± 9,55	82,12 ± 6,24	335,15 ± 27,15

Легенда: SP – систолни притисак; DP – дијастолни притисак; HR – срчана фреквенција; mmHg – милиметар живиног стуба; bpm – број откуцаја у минути; CTRL – контролна група; Е – група третирана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA – група третирана уснинском киселином у дози од 25 mg/kg.

4.3.1.2. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишља *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на ехокардиографске параметре леве коморе

Резултати испитивања ехокардиографских параметара показали су да ацетонски екстракт лишља *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинска киселина немају значајан утицај на функционисање миокарда. Вредности свих испитиваних параметара не разликују се на почетку и на крају истраживања. Вредности ехокардиографских параметара на почетку експеримента и на крају експеримента према испитиваним групама представљени су у Табели 18.

Табела 18. Вредности ехокардиографских параметара на почетку експеримента и на крају експеримента према испитиваним групама

ИП	CTRL		Е		UA	
	Дан 0	Дан 31	Дан 0	Дан 31	Дан 0	Дан 31
IVSd (mm)	1,51 ± 0,09	1,54 ± 0,07	1,50 ± 0,10	1,52 ± 0,06	1,48 ± 0,12	1,55 ± 0,02
LVIDd (mm)	6,44 ± 0,53	6,45 ± 0,54	6,43 ± 0,32	6,43 ± 0,10	6,39 ± 0,73	6,47 ± 0,07
LVPWd (mm)	1,55 ± 0,08	1,55 ± 0,08	1,60 ± 0,05	1,54 ± 0,05	1,45 ± 0,02	1,51 ± 0,02
IVSs (mm)	2,69 ± 0,14	2,72 ± 0,12	2,71 ± 0,13	2,67 ± 0,08	2,55 ± 0,07	2,63 ± 0,03
LVIDs (mm)	3,22 ± 0,26	3,25 ± 0,30	3,22 ± 0,31	3,23 ± 0,04	3,15 ± 0,18	3,22 ± 0,04
LVPWs (mm)	2,83 ± 0,19	2,88 ± 0,14	2,84 ± 0,21	2,83 ± 0,03	2,72 ± 0,11	2,81 ± 0,02
FS (%)	57,5 ± 4,64	57,8 ± 4,49	55,6 ± 1,45	57,6 ± 1,71	56,3 ± 3,15	58,0 ± 1,27

Легенда: ИП – испитивани параметар; IVSd – дебљина зида интервентрикуларног септума на крају дијастоле; LVIDd – унутрашња димензија леве коморе на крају дијастоле; LVPWd – дебљина задњег зида леве коморе на крају дијастоле; IVSs – дебљина зида интервентрикуларног септума на крају систоле; LVIDs – дебљина зида интервентрикуларног септума на крају систоле; LVPWs – дебљина задњег зида леве коморе на крају систоле; FS – проценат фракционог скраћења леве коморе; CTRL – контролна група; Е – група третирана ацетонским екстрактом лишља *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA – група третирана уснинском киселином у дози од 25 mg/kg.

4.3.1.3. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишља *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на параметре функционисања срца *ex vivo*

Кардиодинамски параметри функције срца *ex vivo* у CTRL групи представљени су у Поглављу 4.2.1.3..

У Е групи измерене су сличне вредности кардиодинамских параметара током оба протокола промене притиска са изузетком параметра dp/dt max на притисцима од 80 cmH₂O и 120 cmH₂O, као и параметра dp/dt min на притисцима од 60-120 cmH₂O.

Вредности кардиодинамских параметара током протокола ауторегулације у Е групи представљене су на Графику 29.

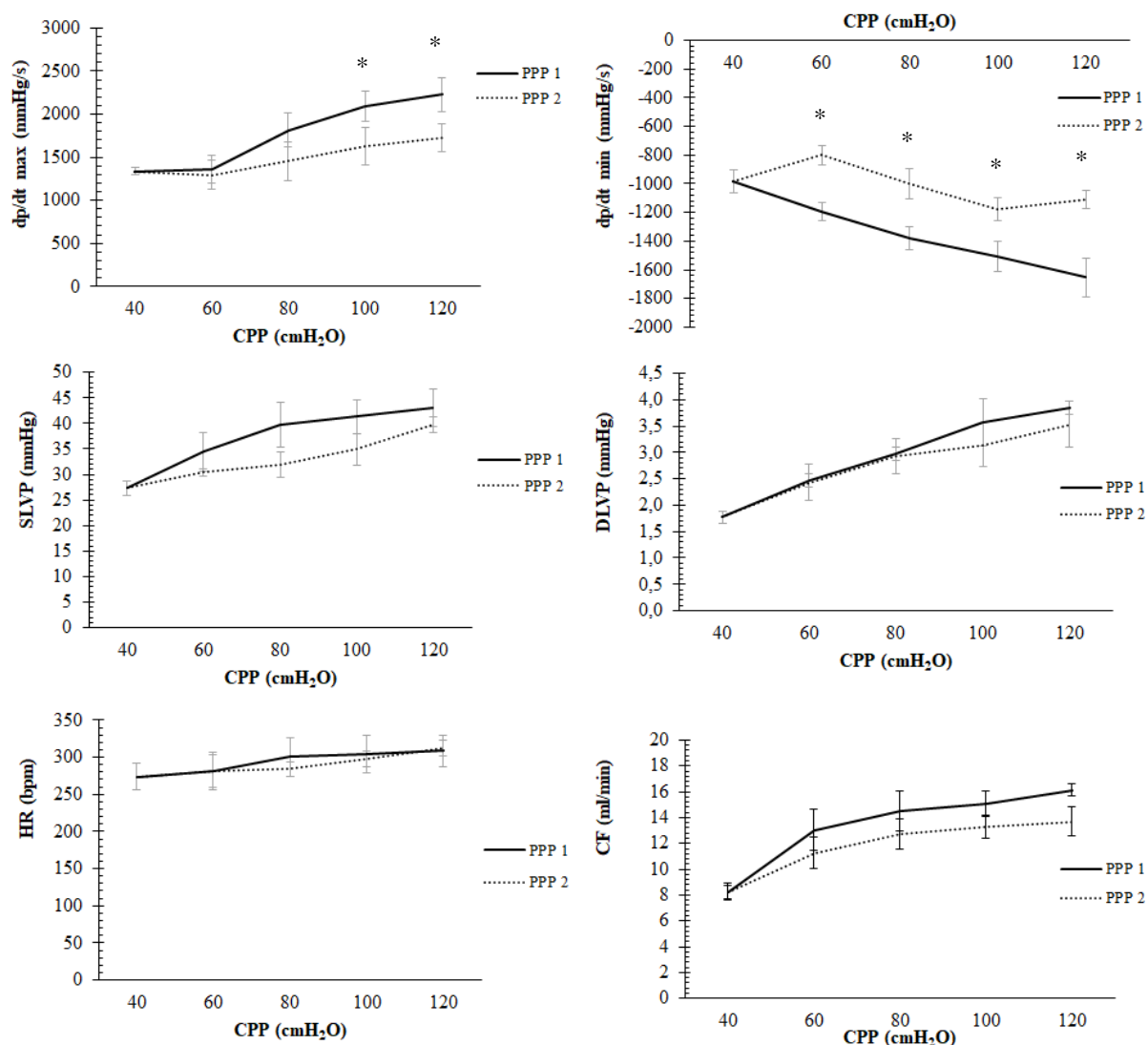


График 29: Вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR, CF) у групи третираној ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg (E) у два узастопна протокола промене притиска, dp/dt max – максимална стопа промене притиска у левој комори; dp/dt min – минимална стопа промене притиска у левој комори; SLVP – систолни притисак леве коморе, DLVP – дијастолни притисак леве коморе, HR – срчана фреквенција, CF – коронарни проток; CPP – коронарни перфузиони притисак; * – статистички значајна разлика при истом перфузионном притиску у оквиру различитих протокола ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); PPP 1 – протокол промене притиска у првом тренутку; PPP 2 – протокол промене притиска у другом тренутку; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација.

У UA групи забележене су сличне вредности кардиодинамских параметара током оба протокола промене притиска са изузетком параметра dp/dt max на притисцима од 60-120 cmH₂O где су забележене више вредности током PPP 2.

Вредности кардиодинамских параметара током протокола ауторегулације у UA групи представљене су на **Графику 30**.

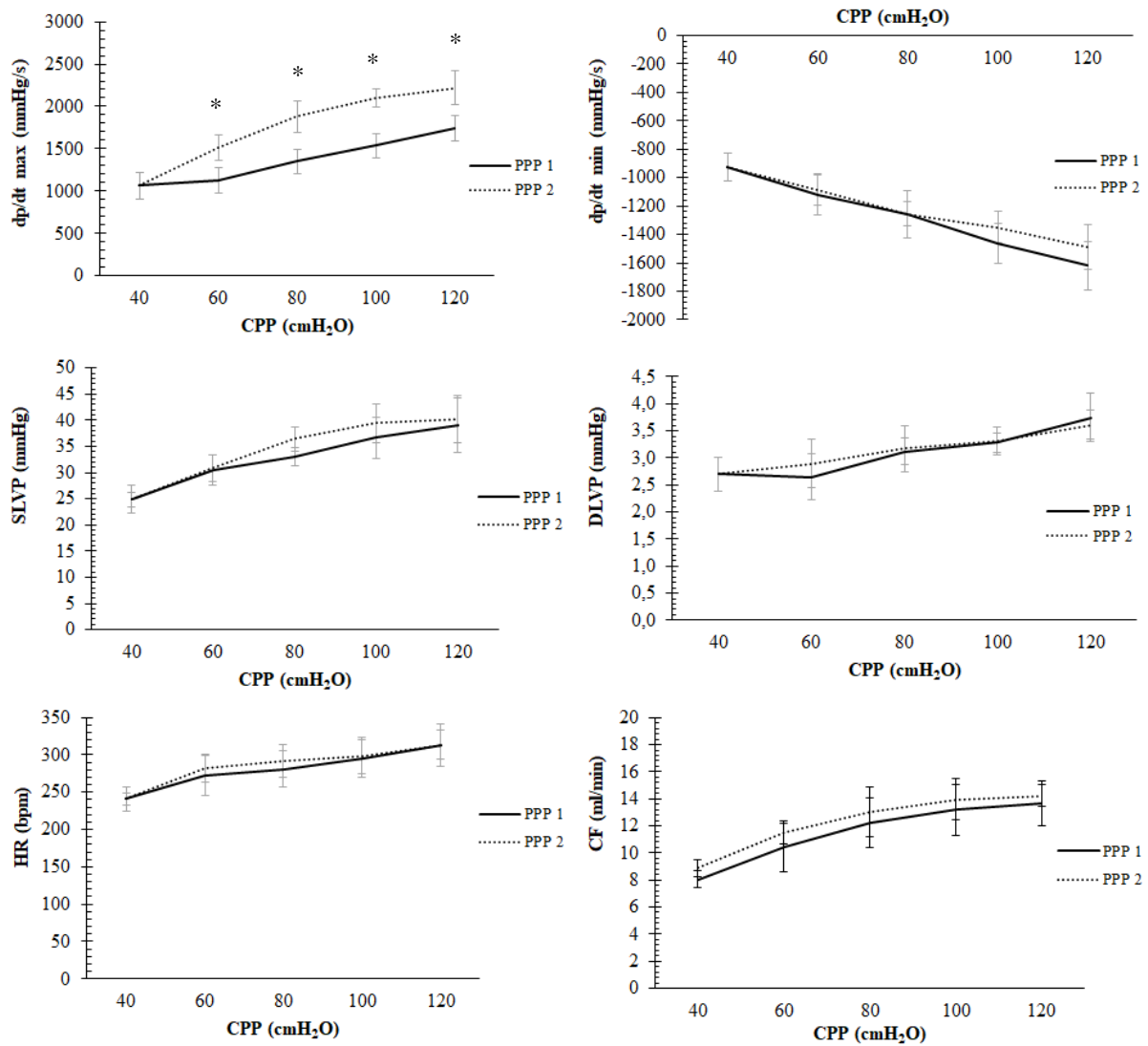


График 30: Вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR, CF) у групи третираној уснинском киселином у дози од 25 mg/kg (UA) у два узастопна протокола промене притиска, dp/dt max – максимална стопа промене притиска у левој комори; dp/dt min – минимална стопа промене притиска у левој комори; SLVP – систолни притисак леве коморе, DLVP – дијастолни притисак леве коморе, HR – срчана фреквенција, CF – коронарни проток; CPP – коронарни перфузиони притисак; * – статистички значајна разлика при истом перфузионом притиску у оквиру различитих протокола (p<0,05 према Tukey HSD тесту); PPP 1 – протокол промене притиска у првом тренутку; PPP 2 – протокол промене притиска у другом тренутку; вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација.

Упоредни приказ вредности кардиодинамских параметара током PPP 1 периода протокола ауторегулације у CTRL, E и UA групи представљен је на **Графику 31**.

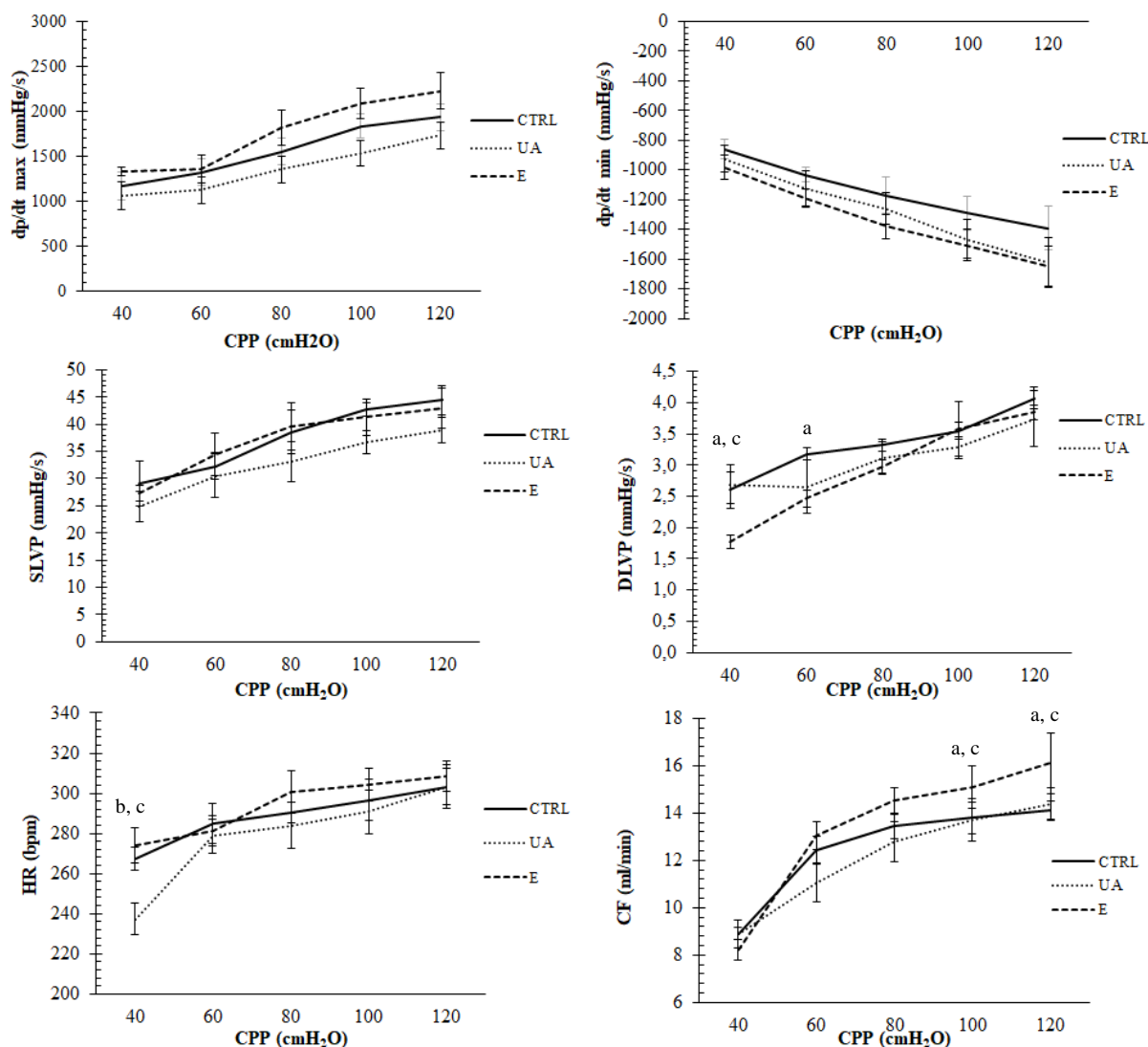


График 31: Упоредни приказ вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR, CF) у контролној групи (CTRL), у групи третираној ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg (E) и у групи третираној уснинском киселином у дози од 25 mg/kg (UA) у протоколу промене притиска у првом тренутку, а – статистички значајна разлика између CTRL групе и E групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); б – статистички значајна разлика између CTRL групе и UA групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); с – статистички значајна разлика између E групе и UA групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); dp/dt max – максимална стопа промене притиска у левој комори; dp/dt min – минимална стопа промене притиска у левој комори; SLVP – систолни притисак леве коморе, DLVP – дијастолни притисак леве коморе, HR – срчана фреквенција, CF – коронарни проток; CPP – коронарни перфузиони притисак; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација.

Резултати кардиодинамских испитивања указују да примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg и уснинске киселине у дози од 25 mg/kg не изазивају значајне промене у функционисању миокарда.

4.3.2. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и усниске киселине на параметре оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту, крви и ткиву миокарда

4.3.2.1. Спектрофотометријско одређивање параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту

Вредности прооксидационих параметара (TBARS, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2) у коронарном венском ефлуенту у Е групи у два узастопна протокола промене притиска представљене су на **Графику 32**. Нешто више вредности уочавају се током PPP 2 у поређењу са PPP 1 за све испитиване параметре изузев за нитрите.

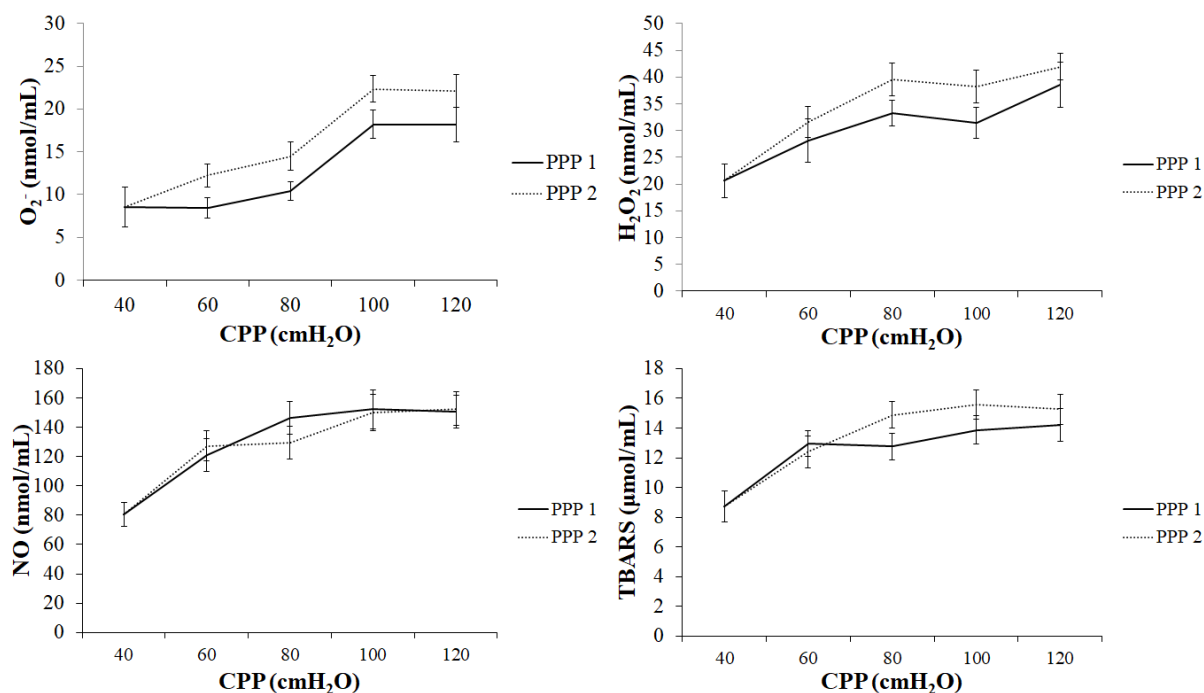


График 32: Вредности прооксидационих параметара (TBARS, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2) у коронарном венском ефлуенту у групи третираној ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg (E) у два узастопна протокола промене притиска, * – статистички значајна разлика при истом перфузионом притиску у оквиру различитих протокола ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); PPP 1 – протокол промене притиска у првом тренутку; PPP 2 – протокол промене притиска у другом тренутку; вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација.

Вредности прооксидационих параметара (TBARS, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2) у коронарном венском ефлуенту у UA групи у два узастопна протокола промене притиска представљене су на **Графику 33**. Вредности се значајно разликују између PPP 1 и PPP 2 у случају супероксид анјон радикала при перфузионим притисцима у распону од 60 до 120 cmH₂O и у случају нитрита при перфузионим притисцима у распону од 60 до 100 cmH₂O.

Вредности прооксидационих параметара (TBARS, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2) у коронарном венском ефлуенту за све испитиване групе у два узастопна протокола промене притиска представљене су на **Графику 34**. Може се уочити да значајне разлике постоје, али без карактеристичног тренда у измереним вредностима.

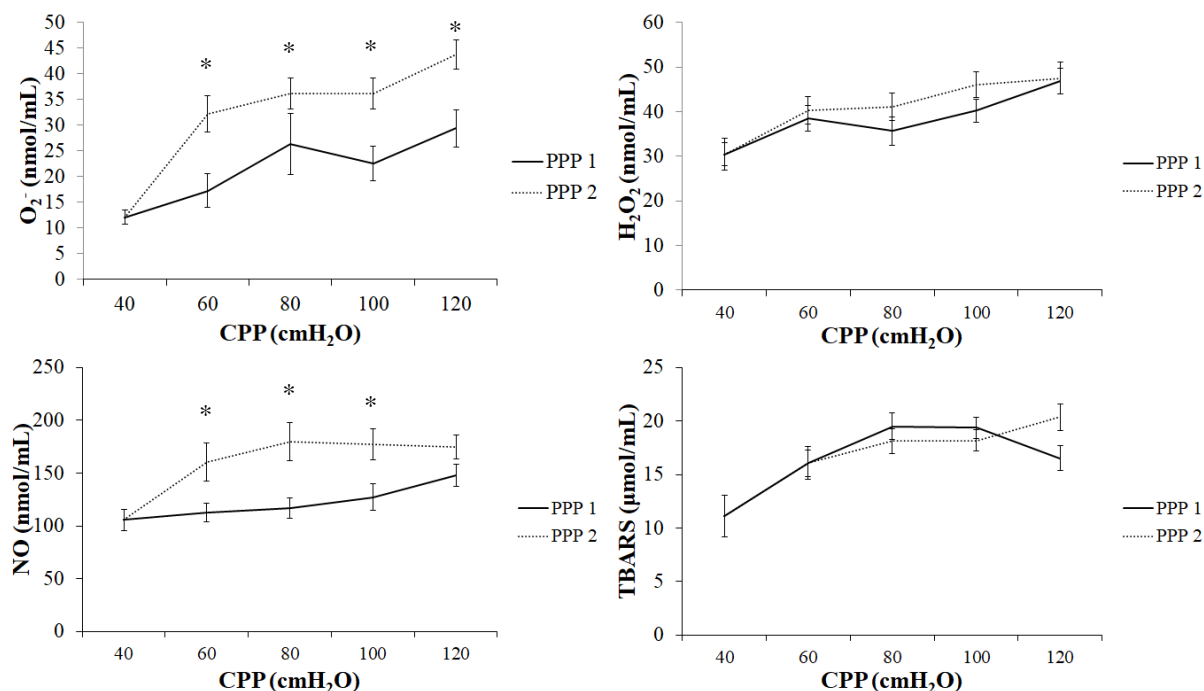


График 33: Вредности прооксидационих параметара (TBARS, O₂⁻, NO₂⁻ и H₂O₂) у коронарном венском ефлуенту у групи третираној уснином киселином у дози од 25 mg/kg (UA) у два узастопна протокола промене притиска, * – статистички значајна разлика при истом перфузионом притиску у оквиру различитих протокола (p<0,05 према Tukey HSD тесту); PPP 1 – протокол промене притиска у првом тренутку; PPP 2 – протокол промене притиска у другом тренутку; вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација.

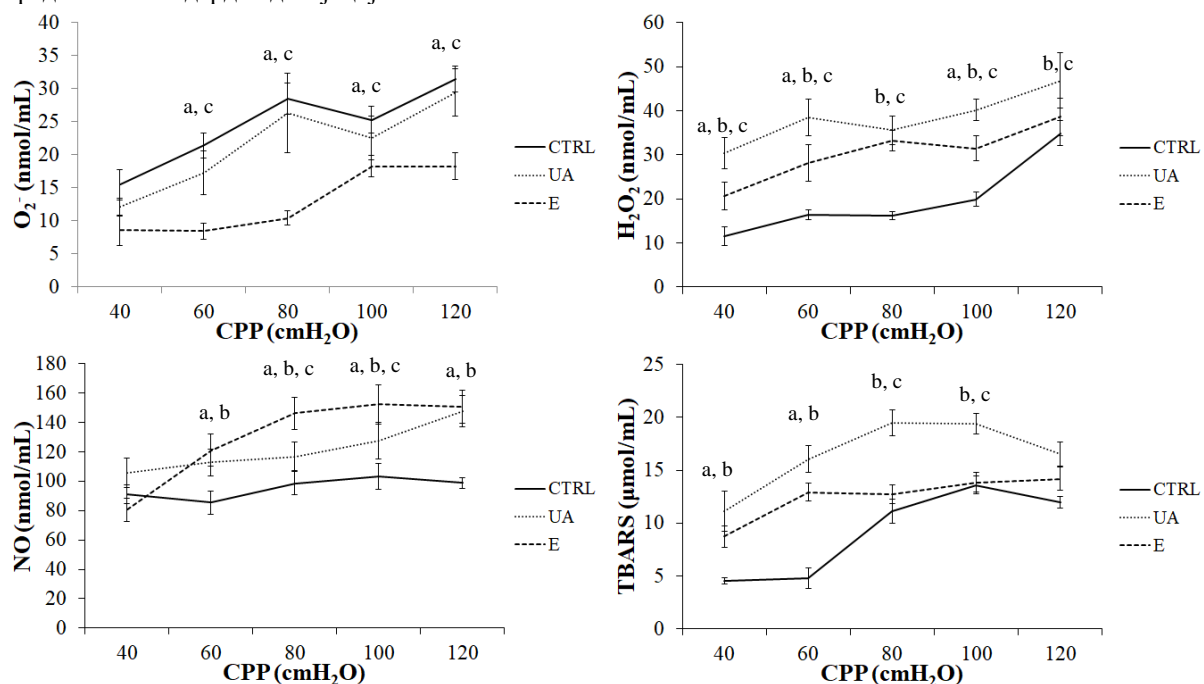


График 34: Комбиновани приказ вредности прооксидационих параметара (TBARS, O₂⁻, NO₂⁻ и H₂O₂) у коронарном венском ефлуенту у свим испитиваним групама током PPP 1; a – статистички значајна разлика између CTRL групе и E групе (p<0,05 према Tukey HSD тесту) при истом перфузионом притиску; b – статистички значајна разлика између CTRL групе и UA групе (p<0,05 према Tukey HSD тесту) при истом перфузионом притиску; c – статистички значајна разлика између E групе и UA групе (p<0,05 према Tukey HSD тесту) при истом перфузионом притиску; CTRL – контролна група; E – група третирана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA – група третирана уснином киселином у дози 25 mg/kg; PPP 1 – протокол промене притиска у првом тренутку; вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација.

4.3.2.2. Спектрофотометријско одређивање прооксидационих параметара (TBARS, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2)

Сви испитивани параметри осим нитрита значајно су снижени у Е групи у поређењу са CTRL групом, док су сви параметри осим водоник пероксида снижени у Е групи у поређењу са UA групом. Од свих испитиваних параметара једино је супероксид анјон радикал снижен у UA групи у поређењу са CTRL групом (**График 35**).

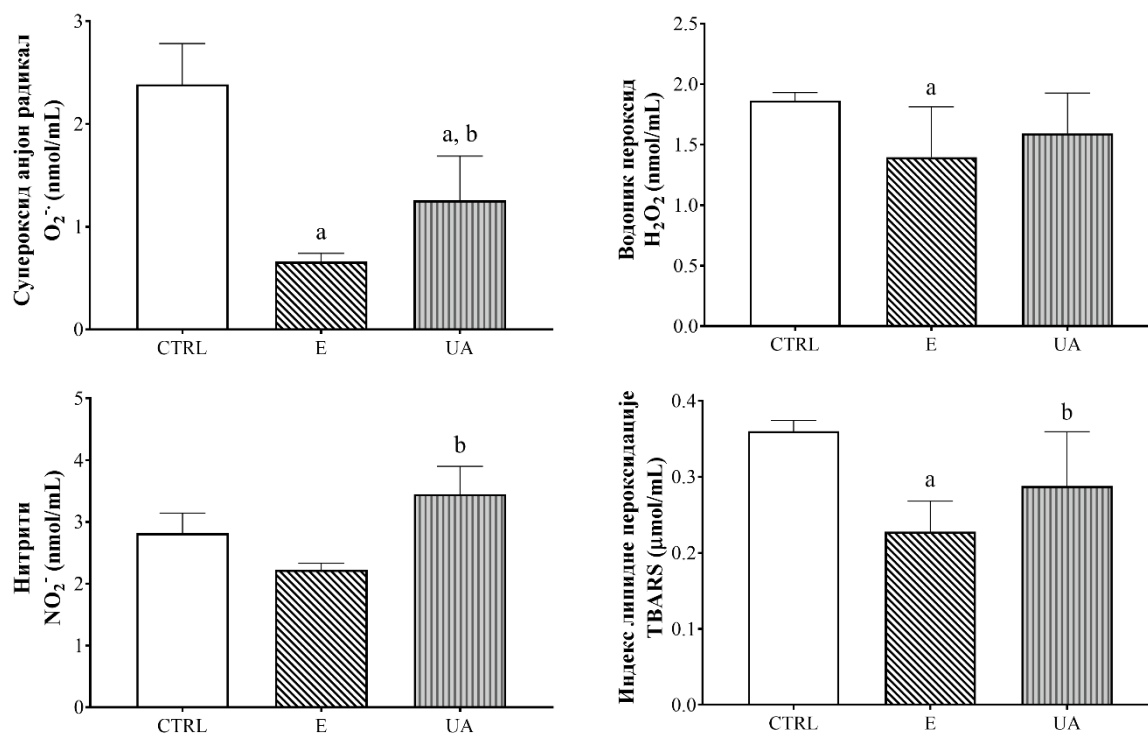


График 35: Вредности системских прооксидационих параметара (TBARS, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2). а – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); б – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном ацетонским екстрактом лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; Е – група третирана ацетонским екстрактом лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA – група третирана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; $n = 10$.

4.3.2.3. Спектрофотометријско одређивање параметара који су укључени у систем антиоксидационе заштите (CAT, SOD и GSH)

Вредности супероксид дисмутазе и редукованог глутатиона су уједначене у све три испитиване групе, док је у случају каталазе вредност у UA групи значајно виша у поређењу са CTRL групом што је случај и са E групом. Такође, вредности каталазе значајно су више у E групи и у поређењу са UA групом (График 36).

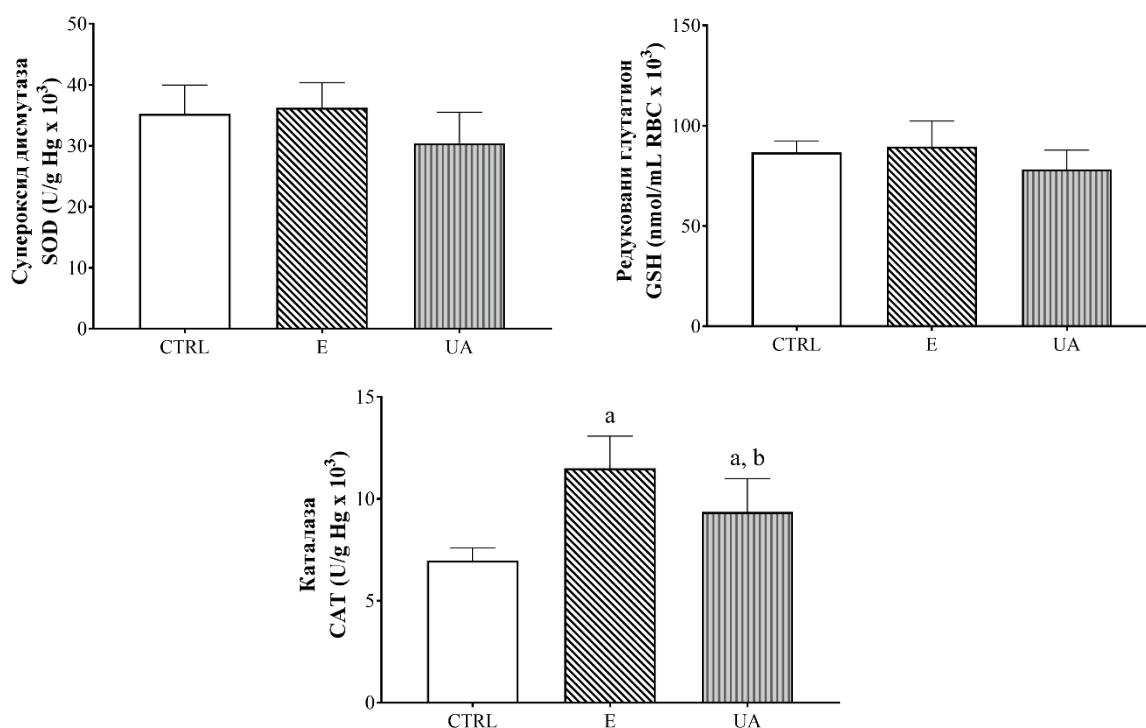


График 36: Вредности системских параметара који су укључени у систем антиоксидационе заштите (CAT, SOD и GSH). a – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); b – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном ацетонским екстрактом лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; E – група третирана ацетонским екстрактом лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA – група третирана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; $n = 10$.

4.3.2.4. Спектрофотометријско одређивање параметара оксидационог стреса у хомогенату ткива миокарда

Вредности параметара оксидационог стреса у хомогенату ткива миокарда указују да не долази до значајних промена у вредности ових параметара након третмана ацетонским екстрактом лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинском киселином изузев у случају нитрита где се уочава значајна разлика између UA и E групе (График 37).

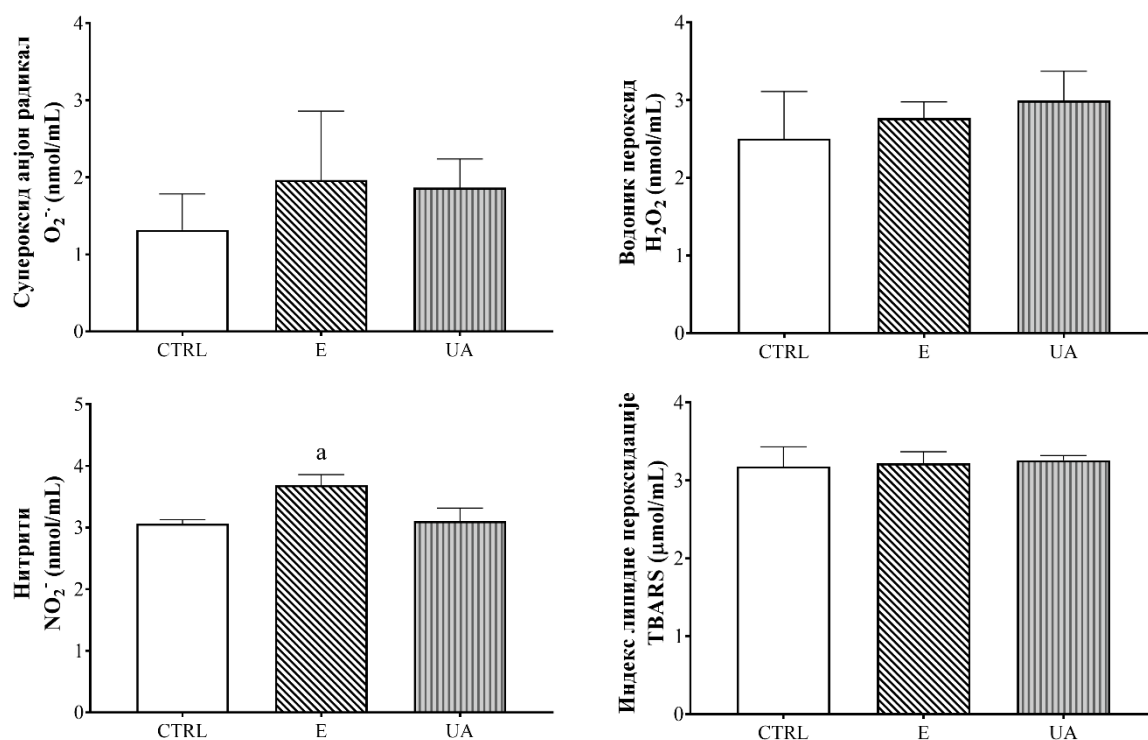


График 37: Вредности прооксидационих параметара (TBARS, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2) у хомогенату ткива миокарда. а – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); б – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; E – група третирана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA – група третирана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; n = 10.

4.3.2.5. Спектрофотометријско одређивање параметара који су укључени у систем антиоксидационе заштите (CAT, SOD и GSH) у хомогенату ткива миокарда

Највише вредности свих испитиваних параметара система антиоксидационе заштите забележене су у Е групи. У случају супероксид дисмутазе вредност у Е групи била је двоструко виша у поређењу са CTRL групом. Вредности редукованог глутатиона значајно су више у Е групи и у поређењу са CTRL групом и у поређењу са UA групом. Вредности каталазе разликују се значајно у Е групи у поређењу са CTRL групом, али и у поређењу са UA групом у којој је забележена двоструко нижа вредност (График 38).

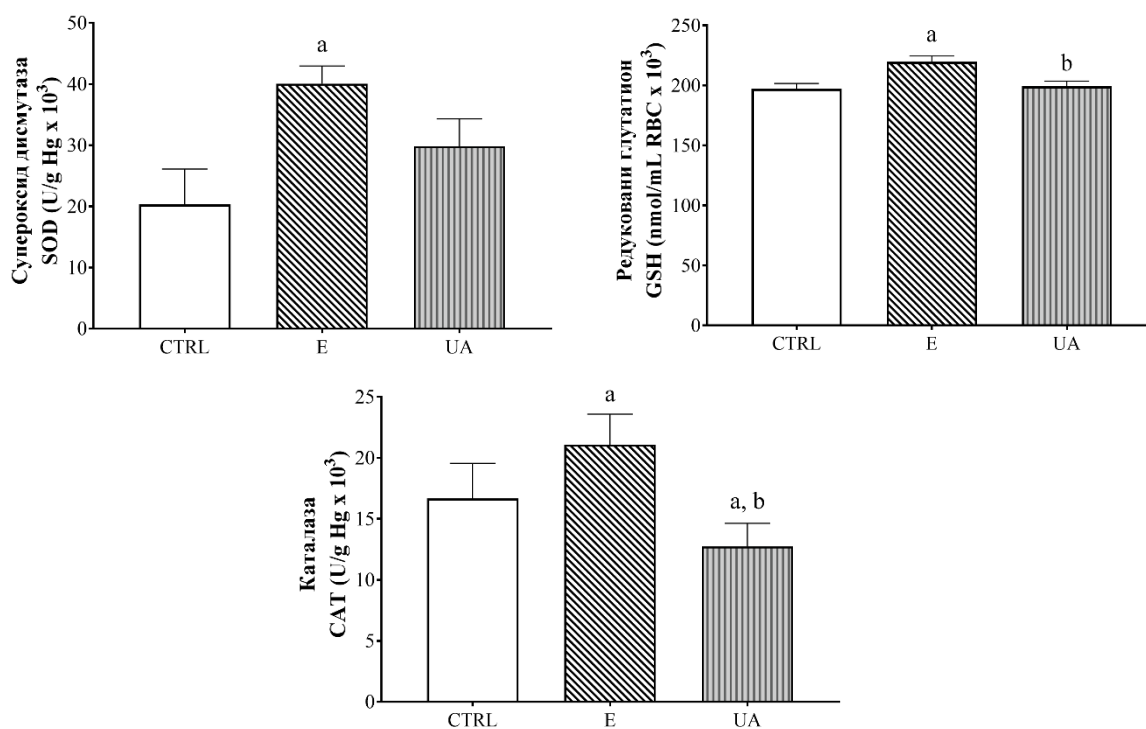


График 38: Вредности параметара који су укључени у систем антиоксидационе заштите (CAT, SOD и GSH) у хомогенату ткива миокарда. а – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); б – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном уснинском киселином у дози од 25 mg/kg ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; E – група третирана ацетонским екстрактом лишјаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA – група третирана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; $n = 10$.

4.3.3. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на биохемијске маркере срчане функције и маркере инфламације

4.3.3.1. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на активност срчаних ензима

Испитивани су исти параметри који су наведени у поглављу 4.2.3.1. На **Графику 39** представљене су вредности нивоа високо специфичног С-реактивног протеина (CRP), ензима лактатне дехидрогеназе (LDH), ензима креатин-фосфокиназе МВ (СК-МВ) и тропонина I (СТn-I) у серуму према експерименталним групама

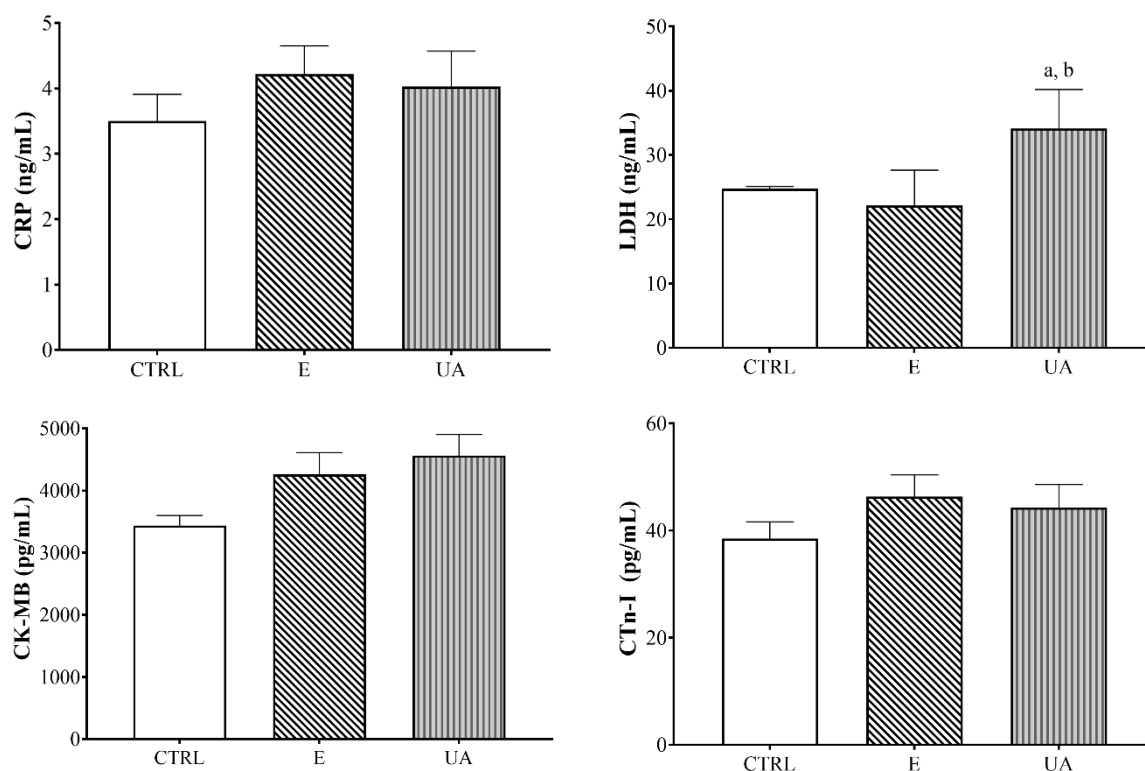


График 39: Вредности нивоа високо специфичног С-реактивног протеина (CRP), ензима лактатне дехидрогеназе (LDH), ензима креатин-фосфокиназе МВ (СК-МВ) и тропонина I (СТn-I) у серуму изражене у нанограммима по милилитру за CRP и LDH (ng/mL) и у пикограмима по милилитру за СК-МВ и СТn-I (pg/mL) према експерименталним групама; а – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); б – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; E – група третирана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA – група третирана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; $n = 10$.

Вредности CRP, СК-МВ и СТn-I су уједначене у свим испитиваним групама при чему је за поређење вредности искоришћен је тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест). Добијене су вредности $F=2,79$ ($p=0,167$), $F=3,37$ ($p=0,107$) и $F=6,20$ ($p=0,065$) за CRP, СК-МВ и СТn-I респективно. Забележена је значајна разлика у вредности LDH у групи третираној уснинском киселином у поређењу са осталим испитиваним групама ($F=10,71$ ($p < 0,001$)).

4.3.3.2. Испитивање утицаја примене ацетонског екстракта лишља *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на маркере инфламације

Испитивани су исти параметри који су наведени у поглављу 4.2.3.2..

Тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест) коришћен је за поређење вредности међу групама за проинфламаторне цитокине при чему су добијене вредности $F=3,73$ ($p=0,058$) за IL-1 α и $F=7,24$ ($p=0,053$) за IL-8.

На **Графику 40** представљене су вредности проинфламаторних цитокина интерлеукина-1 α (IL-1 α) и интерлеукина 8 (IL-8) према експерименталним групама.

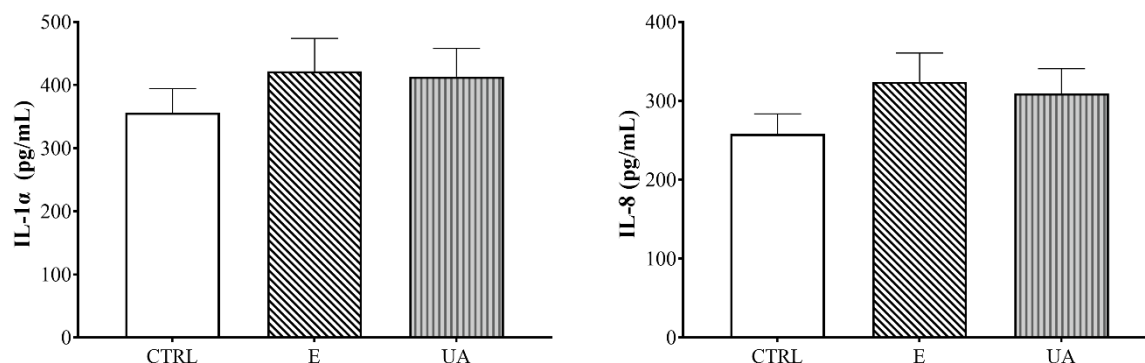


График 40: Вредности проинфламаторних цитокина интерлеукина-1 α (IL-1 α) и интерлеукина 8 (IL-8) у серуму, према експерименталним групама.; CTRL – контролна група; E – група третирана ацетонским екстрактом лишља *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA – група третирана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; $n = 10$.

У групама третираним ацетонским екстрактом лишља *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинском киселином није забележена значајна промена вредности измерених проинфламаторних цитокина у поређењу са контролном групом.

Тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест) коришћен је за поређење вредности међу групама за антиинфламаторне цитокине при чему су добијене вредности $F=3,51$ ($p=0,056$) за IL-4, $F=0,91$ ($p=0,424$) за IL-10 α и $F=0,15$ ($p=0,862$) за TGF β .

На **Графику 41** представљене су вредности антиинфламаторних цитокина интерлеукина-4 (IL-4), интерлеукина-10 (IL-10) и трансформишућег фактора раста β (TGF β) према експерименталним групама.

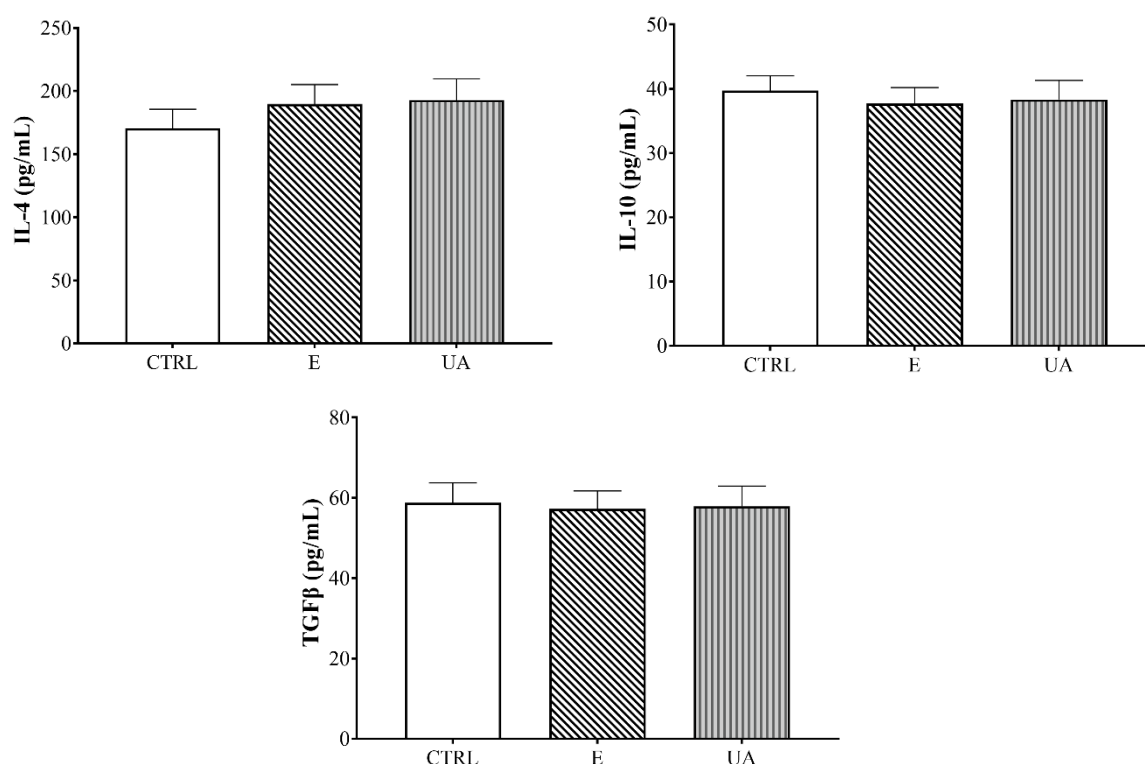


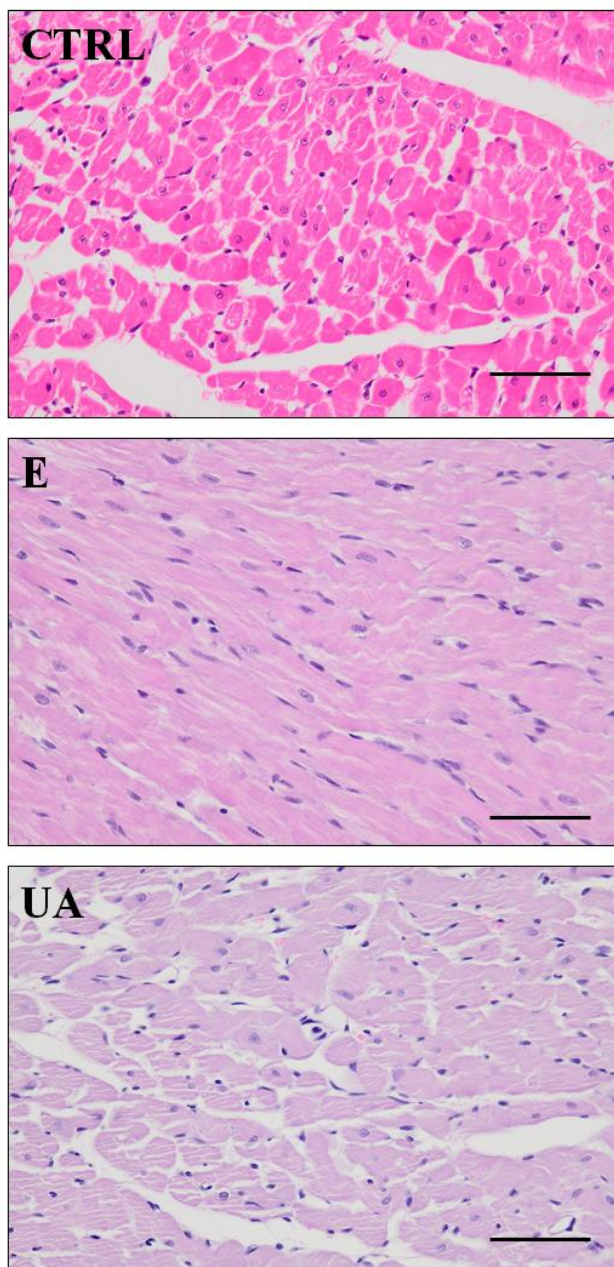
График 41: Вредности антиинфламаторних цитокина интерлеукина-4 (IL-4), интерлеукина-10 (IL-10) и трансформишућег фактора раста β (TGF β) у серуму, према експерименталним групама.; CTRL – контролна група; E – група третирана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA – група третирана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; n = 10

Измерене вредности антиинфламаторних цитокина у групама третираним ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинском киселином не разликују се значајно од вредности у контролној групи за све испитиване цитокине.

4.3.4. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на патохистолошке карактеристике ткива миокарда

4.3.4.1. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на ткиво миокарда- бојење хематоксилин-еозин методом

У групи животиња третираној ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* (E) присутна су ретка таласаста влакна и едем интерстицијума. Такође, присутна су и издужена једра као и ретка затупаста једра. У групи животиња третираној уснинском киселином (UA) не уочавају се хипертофија и таласаста мишићна влакна, као ни инфламација и едем интерстицијума. Ткивни пресеци миокарда испитиваних група бојени хематоксилин/еозин техником представљени су на **Слици 13**.



Слика 13: Ткивни пресеци миокарда испитиваних група бојени хематоксилин/еозин техником. CTRL – контролна група; E – група третирана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA – група третирана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; коришћено увећање 40x; величина скале 10 μ m.

4.3.4.2. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на фиброзу миокарда и садржај колагена применом *Picosirius red* методе

У групи третираној ацетонским екстрактом лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla*, као и у групи третираној уснинском киселином ниво колагена био је нижи за 31%, односно 32% респективно у поређењу са контролном групом. Утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у садржају колагена међу испитиваним групама ($F=2,03$; $p=0,067$). Садржај колагена у ткивним исечцима миокарда према испитиваним групама представљен је на **Графику 42**. Ткивни пресеци миокарда свих испитиваних група бојени применом *Picosirius red* методе у циљу откривања фиброзе и идентификације колагена представљени су на **Слици 14**.

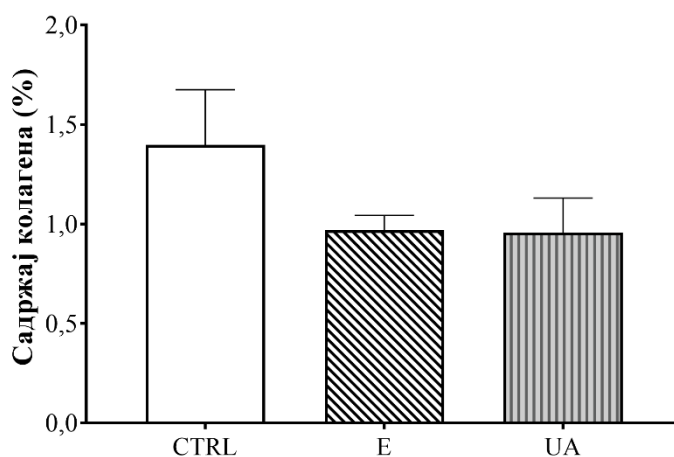
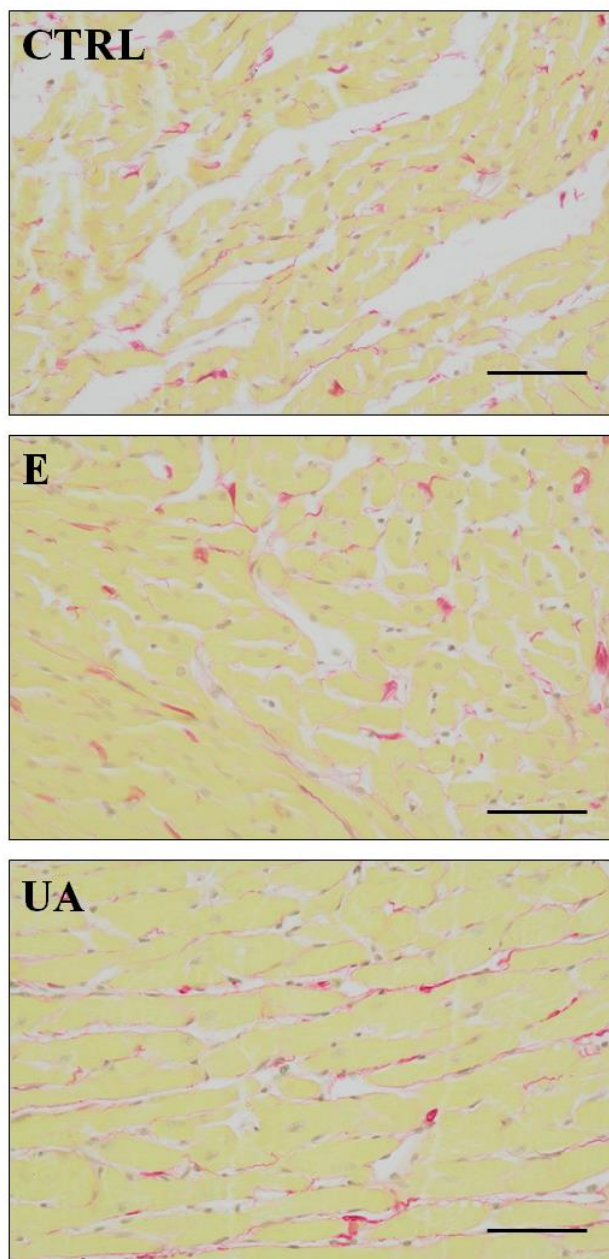


График 42: Садржај колагена у процентима у ткивним исечцима миокарда према испитиваним групама. CTRL – контролна група; E – група третирана ацетонским екстрактом лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA – група третирана уснинском киселином у дози 25 mg/kg.



Слика 14: Ткивни пресеци миокарда испитиваних група бојени Picrosirius Red техником. CTRL – контролна група; E – група третирана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA – група третирана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; коришћено увећање 40x; величина скале 10 μ m.

4.3.5. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на релативну експресију гена укључених у оксидациони стрес, апоптозу и инфламацију у левој комори срца

4.3.5.1. Релативна експресија гена укључених у оксидациони стрес у левој комори срца

Испитивани су исти параметри који су наведени у поглављу 4.2.5.1.

Тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест) коришћен је за поређење вредности међу групама за све испитиване гене при чему су добијене вредности $F=1,55$ ($p=0,243$) за SOD-1, $F=6,75$ ($p=0,008$) за SOD-2 и $F=5,02$ ($p=0,021$) за eNOS. Релативна експресија гена удружених са оксидационим стресом (SOD-1, SOD-2 и eNOS) представљена је на **Графику 43**.

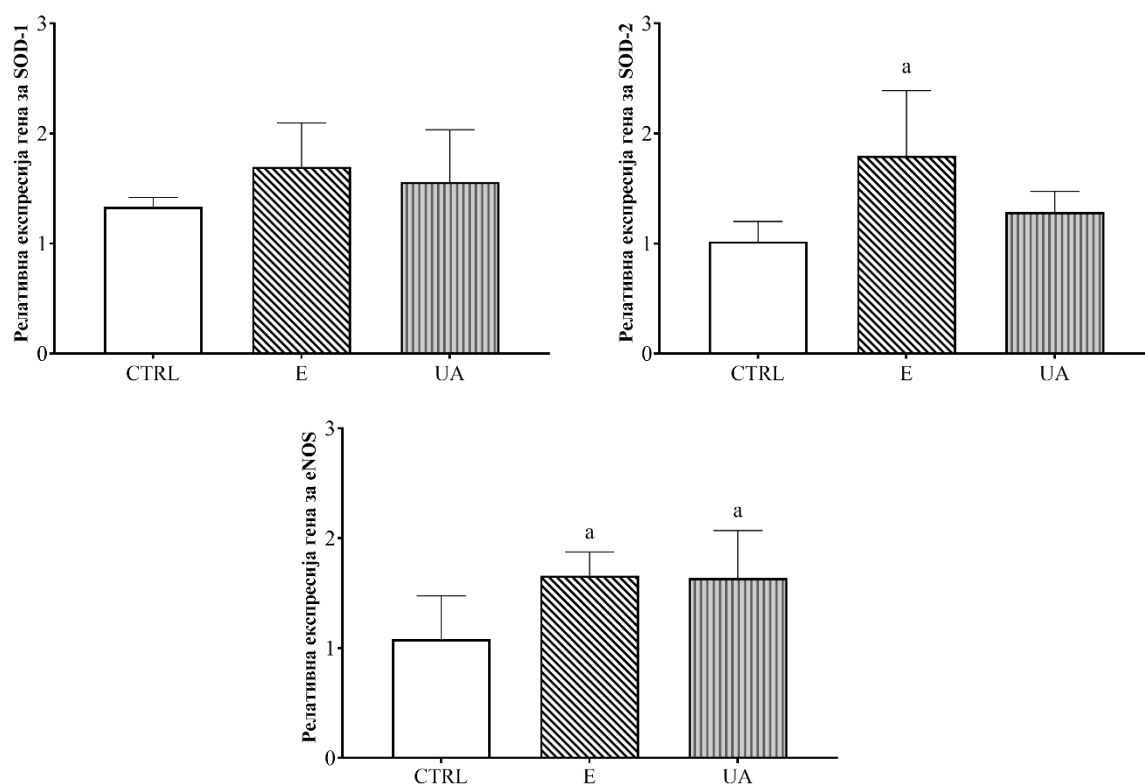


График 43: Релативна експресија гена удружених са оксидационим стресом (ген за супероксид дисмутазу 1 (SOD-1), ген за супероксид дисмутазу 2 (SOD-2) и ген за ендотелну азот-моноксид синтазу (eNOS)) према експерименталним групама; a – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p<0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; E – група третирана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA – група третирана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; $n = 10$

Релативна експресија гена за SOD-1 у E и UA групи не разликује се значајно у поређењу са CTRL групом. У случају гена за SOD-2 и eNOS постоји статистички значајна разлика између E и CTRL групе, док се CTRL и UA група разликују само у случају релативне експресије гена за eNOS. Не постоји разлика у релативној експресији испитиваних гена између E и UA групе.

4.3.5.2. Релативна експресија гена укључених у процес апоптозе у левој комори срца

Испитивани су исти параметри који су наведени у поглављу 4.2.5.2.

Тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест) коришћен је за поређење вредности међу групама за све испитиване гене при чему су добијене вредности $F=1,07$ ($p=0,367$) за Вах, $F=3,33$ ($p=0,064$) за Bcl-2, $F=1,38$ ($p=0,292$) за Cas-3 и $F=0,30$ ($p=0,744$) за Cas-9. Релативна експресија гена удружених са апоптозом (Вах, Bcl-2, Cas-3 и Cas-9) представљена је на **Графику 44**.

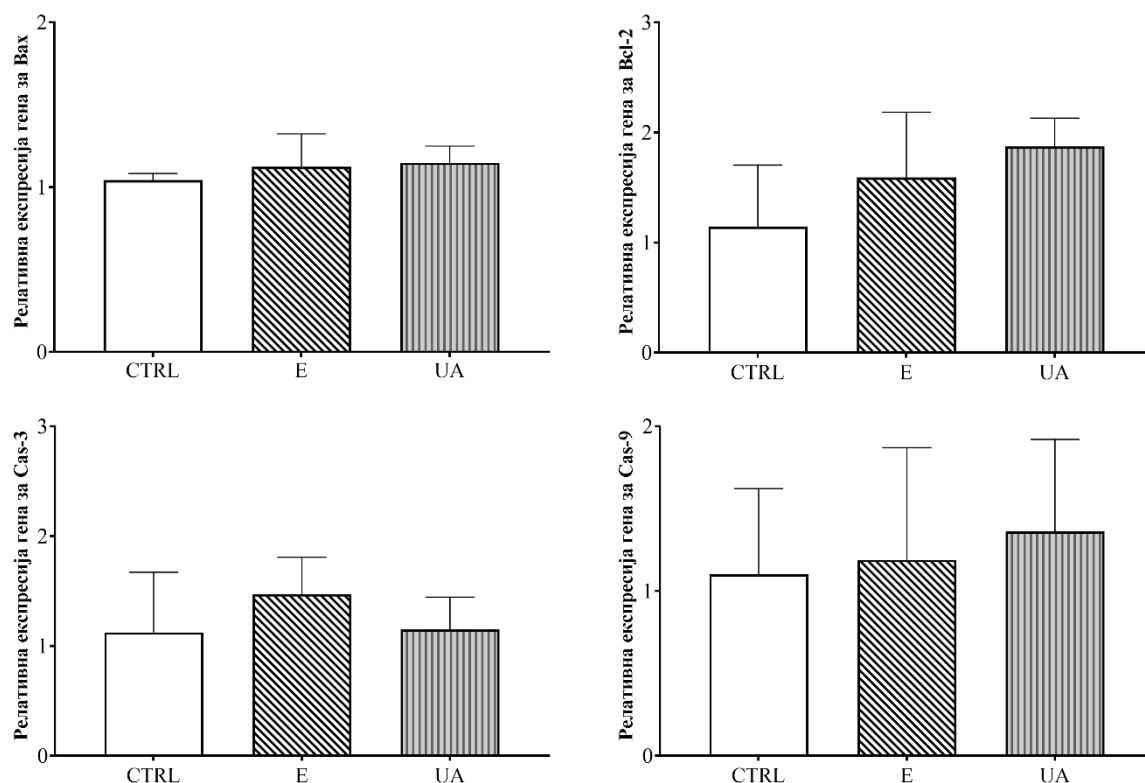


График 44: Релативна експресија гена удружених са апоптозом (ген за Bcl-2 повезани протеин X (Вах), ген за Б-ћелијски лимфом 2 (Bcl-2), ген за каспазу 3 (Cas-3) и ген за каспазу 9 (Cas-9)) према експерименталним групама; а – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; E – група третирана ацетонским екстрактом лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA – група третирана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; $n = 10$

Није забележено постојање статистички значајне разлике у релативној експресији гена удружених са апоптозом у било којој од испитиваних група, без обзира на испитивани ген.

4.3.5.3. Релативна експресија гена укључених у процес инфламације у левој комори срца

Испитивани су исти параметри који су наведени у поглављу 4.2.5.3.

Тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест) коришћен је за поређење вредности међу групама за све испитиване гене при чему су добијене вредности $F=4,15$ ($p=0,037$) за IL-6, $F=1,24$ ($p=0,318$) за IL-10, $F=4,81$ ($p=0,054$) за IL-13, $F=4,54$ ($p=0,059$) за NF- κ B и $F=1,75$ ($p=0,207$) за TNF α . Релативна експресија гена удружених са апоптозом (IL-6, IL-10, IL-13, NF- κ B, и TNF α) представљена је на **Графику 45**.

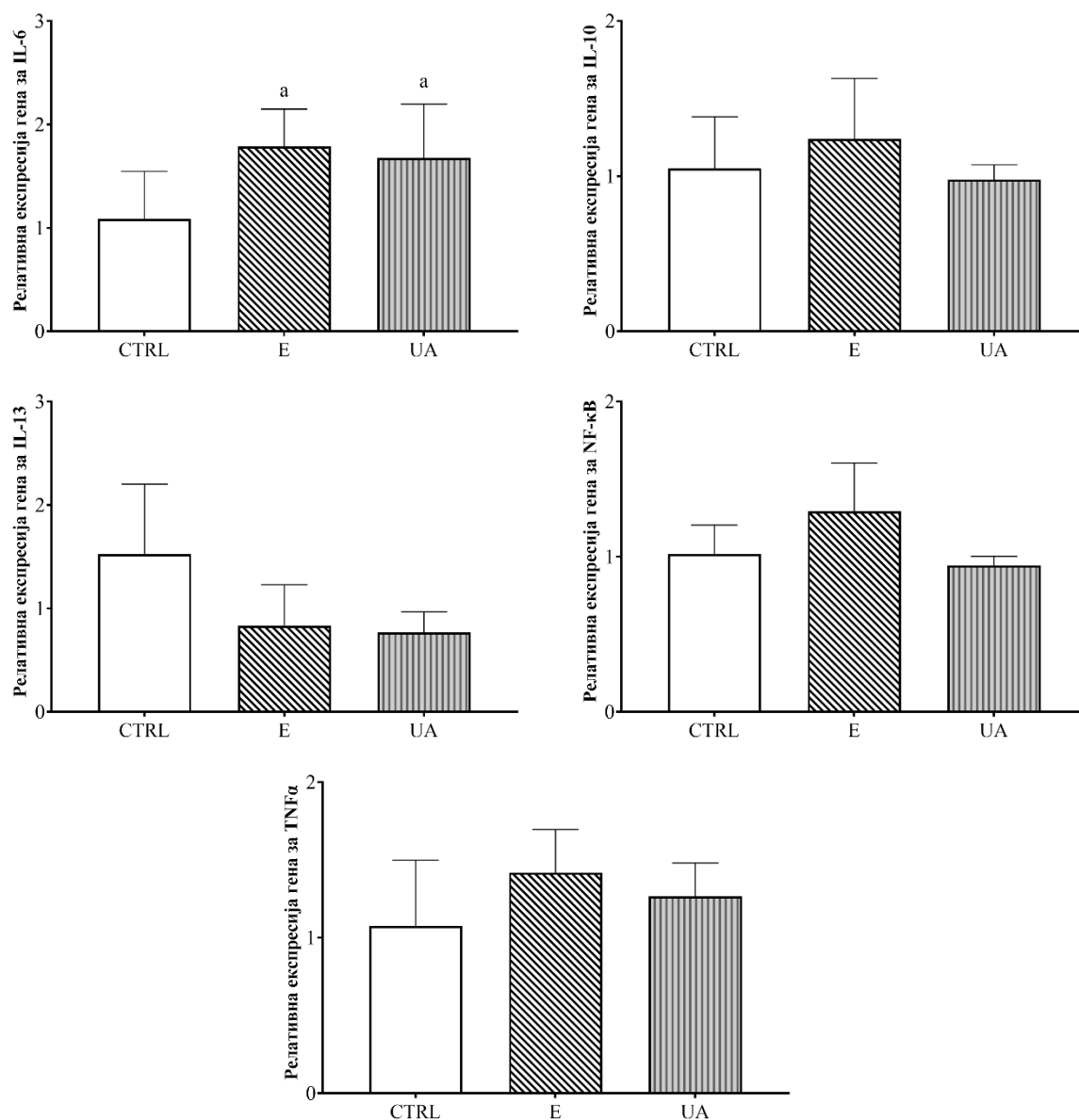


График 45: Релативна експресија гена удружених са инфламацијом (ген за интерлеукин 6 (IL-6), ген за интерлеукин 10 (IL-10), ген за интерлеукин 13 (IL-13), ген за нуклеарни транскрипциони фактор капа Б (NF-κB) и ген за фактор некрозе тумора α (TNFα)); CTRL – контролна група; E – група третирана ацетонским екстрактом лишља *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA – група третирана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација; n = 10

Разлика између релативне експресије гена у E групи и UA групи у поређењу са CTRL групом уочена је само у случају гена за проинфламаторни цитокин IL-6, док у осталим случајевима није забележено постојање статистички значајне разлике у релативној експресији гена удружених са инфламацијом у било којој од четири испитиване групе, без обзира на испитивани ген.

4.4. Испитивање потенцијалног кардиопротективног ефекта екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселина на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности

4.4.1. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на хемодинамске параметре и параметре функције срца *ex vivo* на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности

4.4.1.1. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на крвни притисак

Вредности систолног крвног притиска, дијастолног крвног притиска и срчане фреквенције одређене су како је описано у Поглављу 4.2.1.1. Уочава се да ацетонски екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинска киселина смањују депресорни ефекат доксорубицина на миокард. Овај ефекат огледа се у повећању вредности систолног и дијастолног крвног притиска и срчане фреквенције у случају примене било ког од третмана. Треба напоменути да се уснинска киселина показала ефикаснијом, при чему се вредност систолног крвног притиска не разликује значајно од вредности измерене у контролној групи (Поглавље 4.2.1.1.). Вредности систолног крвног притиска, дијастолног крвног притиска и срчане фреквенције на почетку експеримента и на крају експеримента у испитиваним групама представљене су у Табели 19.

Табела 19: Вредности систолног крвног притиска, дијастолног крвног притиска и срчане фреквенције на почетку експеримента и на крају експеримента према испитиваним групама

Група	Почетак експеримента (Дан 0)		
	SP (mmHg)	DP (mmHg)	HR (bpm)
DOX	120,45 ± 9,04	82,78 ± 6,15	328,50 ± 25,21
E + DOX	118,33 ± 7,02	76,33 ± 8,74	319,67 ± 26,69
UA+DOX	119,15 ± 9,25	80,05 ± 6,05	318,60 ± 25,78
Група	3 дана након примене доксорубицина (Дан 31)		
	SP (mmHg)	DP (mmHg)	HR (bpm)
DOX	95,67 ± 7,64	65,33 ± 8,08	315,00 ± 15,52
E + DOX	112,76 ± 6,83 ^a	78,91 ± 7,04 ^a	326,12 ± 15,26 ^a
UA+DOX	121,33 ± 7,51 ^{a,b}	80,67 ± 6,51 ^a	326,00 ± 17,69 ^a

Легенда: SP – систолни притисак; DP – дијастолни притисак; HR – срчана фреквенција; mmHg – милиметар живиног стуба; bpm – број откуцаја у минути; a – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); b – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia*

stenophylla у дози од 125 mg/kg 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); DOX – група третирана доксорубицином; E + DOX – група третирана доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишља *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA + DOX – група третирана доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози од 25 mg/kg.

4.4.1.2. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишља *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на ехокардиографске параметре леве коморе

Ехокардиографски параметри указују на протективно дејство оба примењена третмана што се може уочити у очувању вредности већине одређиваних параметара и након примене доксорубицина. Вредности ехокардиографских параметара на почетку експеримента и на крају експеримента према испитиваним групама представљене су у Табели 20. Параметар LVIDd значајно је већи и у E + DOX групи и у UA + DOX групи у поређењу са DOX групом. Параметри IVSd и FS већи су у UA + DOX групи у поређењу са DOX групом, док је параметар LVPWd већи у UA + DOX групи у поређењу и са DOX групом и са E + DOX групом.

Табела 20: Вредности ехокардиографских параметара на почетку експеримента и на крају експеримента према испитиваним групама

ИП	DOX		E + DOX		UA + DOX	
	Дан 0	Дан 31	Дан 0	Дан 31	Дан 0	Дан 31
IVSd (mm)	1,57 ± 0,07	1,29 ± 0,12	1,41 ± 0,04	1,31 ± 0,08	1,57 ± 0,07	1,44 ± 0,12 ^a
LVIDd (mm)	6,56 ± 0,71	5,85 ± 0,35	6,31 ± 0,38	6,08 ± 0,24 ^a	6,56 ± 0,71	6,20 ± 0,44 ^a
LVPWd (mm)	1,49 ± 0,03	1,28 ± 0,08	1,61 ± 0,06	1,27 ± 0,16	1,49 ± 0,03	1,48 ± 0,08 ^{a,b}
IVSs (mm)	2,59 ± 0,08	2,39 ± 0,12	2,78 ± 0,14	2,58 ± 0,18	2,59 ± 0,08	2,60 ± 0,11
LVIDs (mm)	3,17 ± 0,20	3,33 ± 0,46	3,27 ± 0,35	3,23 ± 0,28	3,17 ± 0,20	3,28 ± 0,39
LVPWs (mm)	2,79 ± 0,10	2,44 ± 0,15	2,86 ± 0,27	2,68 ± 0,13	2,79 ± 0,10	2,73 ± 0,26
FS (%)	58,30 ± 7,05	45,70 ± 2,53	56,70 ± 1,47	49,80 ± 4,21	58,30 ± 7,05	52,30 ± 4,09 ^a

Легенда: ИП – испитивани параметар; IVSd – дебљина зида интервентрикуларног септума на крају дијастоле; LVIDd – унутрашња димензија леве коморе на крају дијастоле; LVPWd – дебљина задњег зида леве коморе на крају дијастоле; IVSs – дебљина зида интервентрикуларног септума на крају систоле; LVIDs – дебљина зида интервентрикуларног септума на крају систоле; LVPWs – дебљина задњег зида леве коморе на крају систоле; FS – проценат фракционог скраћења леве коморе; а – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); b – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишља *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg 1% раствором натријум-карбоксиметилцелулозе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); DOX – група третирана доксорубицином; E + DOX – група третирана доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишља *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA + DOX – група третирана доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози од 25 mg/kg.

4.4.1.3. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на параметре функционисања срца *ex vivo*

Кардиодинамски параметри функције срца *ex vivo* у DOX групи представљени су у Поглављу 4.2.1.3.

Вредности кардиодинамских параметара током протокола ауторегулације у Е + DOX групи представљене су на **Графику 46**. Нису забележене значајне разлике у вредностима кардиодинамских параметара у Е + DOX групи током PPP 1 и PPP 2 протокола ауторегулације, а код свих параметара забележен је пораст вредности са порастом перфузионог притиска, изузев код параметра $dp/dt \min$ где је забележено смањење вредности.

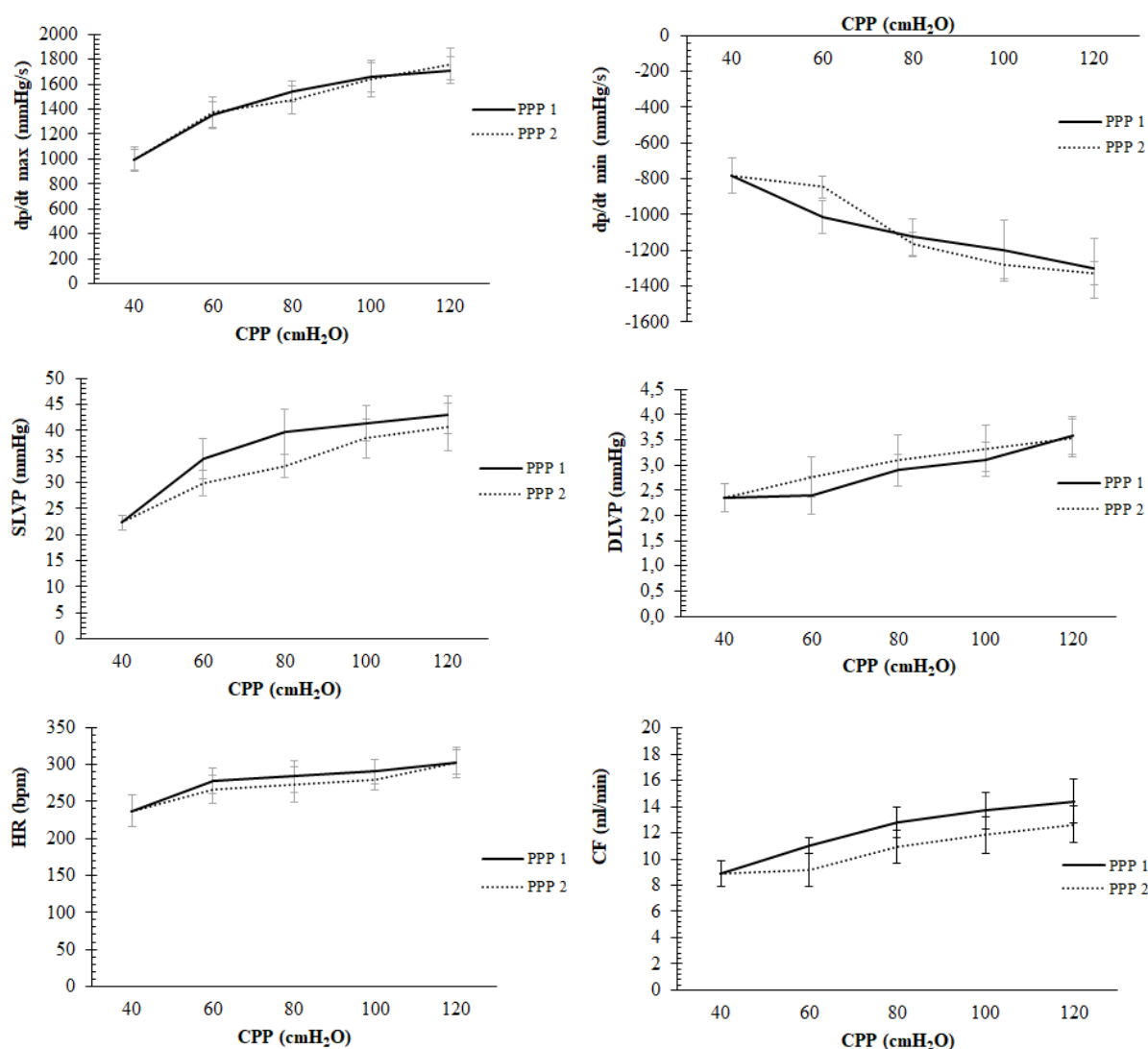


График 46: Вредности кардиодинамских параметара ($dp/dt \max$, $dp/dt \min$, SLVP, DLVP, HR, CF) у групи третираној доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg (E + DOX) у два узастопна протокола промене притиска, $dp/dt \max$ – максимална стопа промене притиска у левој комори; $dp/dt \min$ – минимална стопа промене притиска у левој комори; SLVP – систолни притисак леве коморе, DLVP – дијастолни притисак леве коморе, HR – срчана фреквенција, CF – коронарни проток; CPP – коронарни перфузиони притисак; * – статистички значајна разлика при истом перфузионом притиску у оквиру различитих протокола ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); PPP 1 – протокол промене притиска у првом тренутку; PPP 2 – протокол промене притиска у другом тренутку; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација.

Вредности кардиодинамских параметара током протокола ауторегулације у UA + DOX групи представљене су на **Графику 47**. Забележен је сличан тренд вредности као и у E + DOX групи, а статистички значајна разлика забележена је код параметра dp/dt max при притисцима од 60 до 120 cmH_2O , а вредности су биле веће током PPP 2 у односу на PPP 1.

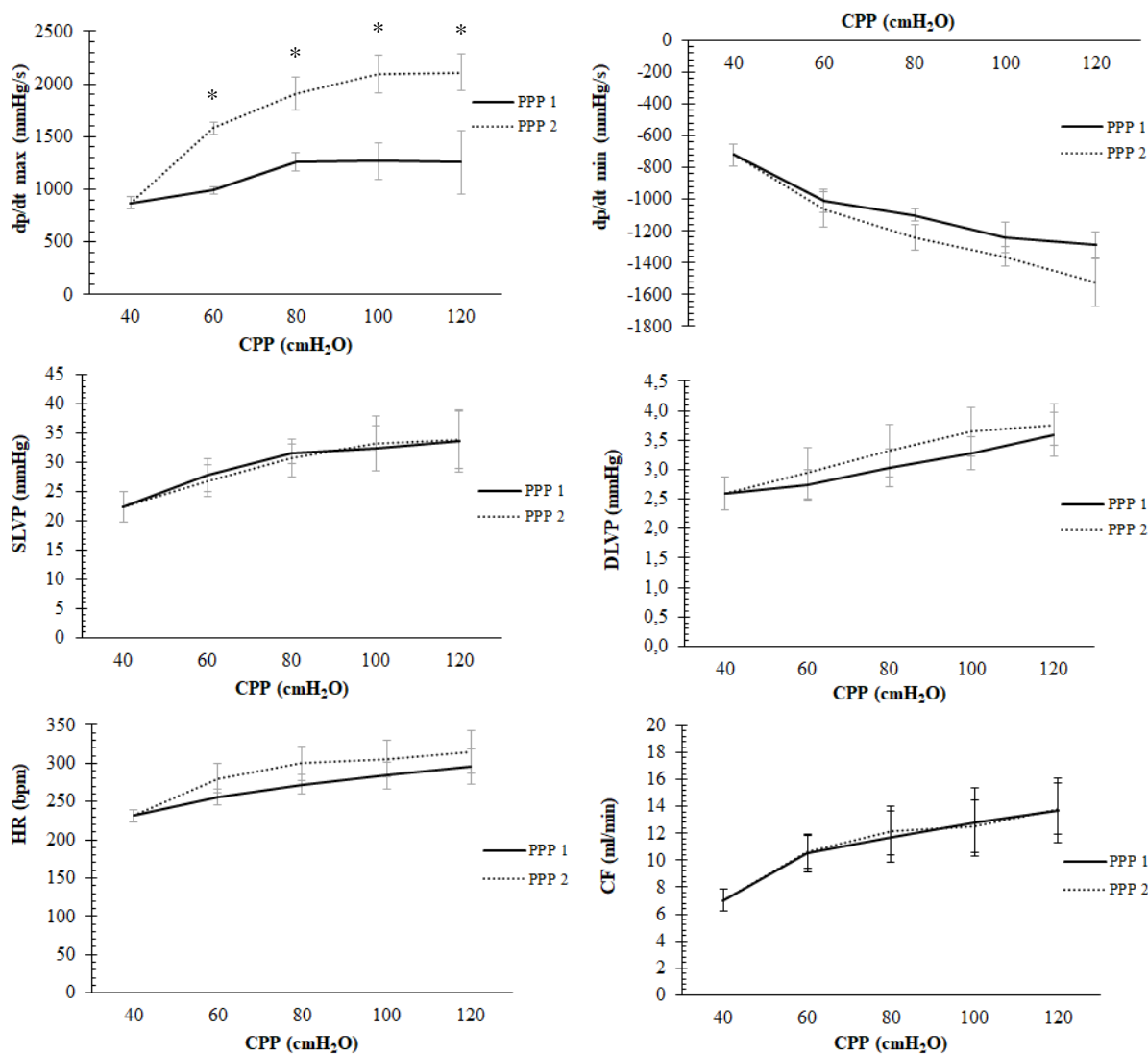


График 47: Вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR, CF) у групи третираној доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози од 25 mg/kg (UA + DOX) у два узастопна протокола промене притиска, dp/dt max – максимална стопа промене притиска у левој комори; dp/dt min – минимална стопа промене притиска у левој комори; SLVP – систолни притисак леве коморе, DLVP – дијастолни притисак леве коморе, HR – срчана фреквенција, CF – коронарни проток; CPP – коронарни перфузиони притисак; * – статистички значајна разлика при истом перфузионом притиску у оквиру различитих протокола ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); PPP 1 – протокол промене притиска у првом тренутку; PPP 2 – протокол промене притиска у другом тренутку; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација.

Упоредни приказ вредности кардиодинамских параметара током PPP 1 периода протокола ауторегулације у DOX, E + DOX и UA + DOX групи представљен је на **Графику 48**. Може се уочити да и ацетонски екстракт лишља *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинска киселина у одређеној мери неутралишу депресорне ефекте доксорубицина на миокард. Код параметара dp/dt max, SLVP, CF и HR може се приметити сличан тренд вредности односно појава да оба примењена третмана имају ефекат, али да је он израженији у случају ацетонског екстракта лишља. У случају параметра dp/dt min оба третмана испољавају подједнаку активност, док у случају параметра DLVP није примењена значајна разлика међу групама.

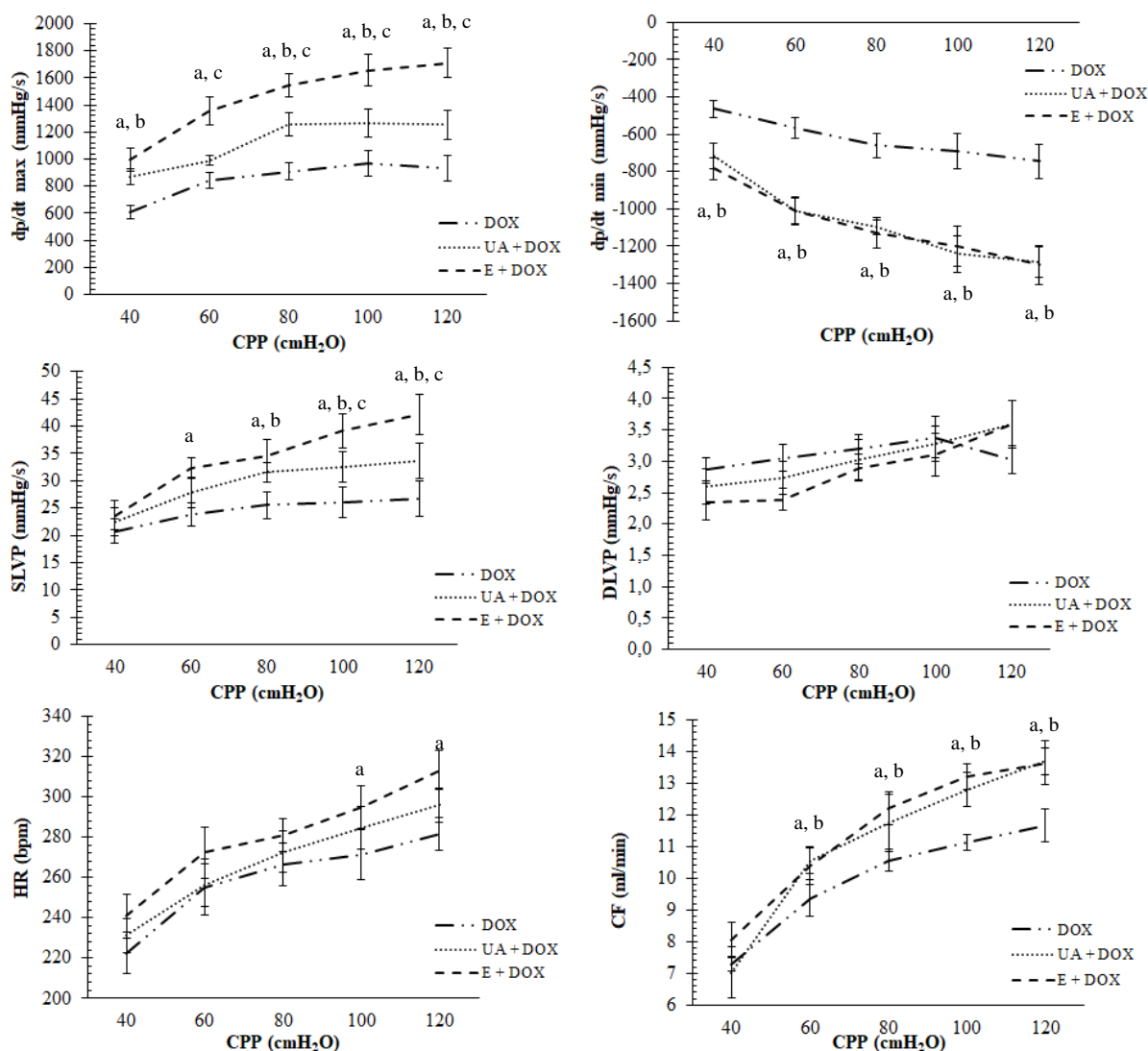


График 48: Упоредни приказ вредности кардиодинамских параметара (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP, HR, CF) у групи третираној доксорубицином (DOX), у групи третираној доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишља *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg (E + DOX); и у групи третираној доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози 25 mg/kg (UA + DOX); у протоколу промене притиска у првом тренутку, а – статистички значајна разлика између DOX групе и E + DOX групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); b – статистички значајна разлика између DOX групе и UA + DOX групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); c – статистички значајна разлика између E + DOX групе и UA + DOX групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); dp/dt max – максимална стопа промене притиска у левој комори; dp/dt min – минимална стопа промене притиска у левој комори; SLVP – систолни притисак леве коморе, DLVP – дијастолни притисак леве коморе, HR – срчана фреквенција, CF – коронарни проток; CPP – коронарни перфузиони притисак; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација.

4.4.2. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и усниске киселине на параметре оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту, крви и ткиву миокарда на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности

4.4.2.1. Спектрофотометријско одређивање параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту

Вредности прооксидационих параметара у Е + DOX групи су у великој мери уједначене између PPP 1 и PPP 2. Значајна разлика забележена је у оквиру супероксид анјон радикала при перфузионим притисцима од 60 и 100 cmH₂O, у оквиру водоник пероксида при перфузионим притисцима од 80 и 100 cmH₂O и у оквиру индекса липидне пероксидације при перфузионим притиску од 80 cmH₂O. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, O₂⁻, NO₂⁻ и H₂O₂) у коронарном венском ефлуенту у Е + DOX групи у два узастопна протокола промене притиска представљене су на **Графику 49**.

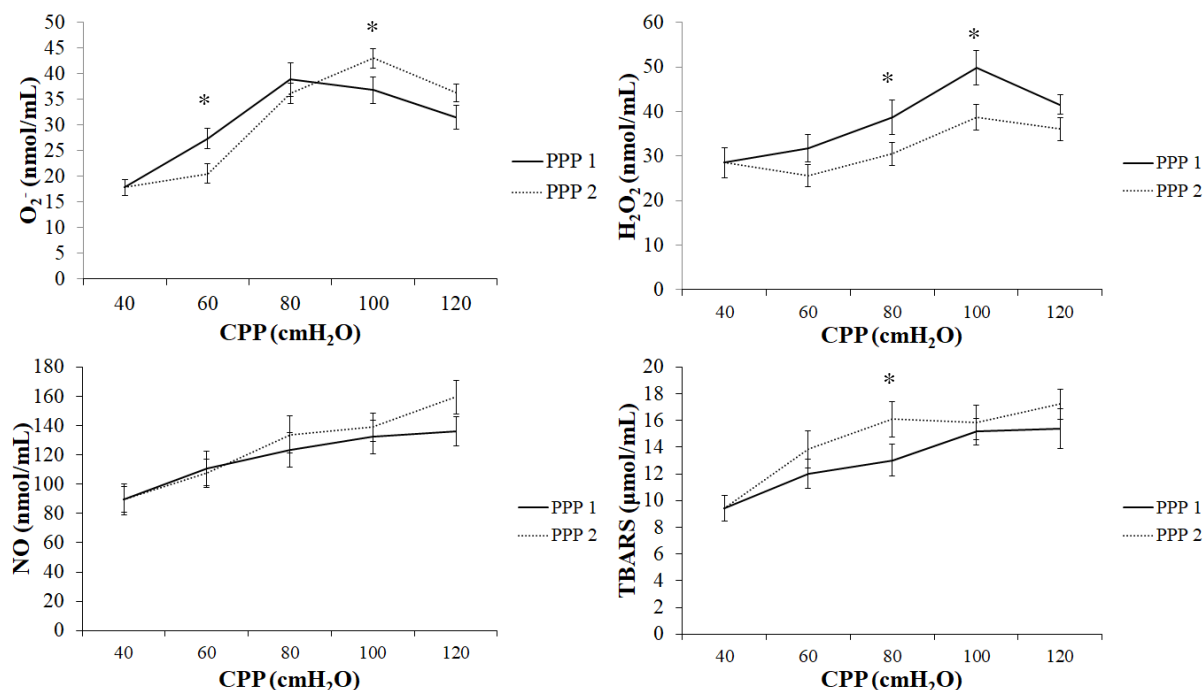


График 49: Вредности прооксидационих параметара (TBARS, O₂⁻, NO₂⁻ и H₂O₂) у коронарном венском ефлуенту у групи третираној доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg (Е + DOX) у два узастопна протокола промене притиска, * – статистички значајна разлика при истом перфузионим притиску у оквиру различитих протокола (p < 0,05 према Tukey HSD тесту); PPP 1 – протокол промене притиска у првом тренутку; PPP 2 – протокол промене притиска у другом тренутку; вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација.

Прооксидациони параметри измерени током PPP 1 и PPP 2 у UA + DOX групи не разликују се значајно изузев у случају супероксид анјон радикала при перфузионим притисцима од 80 и 100 cmH₂O. Вредности прооксидационих параметара (TBARS, O₂⁻, NO₂⁻ и H₂O₂) у коронарном венском ефлуенту у UA + DOX групи у два узастопна протокола промене притиска представљене су на **Графику 50**.

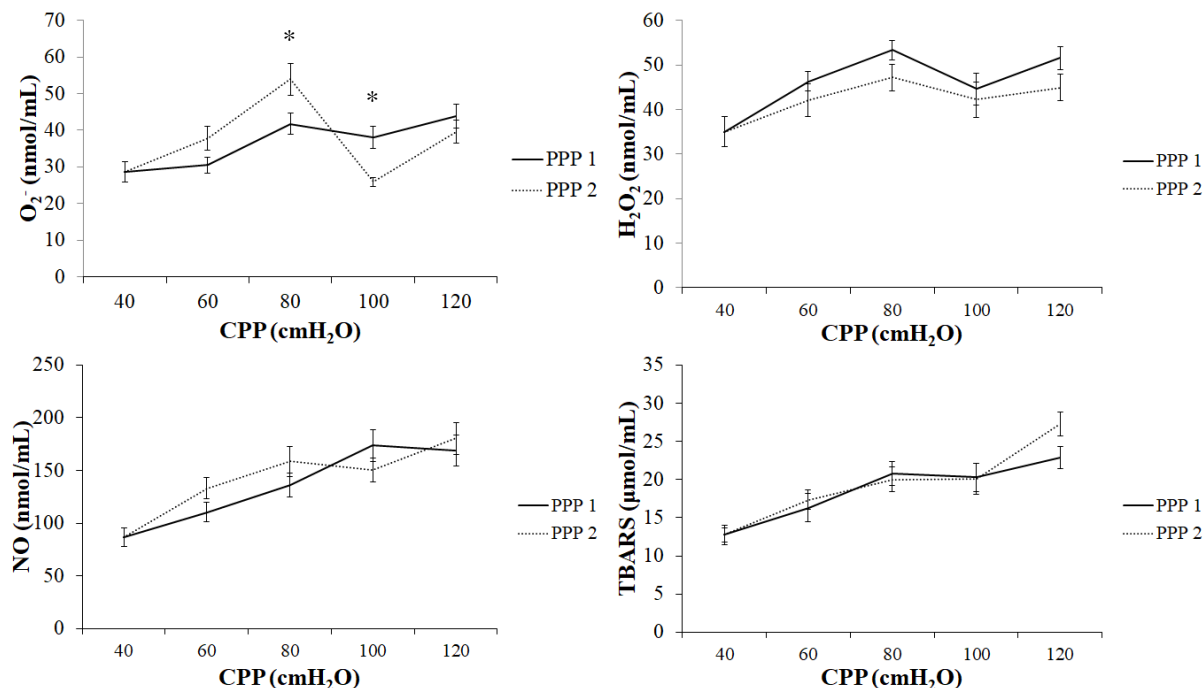


График 50: Вредности прооксидационих параметара (TBARS, O₂⁻, NO₂⁻ и H₂O₂) у коронарном венском ефлуенту у групи третираној доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози од 25 mg/kg (UA + DOX) у два узастопна протокола промене притиска, * – статистички значајна разлика при истом перфузионим притиску у оквиру различитих протокола (p < 0,05 према Tukey HSD тесту); PPP 1 – протокол промене притиска у првом тренутку; PPP 2 – протокол промене притиска у другом тренутку; вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација;

Вредности прооксидационих параметара (TBARS, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2) у коронарном венском ефлуенту за све испитиване групе у два узастопна протокола промене притиска представљене су на **Графику 51**. Може се уочити да су вредности свих испитиваних параметара снижене у Е + DOX групи у односу на DOX групу, док је у UA + DOX групи то случај код супероксид анјон радикала и водоник пероксида. Нитрити и индекс липидне пероксидације били су повишени у UA + DOX групи у поређењу са друге две групе, а нарочито при вишим вредностима перфузионих притисака.

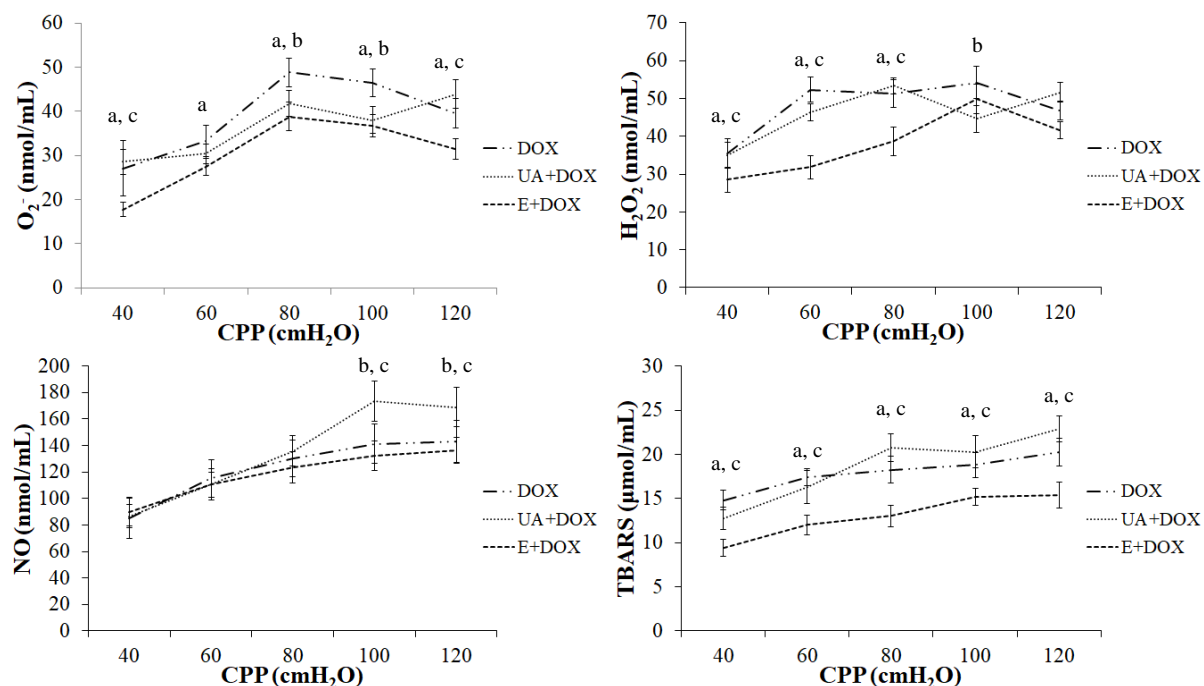


График 51: Комбиновани приказ вредности прооксидационих параметара (TBARS, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2) у коронарном венском ефлуенту у свим испитиваним групама током PPP 1; a – статистички значајна разлика између DOX групе и E + DOX групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); b – статистички значајна разлика између DOX групе и UA + DOX групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту) при истом перфузионом притиску; c – статистички значајна разлика између E + DOX групе и UA + DOX групе ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту) при истом перфузионом притиску; DOX – група третирана доксорубицином; E + DOX – група третирана доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишљаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA + DOX – група третирана доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација.

4.4.2.2. Спектрофотометријско одређивање прооксидационих параметара (TBARS, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2)

Сви испитивани параметри значајно су повећани у DOX групи у поређењу са E + DOX групом. Такође, сви параметри осим нитрита значајно су повећани у DOX групи у поређењу са UA + DOX групом. Поред тога, вредности нитрита значајно су више у UA + DOX групи у поређењу са E + DOX групом (**График 52**).

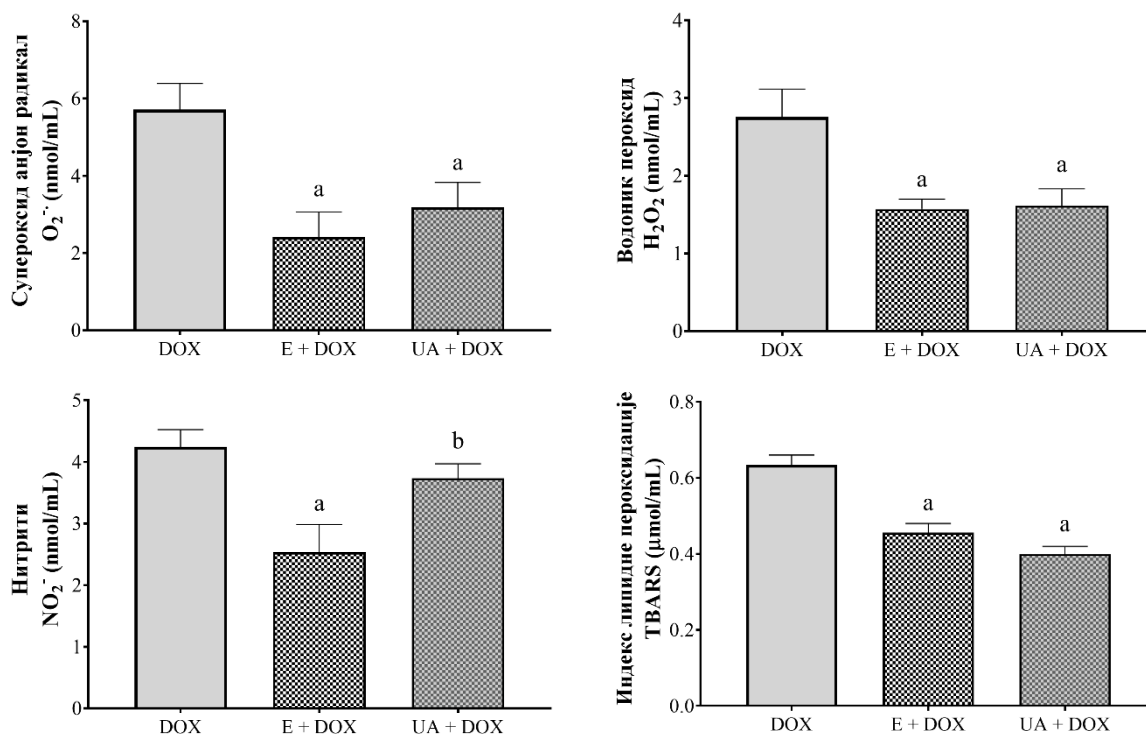


График 52: Вредности системских прооксидационих параметара (TBARS, $O_2^{\cdot-}$, NO_2^- и H_2O_2). а – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); б – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); DOX – група третирана доксорубицином; E + DOX – група третирана доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA + DOX – група третирана доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; n = 10.

4.4.2.3. Спектрофотометријско одређивање параметара који су укључени у систем антиоксидационе заштите (CAT, SOD и GSH)

Сви испитивани параметри значајно су снижени у DOX групи у поређењу са E + DOX и UA + DOX групом. Разлика је најизраженија у случају каталазе где је вредност у DOX групи 3-4 пута нижа у поређењу са друге две групе, након чега следи супероксид дисмутаза где су вредности 2-3 пута ниже. Поред тога нивои каталазе и супероксид дисмутазе значајно су нижи у UA + DOX групи у поређењу са E + DOX групом (График 53).

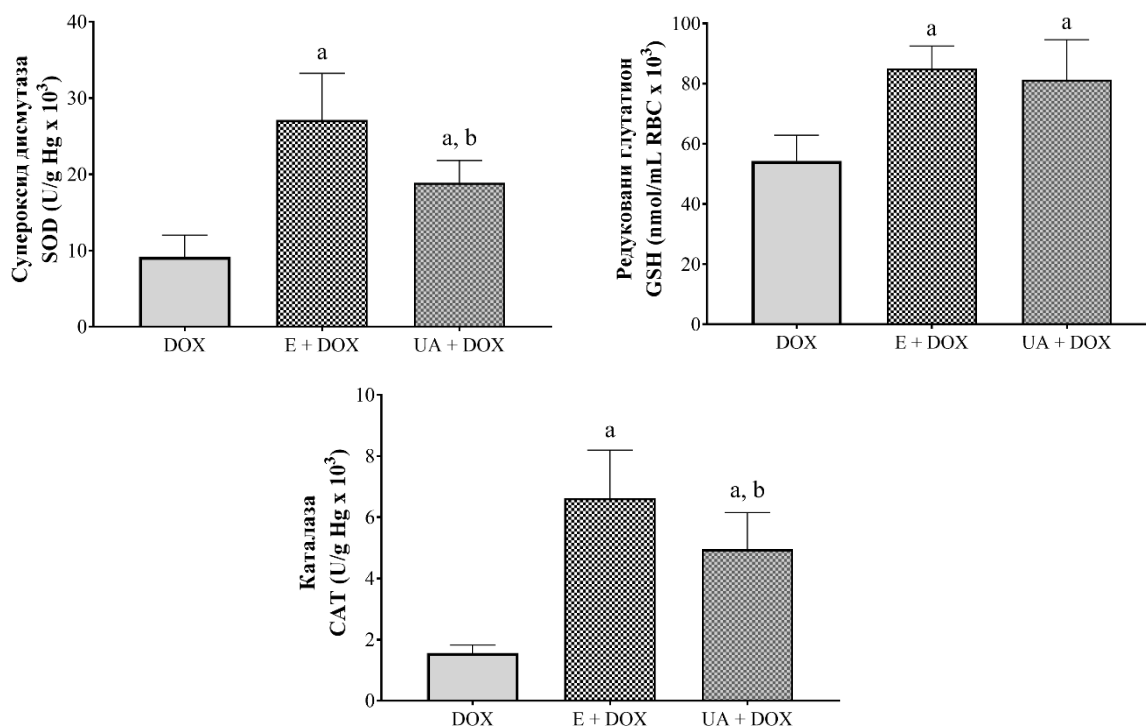


График 53: Вредности системских параметара који су укључени у систем антиоксидационе заштите (CAT, SOD и GSH). a – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); b – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишља *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); DOX – група третирана доксорубицином; E + DOX – група третирана доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишља *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA + DOX – група третирана доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; $n = 10$.

4.4.2.4. Спектрофотометријско одређивање параметара оксидационог стреса у хомогенату ткива миокарда

Сви испитивани параметри у хомогенату ткива миокарда су повећани у DOX групи, али је та разлика статистички значајна у случају супероксид анјон радикала у поређењу са E + DOX групом, односно у случају водоник пероксида у поређењу са обе третиране групе. Код осталих параметара није забележена значајна разлика међу групама (**График 54**).

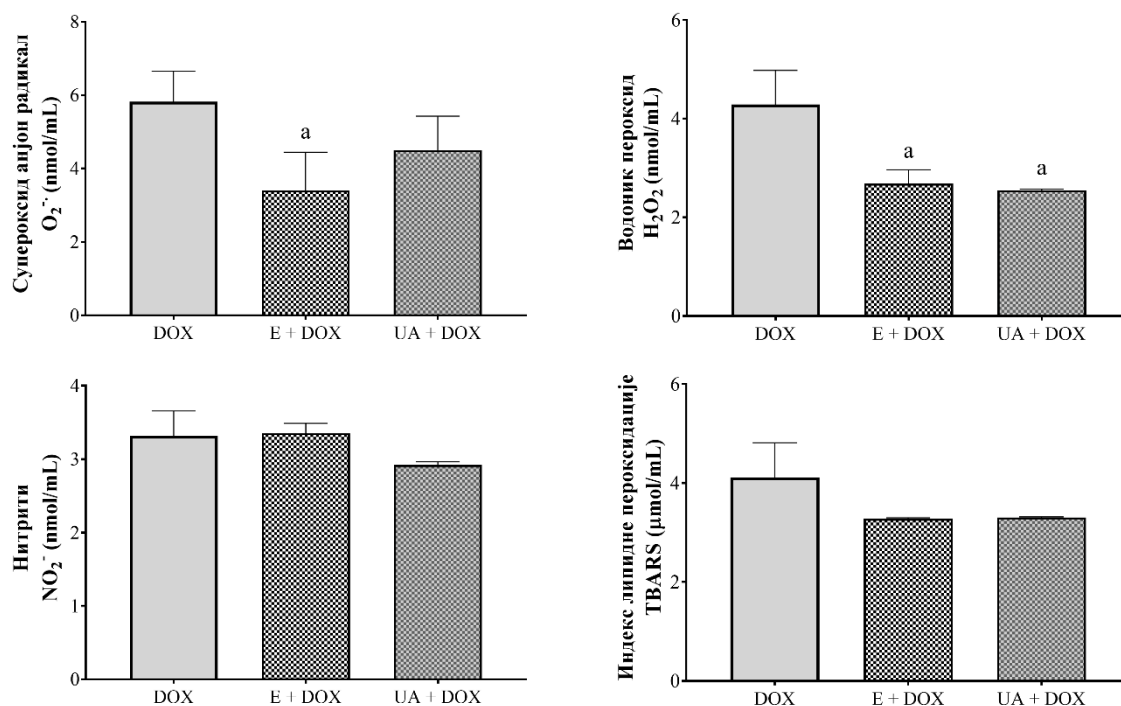


График 54: Вредности прооксидационих параметара (TBARS, O_2^- , NO_2^- и H_2O_2) у хомогенату ткива миокарда. a – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); b – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); DOX – група третирана доксорубицином; E + DOX – група третирана доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA + DOX – група третирана доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; n = 10.

4.4.2.5. Спектрофотометријско одређивање параметара који су укључени у систем антиоксидационе заштите (CAT, SOD и GSH) у хомогенату ткива миокарда

Приликом испитивања параметара система антиоксидационе заштите утврђено је да су вредности супероксид дисмутазе и редукованог глутатиона значајно ниже у DOX групи у поређењу и са E + DOX групом и са UA + DOX групом, док су вредности каталазе значајно ниже у E + DOX групи у поређењу и са DOX групом и са UA + DOX групом (График 55).

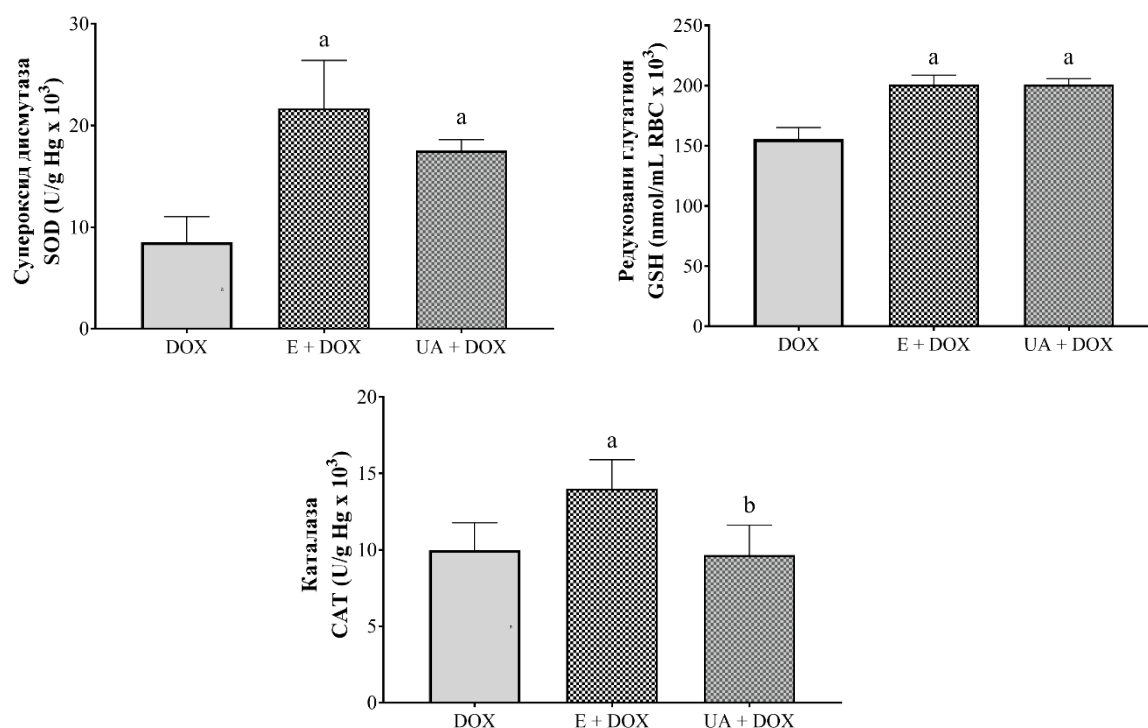


График 55: Вредности параметара који су укључени у систем антиоксидационе заштите (CAT, SOD и GSH) у хомогенату ткива миокарда. а – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); б – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); DOX – група третирана доксорубицином; E + DOX – група третирана доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA + DOX – група третирана доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; $n = 10$

4.4.3. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на биохемијске маркере срчане функције и маркере инфламације на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности

4.4.3.1. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на активност срчаних ензима

Испитивани су исти параметри који су наведени у поглављу 4.2.3.1. На Графику 56 представљене су вредности нивоа високо специфичног С-реактивног протеина (CRP), ензима лактатне дехидрогеназе (LDH), ензима креатин-фосфокиназе МВ (СК-МВ) и тропонина I (СТn-I) у серуму према експерименталним групама

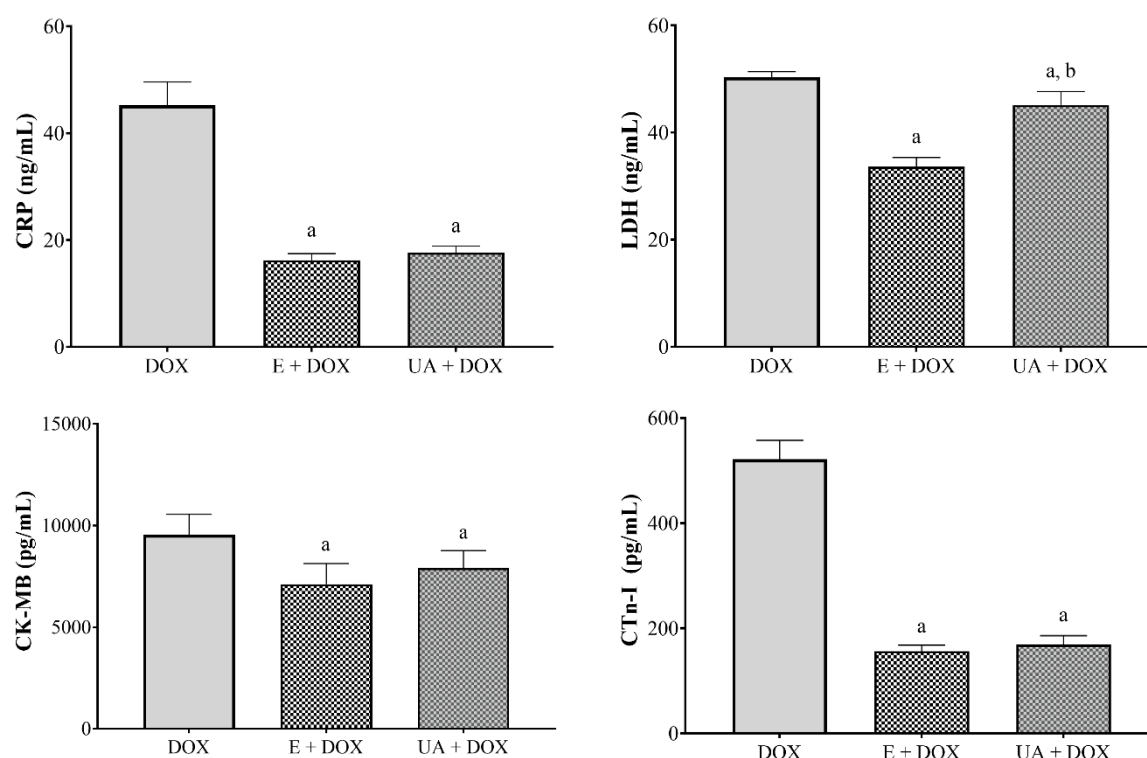


График 56: Вредности нивоа високо специфичног С-реактивног протеина (CRP), ензима лактатне дехидрогеназе (LDH), ензима креатин-фосфокиназе МВ (СК-МВ) и тропонина I (СТn-I) у серуму изражене у нанограмима по милилитру за CRP и LDH (ng/mL) и у пикограмима по милилитру за СК-МВ и СТn-I (pg/mL) према експерименталним групама; а – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); b – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); DOX – група третирана доксорубицином; E + DOX – група третирана доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA + DOX – група третирана доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација; n = 10

Вредности нивоа високо специфичног С-реактивног протеина значајно су увећане у свим групама третираним доксорубицином без обзира на то да ли је примењен предтретман или не. Такође, вредности у групама E + DOX и UA + DOX су значајно ниже у поређењу са DOX групом. За поређење вредности међу групама искоришћен је тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест), при чему је $F=323,10$, а $p < 0,001$. Сличан тренд прате и вредности СК-МВ и СТn-I у серуму, где се поново уочава значајно смањење вредности

у групама E + DOX и UA + DOX у поређењу са DOX групом. Вредности ANOVA теста за СК-МВ и СТn-I су $F=56,56$ ($p<0,001$) и $F=600,80$ ($p<0,001$) респективно. У случају LDH уочава се да постоји статистички значајна разлика међу свим испитиваним групама укључујући и разлику између E + DOX групе и UA + DOX групе, што је у складу и са вишим вредностима LDH у UA групи (поглавље 4.3.3.1.). Вредност ANOVA теста је $F=348,80$ ($p<0,001$).

4.4.3.2. Испитивање утицаја примене ацетонског екстракта лишља *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на маркере инфламације

Испитивани су исти параметри који су наведени у поглављу 4.2.3.2..

Тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест) коришћен је за поређење вредности међу групама за проинфламаторне цитокине при чему су добијене вредности $F=13,96$ ($p<0,001$) за IL-1 α и $F=38,88$ ($p<0,001$) за IL-8.

На **Графику 57** представљене су вредности проинфламаторних цитокина интерлеукина-1 α (IL-1 α) и интерлеукина 8 (IL-8) према експерименталним групама.

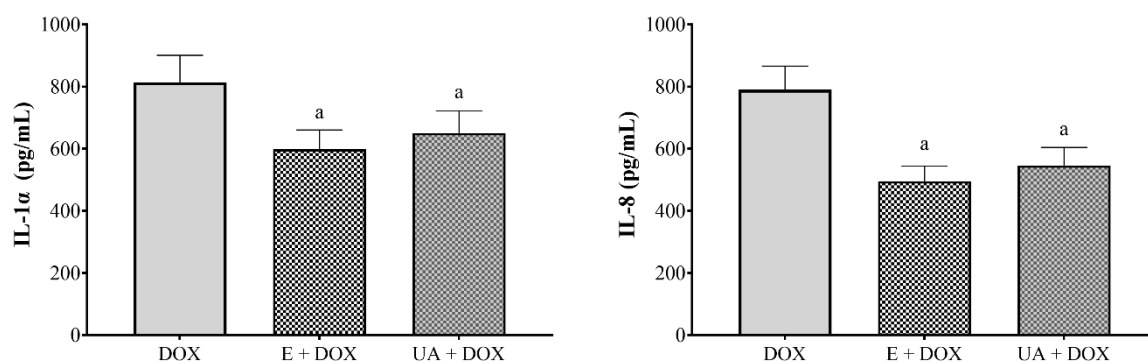


График 57: Вредности проинфламаторних цитокина интерлеукина-1 α (IL-1 α) и интерлеукина 8 (IL-8) у серуму, према експерименталним групама.; a – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином ($p<0,05$ према Tukey HSD тесту); DOX – група третирана доксорубицином; E + DOX – група третирана доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишља *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA + DOX – група третирана доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; n = 10

Вредности проинфламаторних цитокина биле су значајно снижене и у E + DOX групи и у UA + DOX групи у поређењу са DOX групом, при чему је вредност IL-8 била приближно двоструко нижа у E + DOX групи у поређењу са DOX групом. Није било разлике у вредностима проинфламаторних цитокина између E + DOX групе и UA + DOX групе.

Тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест) коришћен је за поређење вредности међу групама за антиинфламаторне цитокине при чему су добијене вредности $F=7,49$ ($p=0,006$) за IL-4, $F=14,44$ ($p<0,001$) за IL-10 α и $F=8,74$ ($p=0,003$) за TGF β .

На **Графику 58** представљене су вредности антиинфламаторних цитокина интерлеукина-4 (IL-4), интерлеукина-10 (IL-10) и трансформишућег фактора раста β (TGF β) према експерименталним групама.

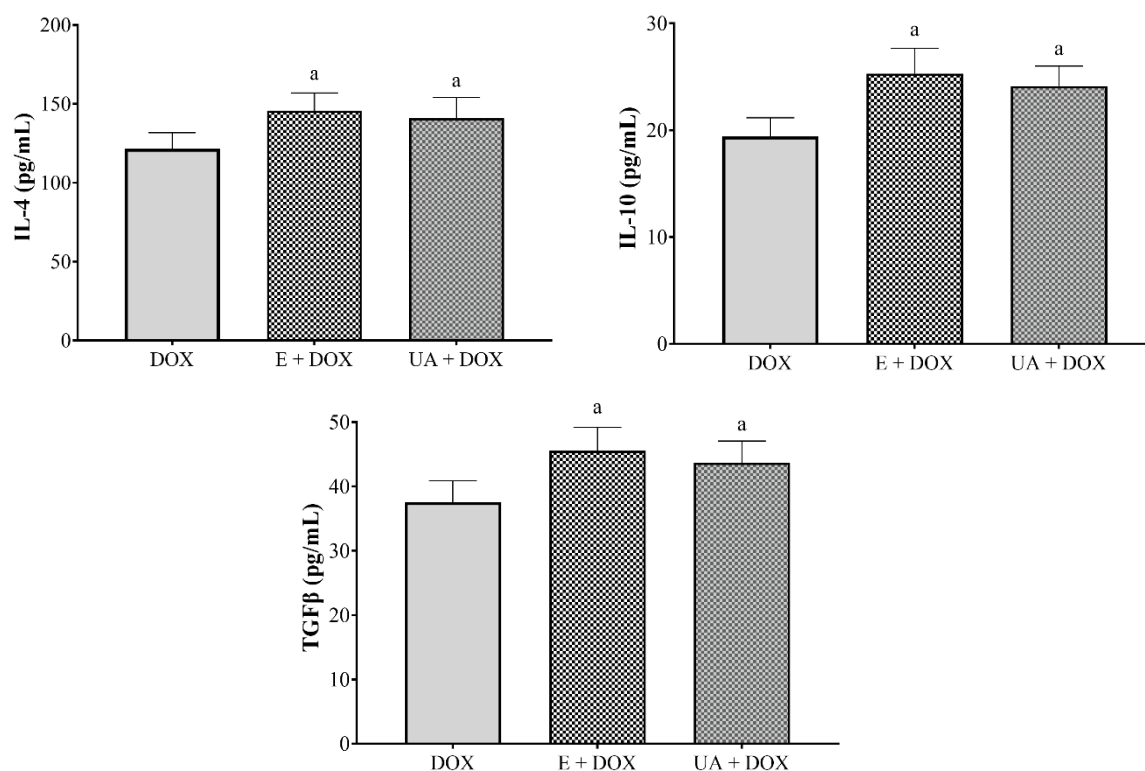


График 58: Вредности антиинфламаторних цитокина интерлеукина-4 (IL-4), интерлеукина-10 (IL-10) и трансформишућег фактора раста β (TGF β) у серуму, према експерименталним групама.; a – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); DOX – група третирана доксорубицином; E + DOX – група третирана доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA + DOX – група третирана доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; n = 10

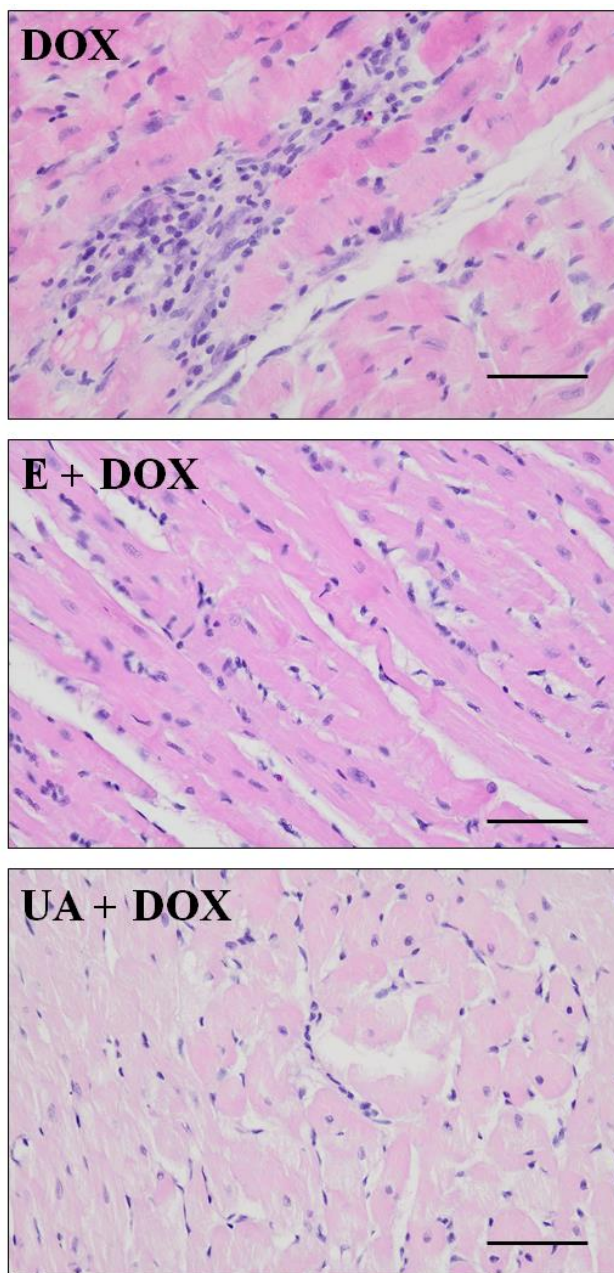
У случају антиинфламаторних цитокина забележен је значајан пораст вредности сваког појединачног параметра у E + DOX групи и у UA + DOX групи у поређењу са DOX групом. Вредности истих параметара нису се значајно разликовале између E + DOX групи и у UA + DOX групе.

4.4.4. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на патохистолошке карактеристике ткива миокарда на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности

4.4.4.1. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на ткиво миокарда- бојење хематоксилин-еозин методом

У групи животиња третираној доксорубицином након примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* (E + DOX) уочава се хипертофија мишићних влакана са хипертрофијом појединачних једара, инфламација, едем интерстицијума, као и таласаста влакна. Све наведене промене знатно су слабије изражене у овој групи него у групи третираној само доксорубицином, што указује на протективни ефекат компоненти екстракта. У групи животиња третираној доксорубицином након примене уснинске киселине (UA + DOX) уочава се хипертофија појединачних мишићних ћелија, дискретна инфламација, без присуства таласастих влакана, едема интерстицијума и издужених

једара. Ткивни пресеци миокарда испитиваних група бојени хематоксилин/еозин техником представљени су на **Слици 15**.



Слика 15: Ткивни пресеци миокарда испитиваних група бојени хематоксилин/еозин техником. DOX – група третирана доксорубицином; E + DOX – група третирана доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA + DOX – група третирана доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; коришћено увећање 40x; величина скале 10 μ m.

4.4.4.2. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишља *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на фиброзу миокарда и садржај колагена применом *Picrosirius red* методе

У групи третираној ацетонским екстрактом лишља *Xanthoparmelia stenophylla* пре примене кумулативне дозе доксорубицина (E + DOX) ниво колагена био је 30% виши у поређењу са контролном групом, али истовремено 40% нижи у поређењу са групом третираном само доксорубицином. У групи третираној уснинском киселином пре примене кумулативне дозе доксорубицина (UA + DOX) ниво колагена био је 24% виши у поређењу са контролном групом, али истовремено 43% нижи у поређењу са групом третираном само доксорубицином. Утврђено је да постоји значајна разлика у садржају колагена међу испитиваним групама ($F=39,07$; $p<0,001$). Садржај колагена у ткивним исечцима миокарда према испитиваним групама представљен је на **Графику 59**. Ткивни пресеци миокарда свих испитиваних група бојени применом *Picrosirius red* методе у циљу откривања фиброзе и идентификације колагена представљени су на **Слици 16**.

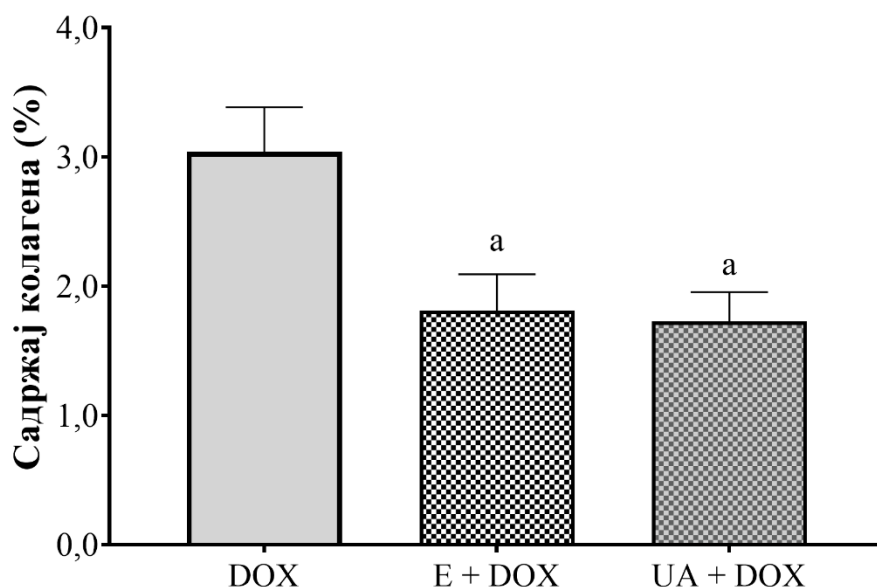
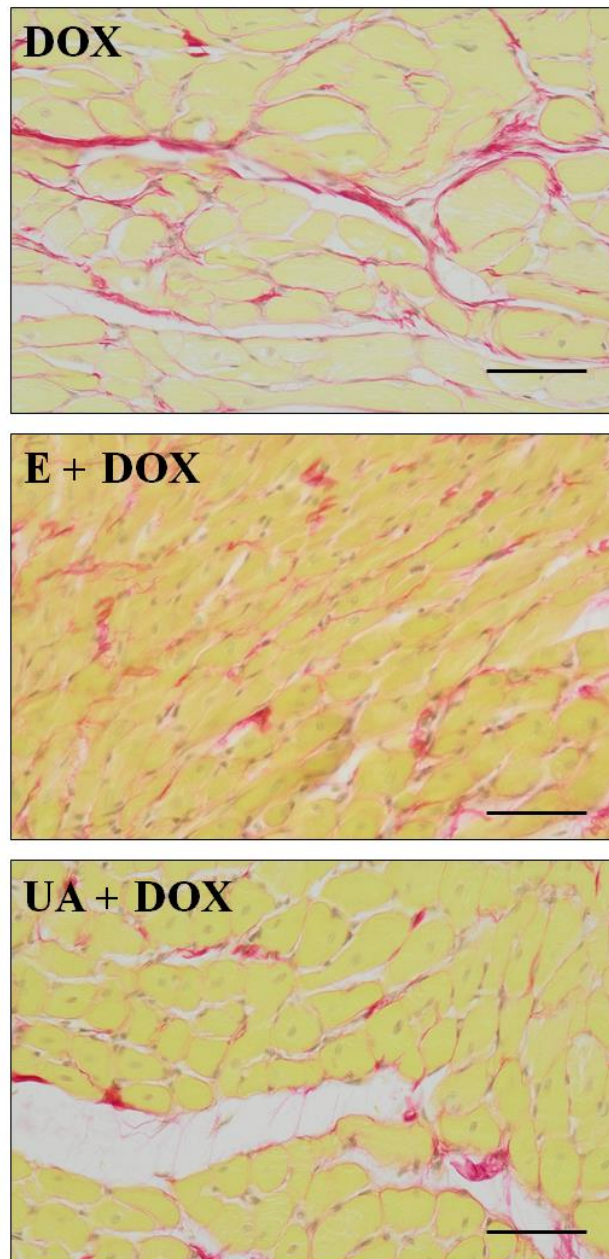


График 59: Садржај колагена у процентима у ткивним исечцима миокарда према испитиваним групама. а – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином ($p<0,001$ према Tukey HSD тесту); DOX – група третирана доксорубицином; E + DOX – група третирана доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишља *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA + DOX – група третирана доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози 25 mg/kg.



Слика 16: Ткивни пресеци миокарда испитиваних група бојени Picrosirius Red техником. DOX – група третирана доксорубицином; E + DOX – група третирана доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA + DOX – група третирана доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; коришћено увећање 40x; величина скале 10 μ m.

4.4.5. Испитивање ефеката примене ацетонског екстракта лишља *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на релативну експресију гена укључених у оксидациони стрес, апоптозу и инфламацију у левој комори срца на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности

4.4.5.1. Релативна експресија гена укључених у оксидациони стрес у левој комори срца

Испитивани су исти параметри који су наведени у поглављу 4.2.5.1.

Тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест) коришћен је за поређење вредности међу групама за све испитиване гене при чему су добијене вредности $F=30,69$ ($p<0,001$) за SOD-1, $F=50,49$ ($p<0,001$) за SOD-2 и $F=17,29$ ($p<0,001$) за eNOS. Релативна експресија гена удружених са оксидационим стресом (SOD-1, SOD-2 и eNOS) представљена је на Графику 60.

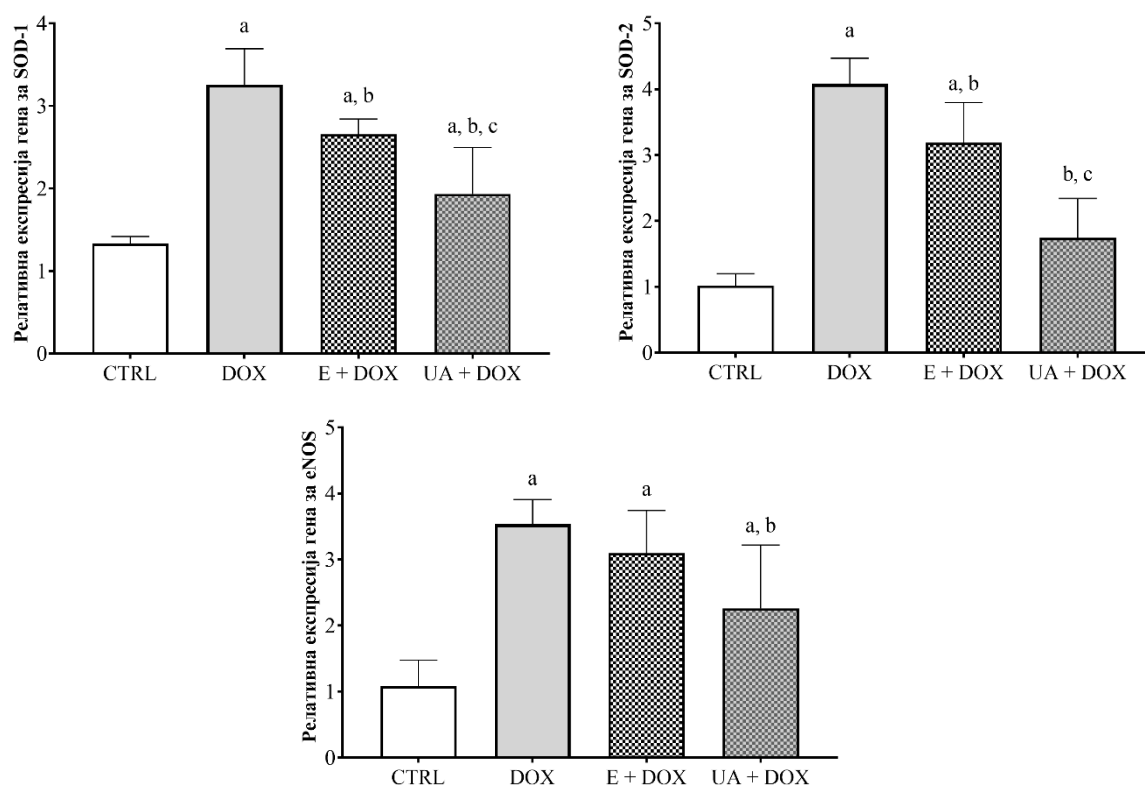


График 60: Релативна експресија гена удружених са оксидационим стресом (ген за супероксид дисмутаза 1 (SOD-1), ген за супероксид дисмутаза 2 (SOD-2) и ген за ендотелну азот-моноксид синтетазу (eNOS)) према експерименталним групама; a – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p<0,05$ према Tukey HSD тесту); b – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином ($p<0,05$ према Tukey HSD тесту); c – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишља *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg ($p<0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; DOX – група третирана доксорубицином; E + DOX – група третирана доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишља *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA + DOX – група третирана доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози 25 mg/kg; вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; $n = 10$.

Може се уочити да доксорубицин значајно повећава релативну експресију гена удружених са оксидационим стресом. Такође, може се уочити да примењени третман ацетонским екстрактом лишља *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинском киселином значајно редукује експресију испитиваних гена и то свих испитиваних гена у случају

уснинске киселине, односно гена за SOD-1 и SOD-2 у случају ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*. У случају гена за SOD-1 и SOD-2 третман уснинском киселином смањује релативну експресију гена и у поређењу са ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, док у случају гена за SOD-2 третман уснинском киселином релативну експресију гена смањује на ниво који се не разликује од оног у контролној групи.

4.4.5.2. Релативна експресија гена укључених у процес апоптозе у левој комори срца

Испитивани су исти параметри који су наведени у поглављу 4.2.5.2.

Тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест) коришћен је за поређење вредности међу групама за све испитиване гене при чему су добијене вредности $F=13,17$ ($p<0,001$) за Вах, $F=28,03$ ($p<0,001$) за Вcl-2, $F=14,01$ ($p<0,001$) за Cas-3 и $F=27,49$ ($p<0,001$) за Cas-9. Релативна експресија гена удружених са апоптозом (Вах, Вcl-2, Cas-3 и Cas-9) представљена је на **Графику 61**.

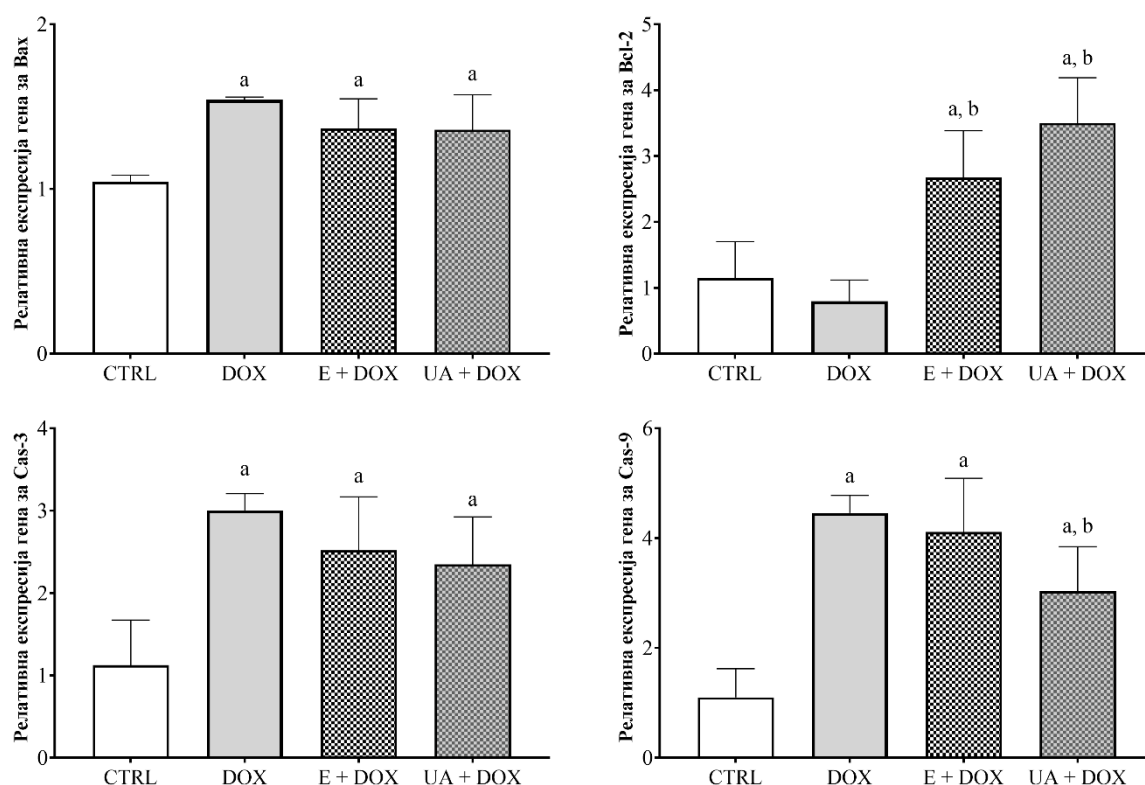


График 61: Релативна експресија гена удружених са апоптозом (ген за Вcl-2 повезани протеин X (Вах), ген за Б-ћелијски лимфом 2 (Вcl-2), ген за каспазу 3 (Cas-3) и ген за каспазу 9 (Cas-9)) према експерименталним групама; а – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p<0,05$ према Tukey HSD тесту); б – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином ($p<0,05$ према Tukey HSD тесту); с – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg ($p<0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; DOX – група третирана доксорубицином; E + DOX – група третирана доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA + DOX – група третирана доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози 25 mg/kg. вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација; $n = 10$.

Код свих испитиваних проапоптотских гена постоји статистички значајна разлика између DOX групе, E + DOX групе и UA + DOX групе у поређењу са CTRL групом

изузимајући ген за Bcl-2 где не постоји разлика између CTRL и DOX групе. Ни за један од испитиваних гена третман ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинском киселином није редуковао релативну експресију на ниво који је измерен у контролној групи. Код антиапоптотског Bcl-2 гена релативна експресија је смањена у DOX групи у поређењу са CTRL групом, док је у групама E + DOX и UA + DOX била 3-4 пута повишена у односу на CTRL групу и DOX групу. Релативна експресија гена за Cas-9 била је значајно нижа и у UA + DOX групи у поређењу са DOX групом. Није постојала статистички значајна разлика ни за један од испитиваних гена удружених са апоптозом између E + DOX групе и UA + DOX групе.

4.4.5.3. Релативна експресија гена укључених у процес инфламације у левој комори срца

Испитивани су исти параметри који су наведени у поглављу **4.2.5.3.**

Тест једностране анализе варијансе (ANOVA тест) коришћен је за поређење вредности међу групама за све испитиване гене при чему су добијене вредности $F=39,72$ ($p<0,001$) за IL-6, $F=13,91$ ($p<0,001$) за IL-10, $F=6,22$ ($p=0,004$) за IL-13, $F=29,70$ ($p<0,001$) за NF-κB и $F=28,19$ ($p<0,001$) за TNFα. Релативна експресија гена удружених са инфламацијом (IL-6, IL-10, IL-13, NF-κB, и TNFα) представљена је на **Графику 62**. У случају гена за IL-6 и NF-κB показано је да третман ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* не доводи до значајног смањења релативне експресије наведених гена у односу на групу која је третирана само доксорубицином. Такође, третман уснинском киселином значајно редукује експресију истих гена у односу на DOX групу и E + DOX групу, али не редукује вредности на ниво из контролне групе. У случају гена за IL-13 оба третмана су се показала подједнако ефикасним у поређењу са групом третираном доксорубицином, при чему су за E + DOX и UA + DOX групе забележене вредности које се не разликују значајно у односу на CTRL групу. Код гена за TNFα уочено је да су оба третмана значајно редуковала релативну експресију гена у односу на DOX групу, при чему се као ефикаснији третман показала уснинска киселина, која вредност експресије гена смањује на ниво који је упоредив са нивоом у контролној групи.

Код гена за IL-10, који испољава антиинфламаторни ефекат, релативна експресија је смањена у DOX групи у поређењу са CTRL групом, док је у групама E + DOX и UA + DOX двоструко већа односу на CTRL групу и DOX групу.

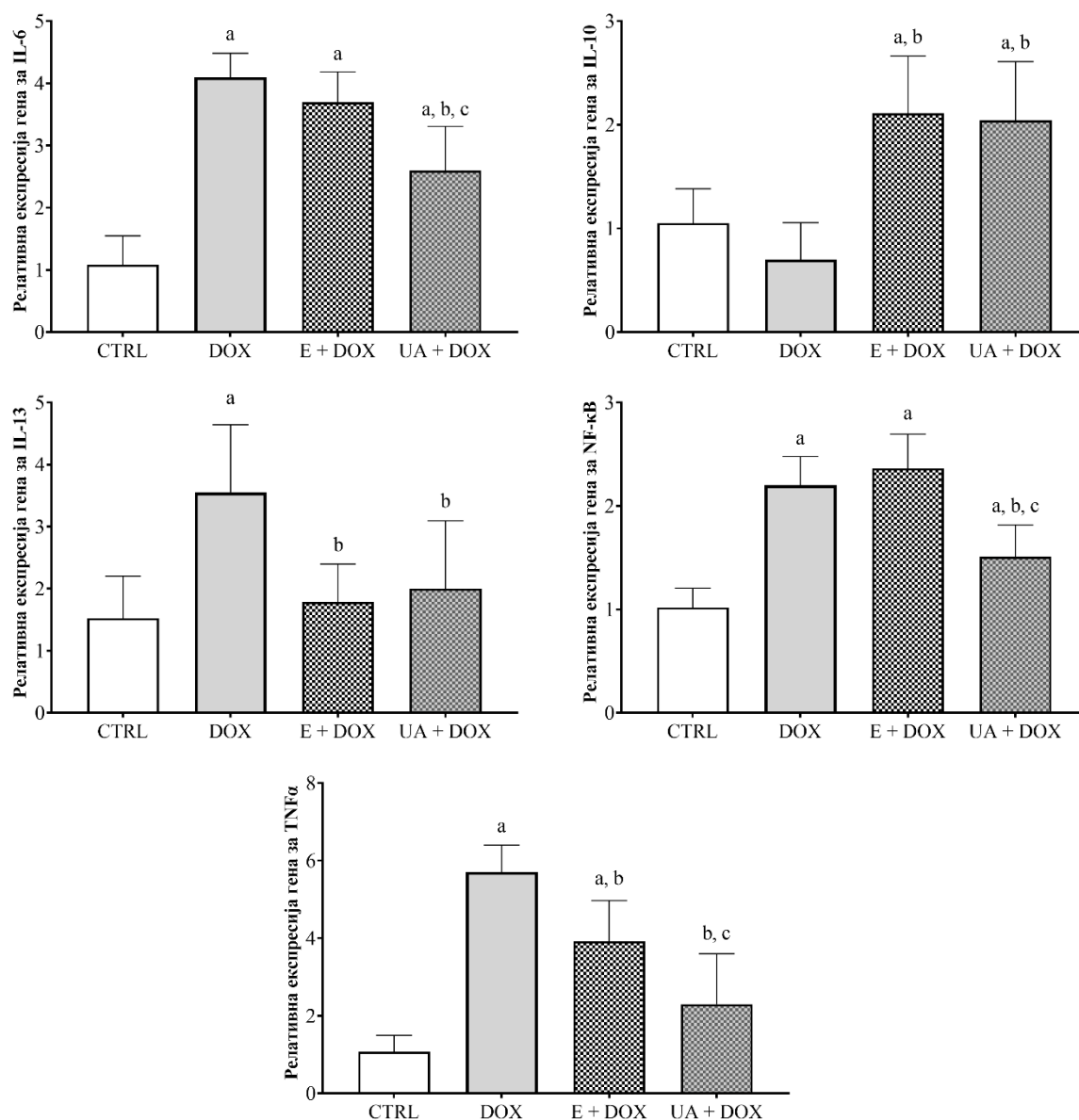


График 62: Релативна експресија гена удружених са инфламацијом (ген за интерлеукин 6 (IL-6), ген за интерлеукин 10 (IL-10), ген за интерлеукин 13 (IL-13), ген за нуклеарни транскрипциони фактор капа Б (NF-κB) и ген за фактор некрозе тумора α (TNFα)) према експерименталним групама; а – статистички значајна разлика у поређењу са контролном групом ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); б – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); с – статистички значајна разлика у поређењу са групом третираном доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишaja *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg ($p < 0,05$ према Tukey HSD тесту); CTRL – контролна група; DOX – група третирана доксорубицином; E + DOX – група третирана доксорубицином након третмана ацетонским екстрактом лишaja *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg; UA + DOX – група третирана доксорубицином након третмана уснинском киселином у дози 25 mg/kg. вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација; n = 10

V ДИСКУСИЈА

5.1. Припрема и фитохемијска карактеризација екстраката лишаја

Xanthoparmelia stenophylla и испитивање њихове биолошке

активности

5.1.1. Фитохемијска карактеризација и принос екстракције

Екстракција активних принципа из различитих биолошких извора увек представља изазов у модерној фармакогнозији и фармацији. И поред бројних технолошких иновација изоловање само једног једињења и даље изискује детаљно познавање како теоријских основа раздвајања различитих супстанци, тако и практичне примене различитих екстракционих поступака и техника пречишћавања. Лишајеви се од осталих биолошких извора разликују и по томе што садрже велики број секундарних метаболита различите хемијске структуре, а самим тим и различитих физичких и хемијских особина.

Танкослојна хроматографија је једна од најважнијих метода у прелиминарној фитохемијској анализи свих врста екстраката, па и екстраката лишајева (100). Омогућава брзу оријентацију у смислу броја супстанци присутних у неком узорку и њиховој количини, али није довољна за самостално доношење одлука, већ те налазе треба потврди неком од напреднијих хроматографских или спектроскопских метода (101). У нашем истраживању смо већ након TLC анализе могли да закључимо да сва три испитивана екстракта садрже уснинску киселину и то тако што је су се мрље са истим ретенционим фактором ($R_f=0,76$) појавиле у свим екстрактима. Поред тога уочено је да екстракти садрже још најмање једну заједничку компоненту ($R_f=0,64$), која у првом тренутку није могла да буде идентификована, али се каснијем упоређивањем са резултатима HPLC анализе дошло до закључка да је у питању леканорна киселина.

Наше истраживање показало је да лишај *Xanthoparmelia stenophylla* садржи различите активне принципе из групе секундарних метаболита лишајева поред до сада већ познате и идентификоване уснинске киселине. Као главни састојци идентификована су једињења депсидне структуре леканорна киселина, obtusichna киселина и атранорин. Леканорна киселина и obtusichna киселина присутне су у сва три испитивана екстракта, док је атранорин идентификован само у n-хексанском екстракту. Уснинска киселина је најзаступљенија у n-хексанском екстракту у коме процентуално гледано чини више од половине свих идентификованих супстанци. Присуство уснинске киселине претходно је потврђено у лишају *Xanthoparmelia stenophylla* (44), али су леканорна киселина, obtusichna киселина и атранорин идентификовани први пут у овом лишају. Значајно је напоменути и то да су се екстракти разликовали по приносу екстракције при чему је највећи принос добијен коришћењем ацетона као растварача (5,05%), затим метанола (2,11%) и на крају n-хексана (0,91%). Ацетон се, још од зачетка испитивања фитохемијских истраживања лишајева, сматра најпогоднијим растварачем јер му његове физичко-хемијске карактеристике омогућавају да раствори већину супстанци присутних у узорцима лишајева. Зато је ацетон најчешће први избор растварача када се изводе нека од прелиминарних испитивања хемијског састава лишајева (54, 102). Истовремено се показало да је избор растварача један од најважнијих параметара приликом планирања и извођења процеса екстракције, не само када су у питању лишајеви већ и сви други природни производи.

5.1.2. Укупан садржај фенолних и флавоноидних једињења и антиоксидациона активност

Последњих година улога оксидационог стреса у патогенези многих болести постаје све чешћи предмет бројних истраживања. Лишајеви представљају значајан и још увек недовољно истражен ресурс нових једињења различите хемијске структуре и разнородне биолошке активности. Специфичност једињења пореклом из лишајева односно њихових секундарних метаболита огледа се у постојању различитих моноцикличних и полицикличних структура које могу бити ароматичне, а истовремено сва једињења садрже велики број различитих функционалних група као што су хидроксилна, фенолна, карбоксилна и карбонилна група, које могу бити носиоци антиоксидационог дејства (103, 104).

Наши резултати указују да су у ацетонском екстракту лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* најзаступљенија фенолна и флавоноидна једињења што је у складу са способношћу растварања ових једињења у растварачима какав је ацетон. На садржај фенола и флавоноида у неком екстракту утичу бројни фактори, као што су: биолошки извор, односно врста материјала природног порекла који се користи за екстракцију, затим од особина растварача који се користи за екстракцију, врсте екстракционог процеса који се користи и слично (57, 105, 106).

Поред тога што садржи највећу количину фенолних и флавоноидних једињења ацетонски екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* испољио је највећу антиоксидациону активност у свим методама које су коришћене за тестирање у оквиру овог истраживања (способност неутралисања DPPH радикала, способност неутралисања хидроксил радикала и способност неутралисања супероксид-анјон радикала). Ово је очекивани резултат пошто се феноли и флавоноиди, као поларна једињења, боље растварају у поларним растварачима какви су ацетон и метанол. Фенолна и флавоноидна једињења су доминантни носиоци антиоксидационог ефекта већине екстраката, па је тако очекивано и да екстракти са највећим садржајем наведених једињења испољавају највећи антиоксидациони капацитет.

Ацетонски екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* издвојио се и по томе што садржи највећу количину леканорне киселине у поређењу са друга два екстракта. Иако у овом случају постоји снажна позитивна корелација између садржаја фенолних и флавоноидних једињења и испољене антиоксидационе активности, као и у другим студијама (107-110), не треба заборавити чињеницу да на антиоксидациону активност могу утицати и друга једињења, каква су полисахариди и протеини, која су присутна у екстракту. Ова једињења могу деловати синергистички са фенолним и флавоноидним једињењима и на тај начин побољшати њихов антиоксидациони ефекат, а са друге стране може доћи и до међусобне интеракције ових једињења, при чему долази до смањења броја слободних реакционих центара у молекулима фенола и флавоноида чиме се смањује њихова способност да испоље антиоксидациони ефекат (111, 112). Поред тога, у претходним истраживањима показано је да леканорна киселина испољава значајан антиоксидациони ефекат (66), чиме се додатно може објаснити најизраженији антиоксидациони ефекат код ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*.

Постоје бројне студије у којима су испитиване антиоксидационе карактеристике екстраката лишајева и изолованих секундарних метаболита лишајева, али и даље нису у потпуности разјашњени механизми којима ове супстанце остварују антиоксидациони ефекат (103, 113, 114). На основу свих наведених података одлучено је да се у делу истраживања на животињама користи ацетонски екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*.

5.1.3. Антимикробна и антибиофилм активност екстраката лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине

5.1.3.1. Антимикробна активност

Услед повећане појаве мултирезистентних микроорганизама, истраживања су све чешће усмерена ка открићу нових антимикробних агенаса природног порекла. Разноврсна структура секундарних метаболита лишајева, као и већ доказано антимикробно дејство лишајева, ставља лишајева у фокус истраживања, нарочито у производњи напредних формулација, као што су наночестице (115-118).

Антимикробни ефекат лишајева из породице Parmeliaceae на хумане патогене бактерије (119), као и екстраката врсте *Xanthoparmelia stenophylla* познат је у литератури (120-123). *Kinalioğlu* и сарадници испитивали су антимикробну активност ацетонског и хлороформског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*. Хлороформски екстракт испољава јаку антимикробну активност у односу на *Bacillus megaterium*, али ни ацетонски ни хлороформски екстракт нису показали антимикробну активност у односу на *K. pneumoniae* (120). У нашем истраживању добили смо сличне резултате када је у питању антимикробни ефекат на бактерију *K. pneumoniae*.

Simonyan и сарадници испитивали су антибактеријску активност метанолног, етанолног, ацетонског и воденог раствора лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* диск-дифузионом методом (122). Водени екстракт није показао антибактеријску активност, док су метанолни, етанолни и ацетонски екстракт показали антибактеријску активност према тестираним Грам-позитивним бактеријама (*B. subtilis*, *S. aureus*), али не и према Грам-негативним бактеријама (*E. coli*, *S. typhimurium*). Наши резултати показују да и ацетонски и метанолни екстракт показују добру антибактеријску активност према Грам-позитивним бактеријама.

Houshyar и сарадници испитивали су антимикробну активност екстраката лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* добијених применом ацетона, метанола и хлороформа као растварача (123), применом две методе и то диск-дифузионе методе и методе одређивања МИС и ММС. Најизраженију активност показао је хлороформски екстракт, након чега следе ацетонски и метанолни екстракт. Израженије антимикробно дејство ацетонског екстракта у поређењу са метанолним екстрактом је у складу са резултатима нашег истраживања.

У студији *Sökmen* и сарадника испитана је антифунгална активност ацетонитрилних екстраката лишајева из породице Parmeliaceae применом диск-дифузионе методе (121). Екстракт *Flavoparmelia caperata* испољио је максималну антифунгалну активност у односу на *C. albicans* (32 mm), док је минималну антифунгалну активност испољио екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у односу на *S. cerevisiae* (10 mm). Према нашим резултатима, n-хексански екстракт показао је јаку антифунгалну активност, на основу чега можемо закључити да екстракти лишаја могу бити потенцијална замена хемијски синтетисаним једињењима.

Према нашим сазнањима, до сада у литератури нису презентовани резултати испитивања антимикробне активности n-хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*. На основу HPLC анализе, може се уочити да је најдоминантнија компонента у n-хексанском екстракту лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* уснинска киселина, а затим и леканорна киселина и атранорин, са релативно малим садржајем obtusичне киселине. Слободне карбоксилне и фенолне групе у леканорној киселини могу бити потенцијални носиоци антимикробне активности (124), док се уснинска киселина већ показала као добар антимикробни агенс (48). У једном од истраживања, показало се да леканорна киселина

има приближно 10-20 пута јачи ефекат у поређењу са екстрактима из којих је изолована леканорна киселина (66). Атранорин присутан у п-хексанском екстракту лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* је умерен антимикуробни агенс ефикасан у односу на Грам-позитивне бактерије *S. aureus*, *B. subtilis*, и *B. cereus*, као и на Грам-негативне бактерије *K. pneumoniae* и *E. coli*. Уочено је и дејство према гљивама *C. albicans* и *A. niger* (125). Могуће је да синергистички ефекат депсидних компоненти леканорне киселине и атранорина, као и уснинске киселине, која има дибензофуранску структуру, доводи до тога да п-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* има израженију антимикуробну активност у односу на ацетонски и метанолни екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, али и у односу на саму уснинску киселину, нарочито код бактеријских сојева *P. mirabilis* ATCC 12453, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* ATCC 27853. Уочено је да је антимикуробна активност екстраката повезана са концентрацијом секундарних метаболита присутних у испитиваним екстрактима.

Уснинска киселина, једињење које је продукт бројних врста лишајева, има инхибиторни ефекат на раст многих бактерија. Према студији аутора из Пољске (126), уснинска киселина доводи до брзе и снажне инхибиције синтезе РНК и ДНК код Грам-позитивних бактерија (*B. subtilis*, *S. aureus*), док код Грам-негативне бактерије (*E. coli*) не долази до инхибиције синтезе макромолекула (РНК, ДНК и протеина), чак ни при високим дозама овог једињења. Инхибиција синтезе протеина код *B. subtilis* и *S. aureus* је одложена, што указује на индиректно деловање уснинске киселине на транслацију. Занимљиво, синтеза ДНК је брзо заустављена код *B. subtilis* и *S. aureus*, што указује на интерференцију уснинске киселине са елонгацијом ДНК репликације. Предложено је да инхибиција синтезе РНК може бити механизам антибактеријског ефекта уснинске киселине, са додатним директним механизмима као што је ометање репликације ДНК код *B. subtilis* и *S. aureus*. Добијени резултати указују на то да уснинска киселина показује јачи антимикуробни ефекат према Грам-позитивним бактеријама у односу на Грам-негативне, што је у складу са претходним истраживањима доступним у литератури (47, 48, 126).

5.1.3.2. Антибиофилм активност

Антибиофилм активност ацетонског, метанолног и п-хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* до сада није испитивана. Микроорганизми који имају способност пријањања за подлогу формирају биофилм. Биофилм представља сложену бактеријску структуру, која омогућава бактеријама омогућава колонизацију, доводи до развоја резистенције код бактеријских сојева и на тај начин омогућава настанак локалних и системских инфекција. Из литературе је познато да уснинска киселина, као секундарни метаболит лишајева, поседује антимикуробну активност према Грам-позитивним, планктонским бактеријама укључујући *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* и *E. faecium*. Francolini и сарадници (127) су показали да се уснинска киселина може користити у контроли медицинских биофилмова које формирају *S. aureus* and *P. aeruginosa* (). Уснинска киселина није инхибирала почетно везивање *S. aureus*, али је убила причвршћене ћелије, што је резултирало инхибицијом формирања биофилма. Иако *P. aeruginosa* формира биофилм у присуству уснинске киселине, морфологија биофилма је измењена, што указује на то да уснинска киселина вероватно омета сигналне путеве у биофилму. Добијени резултати нашег испитивања указали су на инхибиторни ефекат уснинске киселине у формирању биофилма *S. aureus* (BIC₅₀ 1750 mg/mL), док је инхибиција формирања биофилма *P. aeruginosa* у присуству уснинске киселине изостала.

На основу добијених резултата, може се приметити да иако је п-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* показао најбољу антимикуробну активност, да је

ацетонски екстракт ипак показао најјачу антибиофилм активност. У случају антибиофилм активности, чак је и метанолни екстракт показао бољи ефекат у односу на п-хексански екстракт и уснинску киселину, који су показали веома слабу антибиофилм активност. То би могло значити да главни носиоци антибиофилм активности испитиваних екстраката нису депсидни метаболити лишјајева (леканорна киселина, обтусинска киселина и атранорин) и уснинска киселина, већ друга присутна једињења. Осим тога, треба напоменути да је антибиофилм активност тестираних екстраката примећена само код Грам-позитивног соја *S. aureus*, али да екстракти нису показали антибиофилм активност код Грам-негативног соја *P. aeruginosa*. У прилог добијеним резултатима иде чињеница да ацетонски екстракт садржи највећу количину фенолних и флавоноидних једињења у поређењу са метанолним и п-хексанским екстрактом испитиваног лишјаја.

Тачни механизми антибиофилм активности екстраката лишјајева нису разјашњени, али се сматра да су секундарни метаболити лишјајева одговорни и за антимикуробну и за антибиофилм активност (128, 129). Антибиофилм активност уснинске киселине и атранорина, као чистих супстанци, испитивана је и студији коју су спровели *Pompilio* и сарадници (129). Добијени резултати показали су да атранорин има бољу антибиофилм активност у односу на уснинску киселину, док су у својој претходној студији показали да атранорин ефикасно спречава пријањање бактерија за подлогу, а самим тим и формирање биофилма. Ефекат је посебно изражен на бактеријски сој *S. aureus*, а посебно онај који је резистентан на примену метицилина (метицилин-резистентни *S. Aureus* – MRSA) (130). Недавно истраживање показало је да се продужетак антибиофилм ефекта уснинске киселине може постићи применом графена импрегнираног уснинском киселином, што омогућава њено контролисано ослобађање (51). Наши резултати указују да и поред тога што испољава најснажнији антимикуробни ефекат, п-хексански екстракт лишјаја *Xanthoparmelia stenophylla* нема изражену антибиофилм активност, односно постиже слабији антибиофилм ефекат у поређењу са ацетонским и метанолним екстрактом лишјаја *Xanthoparmelia stenophylla*. У литератури нису пронађени подаци о појединачном испитивању антибиофилм активности леканорне киселине и обтусичне киселине.

Са друге стране, Митровић и сарадници (128) показали су антибиофилм активност екстраката лишјајева *Platismatia glaucia* и *Pseudevernia furfuracea* из породице Parmeliaceae. Екстракти су показали снажну антибиофилм активност према Грам-позитивном соју (*S. aureus*) за разлику од Грам-негативног соја (*P. mirabilis*), што је у складу са нашим резултатима. Резултати Millot и сарадника (131) указују на то да ацетонски екстракти лишјајева *Ramalina fastigiata* и *Evernia prunastri* инхибирају формирање биофилма гљиве *C. albicans*. Антибиофилм активност екстраката лишјаја *Xanthoparmelia stenophylla* није испитивана на гљивама, а то би свакако требао да буде циљ будућих испитивања.

Најчешће проучаван механизам адаптације бактерија на услове спољашње средине, а самим тим и механизам одговоран за формирање биофилма је *quorum-sensing* (QS). Овим механизмом регулисана је комуникација између ћелија, а између Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија постоји разлика у генетичкој регулацији QS механизма. Осим тога, важну улогу у одржавању структуре биофилма има екстрацелуларна полимерна супстанца (ЕПС) која додатно пружа заштиту бактеријама од штетног деловања антибиотика и антимикуробних једињења (132, 133).

Претходна истраживања показала су да нека фенолна, а нарочито флавоноидна једињења инхибирају формирање биофилма *S. aureus* користећи исту методологију испитивања (132, 133), док су *Matilla-Cuenca* и сарадници (134) испитивали механизме деловања флавоноида на инхибицију биофилма *S. aureus*. Као главни механизам деловања,

препознато је анти-амилоидно деловање полифенола у које се флавоноиди могу класификовати. Показано је да флавоноиди инхибирају биофилм повезани протеин (енгл. *Biofilm associated protein* - Вар) који је повезан са формирањем биофилма, и на тај начин спречавају колонизацију.

Потенцијално објашњење за разлику у деловању различитих флавоноидних једињења на формирање биофилма Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија је разноврсност флавоноидних структура; флавоноли, флавоноли и антоцијанини испољавају јачи ефекат према Грам-позитивним бактеријама, док флаванони и флаваноли јаче делују на Грам-негативне бактерије. Потребно је спровести додатна истраживања како би се идентификовали сви потенцијални механизми деловања и структуре.

Према Chaves Simões и сарадницима (77), метода са ресазурином је најосетљивији метод, способан да детектује мали број активних, вијабилних ћелија. Метода са ресазурином претходно је примењена како би се оредила активност ћелија у биофилму по методи Sarker и сарадници (135), док су Pettit и сарадници (136) показали да је метода поуздана и поновљива. Главна предност методе са ресазурином је у томе што се користи биолошка, нетоксична боја за ћелије.

5.1.4. Антитуморска активност екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине

Велики број антитуморских лекова који се примењују у клиничкој пракси пореклом су из природних извора. Постоје подаци да је готово две трећине лекова који су данас у употреби настало изоловањем из различитих биолошких извора или функционизацијом молекула добијених на тај начин. У том погледу лишајеви представљају недовољно истражен и искоришћен ресурс нових, потенцијално биолошки активних једињења (137).

У оквиру нашег истраживања испитана је цитотоксична активност ацетонског, метанолног и n-хексанског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*, као и најзаступљенијег секундарног метаболита уснинске киселине. Цитотоксична активност испитивана је на ћелијама хуманог карцинома колона (ћелијска линија HCT 116), ћелијама хуманог карцинома грлића материце (ћелијска линија HeLa) и ћелијама хуманог карцинома дојке (ћелијска линија MDA-MB 231). Према нашим сазнањима ово је прво испитивања цитотоксичне активности екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* на наведеним ћелијским линијама. Резултати су показали да ацетонски екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* испољава снажно антипролиферативно дејство зависно од примењене концентрације, посебно према ћелијским линијама хуманих карцинома колона и грлића материце, али без уоченог цитоцидног ефекта. Овакав ефекат може бити последица оптималног односа састојака у ацетонском екстракту, као и њиховог синергистичког дејства. Хроматографска анализа показала је да су најзаступљеније компоненте ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* уснинска и леканорна киселина. Roser и сарадници показали су да леканорна киселина смањује пролиферативни потенцијал и вијабилност ћелија хуманог карцинома колона и хуманог карцинома грлића материце (ћелијске линије HCT 116 и HeLa) (138). Уснинска киселина је једно од ретких једињења пореклом из лишајева које је комерцијално доступно па је због тога врло често истраживано у погледу цитотоксичног дејства (139). У оквиру нашег истраживања уснинска киселина испољила је снажан ефекат на пролиферативни капацитет ћелија хуманог карцинома колона, умерени ефекат на пролиферативни капацитет ћелија хуманог карцинома грлића материце, као и занемарљив ефекат на пролиферативни капацитет ћелија хуманог карцинома дојке. Аутори из Пољске показали су да неки полусинтетски и синтетски деривати уснинске

киселине могу да испоље значајну цитотоксичну активност према MCF-7 и HeLa ћелијама (140).

У претходним истраживањима показано је да метанолни екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* испољава снажно цитотоксично дејство према ћелијама недиференцираног карцинома колоне (ћелијска линија RKO) и ћелијама хепатоцелуларног карцинома (ћелијска линија HepG2) (141). Међутим, у оквиру нашег истраживања показало се да метанолни екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* не испољава цитотоксични ефекат према било којој од испитиваних ћелијских линија у било којој испитиваној концентрацији. Могуће објашњење је то да ефекат није испитан на истим ћелијским линијама, односно да су ћелијске линије коришћене у нашем истраживању резистентне на дејство супстанци које су идентификоване у метанолном екстракту лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*.

N-хексански екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* испољава снажније цитотоксично дејство у поређењу са метанолним екстрактом, али истовремено и слабије дејство у поређењу са ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*. Метанолни екстракт и n-хексански екстракт разликују се по садржају атранорина који је присутан само у n-хексанском екстракту, као и по укупном садржају уснинске киселине. *Studzinska-Sroka* и сарадници показали су да транорин испољава умерено цитотоксично дејство према ћелијама које су коришћене и у нашем истраживању. Иако је показано да је цитотоксични ефекат ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* мањи у поређењу са референтном супстанцом (доксорубицином), испоставило се да екстракти лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* показују селективније дејство, а посебно у случају хуманог карцинома грлића материце и колоне.

Последњих година постигнут је значајан напредак у развоју нових лекова намењених лечењу различитих типова карцинома, највећу препреку за клиничку примену представља њихова токсичност и широк распон нежељених дејстава. Опште је прихваћено мишљење да супстанце из природних извора испољавају мање нежељених дејстава и мањи степен опште токсичности према немалигним ћелијама, што је и потврђено у неколико клиничких студија (142, 143).

Различити су механизми којима се може објаснити антитуморско дејство екстраката лишајева и секундарних метаболита лишајева.

Најчешће разматрани антитуморски механизам у случају лишајева јесте антиоксидационо дејство удружено са постојањем једињења са великим бројем фенолних група (144). Ова једињења спречавају карциногенезу или мутагенезу изазвану оксидацијом макромолекула присутних у ћелијама. Овај ефекат може бити праћен тако што ће се одређивати параметри оксидационог стреса какви су супероксид-дисмутаза или индекс липидне пероксидације (145). У нашем истраживању примећена је нисходна регулација експресије гена и за SOD-1 и за SOD-2 у случају примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине што делимично објашњава и испољени цитотоксични ефекат.

Примећено је да је цитотоксични потенцијал екстраката лишајева и изолованих секундарних метаболита израженији код малигно измењених ћелија него код здравих ћелија што говори у прилог њиховој селективности.

Као могући механизам цитотоксичног дејства издваја се и регулација ћелијског циклуса путем модификовања функције циклина D1 или циклин-зависних киназа (CDK4, CDK6)

5.2. Кардиопротективни ефекти ацетонског екстракта лишаја

Xanthoparmelia stenophylla и уснинске киселине

Доксорубицин је један од најчешће коришћених хемиотерапеутских агенаса, који се користи у третману различитих врста малигнух обољења (146). Иако има веома изражену антитуморску активности која је доказана кроз дугогодишњу интензивну примену у клиничким условима, постало је јасно да искоришћавање пуног потенцијала овог лека ометају његова нежељена дејства са посебним акцентом на кардиотоксични ефекат. Механизам настанка кардиотоксичности индуковане доксорубицином и даље није сасвим разјашњен, али је познато да су у еволуцију овог догађаја укључени различити фактори као што су оксидациони стрес, дисфункција митохондрија, апоптоза, инхибиција функције нуклеинских киселина и инфламација (147). Кардиотоксичност индукована доксорубицином карактерише се дисфункцијом леве коморе, која постепено прогредира до срчане инсуфицијенције. Уочено је да је појава кардиотоксичности након примене доксорубицина дозно-зависна, као и то да се може јавити непосредно након једне примењене дозе, али чак и након неколико месеци након вишеструке примене (148). Такође, сматра се да је доксорубицином индукована кардиотоксичност иреверзибилна појава што додатно даје на значају превентивној терапији, раној детекцији и спречавању прогресије до конгестивне срчане инсуфицијенције (149). Из тог разлога актуелна су бројна истраживања различитих природних производа као потенцијалних кардиопротективних агенаса током примене доксорубицина у терапији малигнитета.

5.2.1. Испитивање ефеката доксорубицина на кардиоваскуларни систем пацова и изазивање кардиотоксичности

Модел доксорубицином изазване кардиотоксичности се често користи у преклиничким истраживањима, како би се испитивао ефекат супстанци које би потенцијално могле да остваре кардиопротективно дејство код пацијената на цитостатској терапији. Иако се увек користи иста активна супстанца (доксорубицин), у доступној литератури наводе се различите дозе које се примењују код пацова у циљу изазивања кардиотоксичности. Доксорубицин се може примењивати једном (кумулативно) или више пута у краћем временском периоду што се сматра краткотрајном применом или у више поновљених доза у периоду који може да траје и до шест недеља, што се сматра дуготрајном применом. Модели који користе краткотрајну примену погодни су за испитивање акутног облика доксорубицином изазване кардиотоксичности, док се модели са дуготрајном применом користе за испитивање хроничних облика доксорубицином изазване кардиотоксичности (150, 151). У нашем испитивању одлучили смо се за примену кумулативне дозе доксорубицина од 15 mg/kg телесне масе животиње, која се показала као ефикасна у изазивању кардиотоксичности (80). Као вежикулум за примену ацетонског екстракта лишаја КС и уснинске киселине коришћен је 1% раствор натријум-карбоксиметилцелулозе (Na-CMC) који се у претходним истраживањима показао као ефикасан у суспендовању материјала који се примењује и као индиферентан у погледу утицаја на испитиване физиолошке параметре (152).

У нашем истраживању извршено је испитивање утицаја доксорубицина на функционалне, биохемијске и патохистолошке параметре, а све у циљу потврђивања да је примењена доза довела до појаве кардиотоксичности односно кардиомиопатије.

Резултати нашег истраживања показали су да доксорубицин испољава депресорно дејство на миокард што се огледа у значајно смањеним вредностима систолног и дијастолног крвног притиска како је приказано у поглављу 4.2.1.. Није уочена значајна разлика у вредностима систолног и дијастолног крвног притиска између CTRL и СМС групе, као и између DOX и СМС + DOX групе. Сличан ефекат уочава се и у резултатима ехокардиографског испитивања где се уочава значајно смањење ејекционе фракције у групама које су биле третиране доксорубицином.

Функционалне способности миокарда испитане су применом *ex vivo* ретроградне перфузије срца животиња на Langendorff апарату, применом протокола ауторегулације који подразумева варирање константног перфузионог притиска у опсегу од 40-120 cmH₂O чиме се испитује способност миокарда да прилагоди сопствени рад у односу на задате услове. Најизраженији ефекат забележен је на контрактилност миокарда што се одражава значајном разликом у добијеним вредностима dp/dt max и dp/dt min током протокола промене притиска 1 (PPP1) и протокола промене притиска 2 (PPP2). Због индуковане кардиомиопатије доксорубицин значајно редукује снагу срчане контракције, а са друге стране смањена је и способност релаксације миокарда. Такође, забележена је и значајна разлика у коронарном протоку између PPP1 и PPP2 што указује на нарушену коронарну циркулацију. Наведена запажања у сагласности су са претходно публикованим истраживањима (80, 153-155). На идентичан закључак упућују и резултати испитивања биохемијских параметара срчане функције и параметара запаљења. Увећане вредности CRP указују на постојање инфламаторног процеса у организму животиња, што је у складу са повећаним вредностима LDH и СК-МВ. Увећане вредности СТn-I указују на смрт кардиомиоцита што је очекивани налаз код доксорубицином изазване кардиотоксичности (156-158).

Вредности проинфламаторних цитокина (IL-1 α и IL-8) су повишене у серуму животиња третираних доксорубицином, без значајне разлике између групе третиране само доксорубицином и оне третиране векикулумом пре примене доксорубицина. Ефекат на антиинфламаторне цитокине (IL-4, IL-10 и TGF β) је такође уочљив и то у погледу смањења концентрације ових цитокина у серуму животиња које су третиране доксорубицином. Утицај на проинфламаторне и антиинфламаторне цитокине удружен са повећаном концентрацијом свих испитиваних биохемијских параметара указују да је у организму животиња третираних доксорубицином присутан интензиван инфламаторни процес за који се сматра да има улогу у настанку доксорубицином изазване кардиотоксичности (159-161), а при томе је смањена могућност супресије насталог инфламаторног одговора услед редукције нивоа антиинфламаторних цитокина.

Хистолошка анализа, која представља златни стандард за потврду постојања доксорубицином изазване кардиотоксичности, показала је да постоје јасни знаци кардиотоксичности као што су хипертрофија мишићних влакана, ћелијски инфилтрат, таласаста влакна, издужена једра и едем интерстицијума и у СМС + DOX групи и DOX групи, док је у CTRL и СМС групи забележан уредан налаз (Поглавље 4.2.4.). Наведене хистолошке промене које се уочавају на препаратима бојеним хематоксилин/еозин техником су уобичајне и често описиване у доступној литератури (162, 163). Налази су додатно потврђени и на препаратима бојеним Picrosirius Red техником где се уочава више него двоструко увећање садржаја колагена у СМС + DOX групи и DOX групи у поређењу са CTRL групом. Увећање садржаја колагена указује на интензиван процес фиброзе кардиомиоцита у групама третираним доксорубицином (164, 165) што се последично одражава и на контрактилне способности миокарда. Између CTRL групе и СМС групе није било значајне разлике у хистолошким налазима приликом коришћења обе технике.

Испитивање релативне експресије гена удружених са оксидационим стресом (SOD-1, SOD-2 и eNOS), апоптозом (Bax, Bcl-2, Cas-3 и Cas-9) и инфламацијом (IL-6, IL-10, IL-13, NF-κB, и TNFα) потврђују претходно наведене налазе и указује на важност сва три наведена процеса у патогенези доксорубицином изазване кардиотоксичности. Релативна експресија гена за оксидациони стрес увећана је 3-4 пута у DOX и СМС + DOX групи у поређењу са CTRL и СМС групом што додатно указује на интензитет овог процеса у организму. Иако је смањена активност ензима SOD код животиња третираних доксорубицином уобичајан налаз (166, 167), повећана експресија гена SOD-1 и SOD-2 на први поглед делује супротстављено, али је могуће објашњење то да долази до увећаног трошења овог ензима у циљу неутрализације штетних ефеката доксорубицина. Повећана експресија гена за eNOS у сагласности је са повећаном системском концентрацијом нитрита у DOX групи. Релативна експресија гена удружених са апоптозом јасно указује на нарушен однос између проапоптотских и антиапоптотских фактора, при чему је експресија проапоптотских гена увећана 1,5-5 пута док је експресија антиапоптотског Bcl-2 гена смањена за 50%. Овакви резултати указују на важност апоптотских механизма у настанку доксорубицином изазване кардиотоксичности што је у складу и са литературним подацима (89).

Резултати испитивања нивоа проинфламаторних и антиинфламаторних цитокина у серуму животиња и релативна експресија гена удружених са инфламацијом указују на исте појаве. Одређивани проинфламаторни цитокини у серуму (IL-1α и IL-8) значајно су повишени у DOX групи и СМС + DOX групи у поређењу са контролном групом, док су такође и релативна експресија гена са крајњим проинфламаторним ефектом (IL-6, IL-13, NF-κB, и TNFα) повећана и то 2-6 пута. Са друге стране јасно се уочава неравнотежа проинфламаторних параметара са антиинфламаторним односно смањење релативне експресије гена за IL-10, као и концентрације истог цитокина у серуму животиња. Исти тренд показују и друга два испитивана антиинфламаторна цитокина (IL-4 и TGFβ). Ови подаци говоре у прилог томе да је у организму животиња третираним доксорубицином активан интензиван инфламаторни процес који заједнички са повећаним оксидационим стресом и интензивираним процесом апоптозе индукују промене не само у миокарду него и у организму у целини. Са друге стране јасно се уочава неравнотежа проинфламаторних параметара са антиинфламаторним односно смањење релативне експресије гена за IL-10, као и концентрације истог цитокина у серуму животиња. Исти тренд показују и друга два испитивана антиинфламаторна цитокина (IL-4 и TGFβ). Не постоје супротстављена мишљења у литератури и може се рећи да је инфламација важан фактор у настанку доксорубицином изазване кардиотоксичности (161, 168, 169). Још увек се не може са сигурношћу тврдити који су сигнални путеви укључени у настанак инфламаторног процеса, али та чињеница даје простор за додатна истраживања у овој области.

Све наведено указује да доксорубицин примењен у кумулативној дози од 15 mg/kg телесне масе животиње изазива кардиотоксичност односно форму дилатационе кардиомиопатије која је индукована удруженим дејством повећаног оксидационог стреса, интензивираниог процеса апоптозе и инфламације, као и да вежикулум, 1% раствор натријум-карбоксиметилцелулозе, није значајно утицао на испитиване параметре након примене доксорубицина, односно да самостално не испољава кардиопротективни ефекат.

5.2.2. Испитивање ефекта примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине на кардиоваскуларни систем пацова

У циљу процене безбедности примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине, наведени агенси су апликовани здравим животињама код којих није изазвана кардиотоксичност. Вредности крвног притиска, као и ехокардиографски параметри нису показивали никаква одступања након примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине у поређењу са контролном групом. Кардиодинамски параметри функције срца су остали релативно константни након излагања срца различитим притисцима што указује на очуван рад миокарда. Одсуство значајних скокова и падова приликом повећања и следственог смањења притиска указује на то да ни испитивани ацетонски екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* ни уснинска киселина не делују кардиотоксично нити компромитују срчани рад здравих животиња. Претходна студија која је пратила ефекте уснинске киселине на изолованој левој преткомори срца заморчића и пацова покала је да уснинска киселина у комплексу са хидроксипропил бета-циклодекстрином може изменити контрактилност миокарда кроз смањење уласка Ca^{2+} јона у ћелије миокарда (170). Међутим, наведени резултати не могу се директно поредити са нашим будући да је реч о студији другог дизајна и методолошког приступа који не дају свеобухватну процену утицаја неког третмана на функцију срца. Ови резултати *in vitro* теста пружају само изоловану информацију која није довољна за процену безбедности уснинске киселине, већ захтева додатне експерименте и анализу параметара за процену функције срца.

Промене у вредностима параметара системског оксидационог стреса, али и параметара система антиоксидационе заштите су дискретне, али ипак уочљиве што указује на то да примењени третмани доводе до одређеног физиолошког одговора односно да су примењене супстанце препознате од стране организма животиње. Такође, показало се да се антиоксидациони ефекат ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* који је доказан у *in vitro* условима у поглављу 4.1.6. испољава и у *in vivo* условима. Интересантно је то да је ниво наведених параметара има сличан тренд вредности које су измерене системски и у хомогенату ткива миокарда. Поред тога треба уочити да вредности нивоа водоник пероксида прате вредности каталазе у смислу да су ниже када су вредности каталазе, ензима који разлаже водоник пероксид, више. У литератури нису пронађени подаци о ефектима екстракта лишајева или секундарних метаболита лишајева на оксидациони статус у *in vivo* условима.

Треба уочити да се поред виших вредности CRP у серуму животиња третираних доксорубицином може уочити и увећање нивоа LDH, који поред кардиотоксичности може да укаже и на поремећај у функцији јетре. Ово је од значаја због тога што су неке претходне студије указале на могући хепатотоксични ефекат уснинске киселине (171-173). Сличан ефекат није забележен у групи третираној ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* највероватније због смањеног укупног удела уснинске киселине у самом екстракту, али и због потенцијалног хепатопротективног ефеката осталих активних састојака екстракта.

Имунохемијско испитивање нивоа појединих проинфламаторних и антиинфламаторних цитокина карактеристичних за Th1 и Th2 имунски одговор показало је да примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине не доводе до промене у нивоу испитиваних цитокина. Нема података о ефекту самосталне примене екстракта лишајева, уснинске киселине или других секундарних метаболита лишајева на ниво проинфламаторних или антиинфламаторних цитокина, али постоје подаци о примени уснинске киселине као предтретмана ендотоксину у циљу стимулације имунског одговора (174-176).

5.2.3. Испитивање потенцијалног кардиопротективног ефекта ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселина на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности

Иако су у претходним деловима већ описани потенцијални механизми којима доксорубицин изазива кардиотоксичност и доводи до дилатационе кардиомиопатије издваја се мишљење да доксорубицин у крајњем доводи до дисфункције митохондрија кардиомиоцита, нарушавања енергетског баланса, смрти митохондрија и смрти кардиомиоцита. Међутим, молекулски механизми и сигнални путеви укључени у овај процес и даље нису сасвим разјашњени.

Будући да се оксидативни стрес истиче као један од главних фактора који доприносе кардиотоксичности код примене доксорубицина, претпоставили смо да би примена антиоксиданаса као што су екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине могле остварити значајне кардиопротективне ефекте. Наши резултати јасно указују на потенцијал екстракта лишаја да очува одговор срца након излагања различитим вредностима притиска. Наиме, у групи животиња на третману наведеним екстрактом нису уочене значајне разлике у вредностима $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ током промене притисака што потврђује потенцијал овог агенса да очува контрактилни одговор миокарда. Одржавање сличних вредности $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ након излагања срца различитим притисцима показатељ су ненарушене контрактилне снаге и лузитропних карактеристика миокарда што је од велике важности у очувању кардиоваскуларног здравља. Вредности $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ су остале у физиолошком опсегу у групи пацова који су претходно ретирани екстрактом лишаја и уснинском киселином што омогућава срцу да се контрахује и релаксира адекватно.

Наши резултати о кардиопротективним ефектима екстракта се не могу директно упоредити са резултатима доступних студија јер до сада није спроведено истраживање које је расветлило улогу екстракта *Xanthoparmelia stenophylla* на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности. Међутим, документовани су ефекти уснинске киселине у ублажавању оштећења срца у другим патологијама као што је исхемијско-реперфузиона потврда. Примена уснинске киселине у истој дози као у нашој студији успела је да спречи контрактилну дисфункцију услед излагања срца исхемији и накнадној реперфузији (177). Као и у нашем истраживању, примена екстракта лишаја као и уснинске киселине ограничила је штетне ефекте доксорубицина који могли напредовати до фаталних аритмија. Претпоставља се да екстракт лишаја као и уснинска киселина деловање остварују путем утицаја на L тип калцијумских канала који утиче на одржавање хомеостазе Ca^{2+} јона, електричну активност и контрактилну снагу миокарда (178). Уснинска киселина као најзначајнија компонента екстракта *Xanthoparmelia stenophylla* има капацитет да повећа слободни калцијум у цитосолу што активира контрактилни одговор и покреће срчану систолу. Познато је да је интрацелуларна концентрација калцијума директно пропорционална сили контракције. Док доксорубицин нарушава регулацију јона калијума што омета рад миокарда (10). Стога, може се претпоставити да је очување контрактилне снаге срца у нашој студији последица је очуване електричне екситабилности и интрацелуларне Ca^{2+} хомеостазе под утицајем уснинске киселине.

У сагласности са претходно описаним налазима, вредности SLVP и DLVP нису биле значајно промењене у условима излагања срца променама притисака што је јасан индикатор очуваног систолног и дијастолног капацитета миокарда. Бројни извештаји сведоче у прилог компромитоване функције срца услед примене доксорубицина што се манифестује као дијастолна дисфункција. Анализа вредности SLVP и DLVP заједно са вредностима $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ недоследно потврђује одсуство нарушене систолне

и дијастолне функције срца. Утицај уснинске киселине на хомеостазу калцијума доприноси правилној контракцији срчаног мишића и раду кардиомиоцита. Важно је нагласити да екстракт лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинска киселина имају потенцијал да превенирају компромитовану систолну и дијастолну функцију срца (179). Поред претходно описаних параметара срчане функције, у фокусу наше студије био је и потенцијал екстракта *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине да очува фреквенцу срца пацова. Наиме, наши резултати указују на то да је промена срчане фреквенце код пацова на третману и екстрактом и уснинском киселином знатно блажа у поређењу са нетретираним пацовима након постепеног повећања и следственог смањења притиска. Погоршање срчане фреквенце након употребе доксорубицина такође је истакнуто као једна од значајних последица коришћења овог антитуморског агенса која је подстакла истраживаче да пронађу природни препарат који би заштитио срце. Примена доксорубицина доводи до дисфункције симпатичког нервног система при чему мултифакторски утицај овог лека зависи од примењене дозе, дужине трајања терапије и индивидуалног одговора пацијента. С друге стране, одуство изражених флукуација у вредностима срчане фреквенце третираних животиња јасно потврђује допринос екстракта *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине у кардиопротекцији.

Литературни подаци сугеришу повећану активност симпатичког нервног система након примене доксорубицина код животиња, што може допринети кардиотоксичности повезаној са применом овог лека (180). Претходно спроведена студија такође потврђује протективне ефекте уснинске киселине у погледу смањења степена функционалног оштећења миокарда и превенције артмија код срца пацова која су подвргнута исхемијско-реперфузионој повреди (177). Непромењене вредности срчане фреквенце указују на оптималне услове у погледу потреба миокарда и његовог снабдевања кисеоником.

У циљу комплетног сагледавања кардиопротективних ефеката екстракта *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине, процењиван је и утицај наведених агенаса на коронарни проток пацова. Значај праћења коронарног протока огледа се у чињеници да је адекватан проток неопходан како би се задовољиле метаболичке потребе миокарда. С друге стране, уколико дође до пада коронарног протока јављају се промене у електричној активности спроводног система срца (181). У групи пацова који су били третирани екстрактом лишаја и уснинском киселином вредности коронарног протока биле су у физиолошким границама након излагања срца различитим притисцима. Овај резултат директно указује на потенцијал и екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине да очувају снабдевање миокарда кисеоником и омогуће његов несметани рад. Према нашим сазнањима, ово истраживање је прво које је пратило утицај екстракта *Xanthoparmelia stenophylla* на коронарну циркулацију пацова, док су информације о утицају уснинске киселине оскудне.

Коронарни ендотел има значајну улогу у адекватној перфузији миокарда због утицаја на продукцију потентног ендогеног вазодилататора NO. Код нетретираних пацова којима је апликован доксорубицин и изазвана кардиотоксичност уочене су значајне промене у вредности коронарног протока при скоро свим вредностима притисака што је индикатор измењене функције ендотела. Очување вредности коронарног протока након третмана екстрактаом *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине јасно потврђује потенцијал ових природних компонената да заштите коронарну васкуларну мрежу. Превенцијом оштећења коронарног ендотела постиже се адекватна перфузија срца и остварује значајан кардиопротективни ефекат.

Јасно се може уочити да оба примењена третмана имају изражено антиоксидационо дејство које се огледа у паду нивоа прооксидационих параметара и повећању нивоа антиоксидационих параметара и то у сва три узорка (коронарни венски ефлуент,

хомогенат ткива миокарда и крв експерименталних животиња). Такође, и све три врсте узорка уочава се сличан тренд промене вредности испитиваних параметара што говори у прилог томе да се ефекат остварује на свим нивоима почев од молекуларног па све до одговора организма у целини. Важно је уочити и да параметри система антиоксидационе заштите прате вредности прооксидационих параметара.

Претходна истраживања показала су да су CRP, LDH, СК-МВ и сТnI веома поуздани биомаркери оштећења миокарда, који су погодни како за дијагностиковање кардиотоксичности тако и за праћење опоравка или ефеката различитих примењених третмана (182). У нашем истраживању показано је да оба третмана значајно редукују ниво свих одређиваних срчаних ензима. Литературни подаци о утицају екстракта лишајева или њихових секундарних метаболита су веома ограничени. У студији групе аутора из Турске коришћен је етилацетатни екстракт лишаја *Usnea longissima*, али је модел подразумевао индукцију есофагогастричних карцинома применом N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидина (183). У овој студији показано је да не долази до смањења нивоа СК-МВ и сТnI у испитиваним узорцима, за разлику од нашег истраживања.

У претходним истраживањима у којима је утицај доксорубицина на миокард био испитиван патохистолошким техникама показано је да се садржај колагена, као и ензима који га разлажу (колагеназа и различити типови матрикс-металопротеиназа) могу сматрати поузданим маркером фиброзе миокарда и оштећења индукованог применом доксорубицина (184). Оба испитивана третмана довела су до значајног смањења садржаја колагена испитиваног *Picrosirius red* техником, као и смањењем учесталости појаве свих карактеристичних знакова доксорубицином изазване кардиотоксичности када су узорци испитивани хематоксилин-еозин техником.

VI ЗАКЉУЧЦИ

1. Применом различитих растварача за екстракцију лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* добијају се екстракти различитог квантитативног и квалитативног састава
2. Идентификовано је четири секундарна метаболита лишајева и то: леканорна киселина, обтусична киселина, уснинска киселина и атранорин.
3. Присуство леканорне киселине, обтусичне киселине и уснинске киселине утврђено је у свим испитиваним екстрактима, док је атранорин идентификован само у n-хексанском екстракту.
4. Највећи укупни принос екстракције измерен је у случају ацетонског екстракта.
5. Највећи садржај леканорне киселине измерен је у ацетонском екстракту, највећи садржај обтусичне киселине у метанолном екстракту, а највећи садржај уснинске киселине у n-хексанском екстракту.
6. Највећи садржај укупних фенолних једињења и укупних флавоноидних једињења измерен је у ацетонском екстракту, након кога следе метанолни и n-хексански екстракт.
7. Најизраженију антиоксидациону активност *in vitro* условима, применом било које од метода, испољио је ацетонски екстракт, а затим метанолни и n-хексански екстракт.
8. Најизраженију антибактеријску и антибиофилм активност испољио је n-хексански екстракт и то посебно према Грам-позитивним бактеријским сојевима.
9. Најизраженију антигљивичну активност испољио је n-хексански екстракт, а посебно према стандардном соју гљивеце *S. cerevisiae*.
10. Најизраженију антитуморску активност испољио је ацетонски екстракт и то према свим испитиваним ћелијским линијама.
11. Доксорубицин примењен у кумулативној дози од 15 mg/kg телесне тежине животиње изазива кардиотоксичност код експерименталних животиња.
12. Раствор натријум-карбоксиметилцелулозе у концентрацији од 1% нема утицаја на било који од испитиваних параметара срчане функције, биохемијске параметре оштећења миокарда, оксидациони статус у коронарном венском ефлуенту, крви и хомогенату ткива миокарда, патохистолошке карактеристике миокарда, параметре инфламације и релативну експресију испитиваних гена, а такође не испољава ни протективно дејство на наведене карактеристике, па се због тога може сматрати одговарајућим вехикулумом за истраживање
13. Самостална примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg не утиче значајно на ниво одређиваних параметара срчане функције, биомаркере оштећења миокарда, оксидациони статус одређиван у коронарном венском ефлуенту, крви и хомогенату ткива миокарда, патохистолошке карактеристике миокарда, параметре инфламације и релативну експресију испитиваних гена.
14. Самостална примена уснинске киселине у дози од 25 mg/kg не утиче значајно на ниво одређиваних параметара срчане функције, биомаркере оштећења миокарда, оксидациони статус одређиван у коронарном венском ефлуенту, крви и хомогенату ткива миокарда, патохистолошке карактеристике миокарда, параметре инфламације и релативну експресију испитиваних гена.
15. Самостална примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* у дози од 125 mg/kg или уснинске киселине у дози од 25 mg/kg не доводи до испољавања било каквих значајних штетних или токсичних ефеката, односно може се тврдити да су ова два третмана у примењеним дозама безбедна за примену код експерименталних животиња у циљу утврђивања постојања кардиопротективног ефекта.

16. Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до очувања хемодинамских параметара какви су систолни и дијастолни крвни притисак, срчана фреквенција и фракционо скраћење у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином.
17. Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине умањује депресорно дејство доксорубицина на кардиодинамске параметре при чему је дејство ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* израженије у поређењу са уснинском киселином.
18. Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине редукују ниво прооксидационих параметара, а посебно ниво супероксид-анјон радикала у коронарном венском ефлуенту у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином.
19. Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до смањења нивоа свих испитиваних системских прооксидационих параметара у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином изузев нитрита у случају третмана уснинском киселином.
20. Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до повећања нивоа свих испитиваних системских антиоксидационих параметара у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином при чему је тај ефекат израженији у групи која је третирана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*.
21. У хомогенату ткива миокарда значајно је смањен ниво супероксид-анјон радикала и водоник пероксида у случају третмана ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* пре примене доксорубицина у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином, односно ниво водоник пероксида у случају третмана уснинском киселином пре примене доксорубицина у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином.
22. Ниво свих параметара система антиоксидационе заштите у хомогенату ткива миокарда значајно је повишен у групама третираним ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинском киселином пре пре примене доксорубицина у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином, односно ниво водоник пероксида у случају третмана уснинском киселином пре примене доксорубицина у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином са изузетком каталазе у случају третмана уснинском киселином.
23. Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до значајног смањења нивоа свих срчаних ензима у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином при чему је ефекат ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* израженији.
24. Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до значајног смањења нивоа проинфламаторних цитокина у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином.
25. Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до значајног повећања нивоа антиинфламаторних цитокина у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином.

26. Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до значајног побољшања патохистолошког налаза ткива миокарда у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином.
27. Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до значајног смањења садржаја колагена у ткиву миокарда у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином.
28. Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до значајног повећања нивоа антиинфламаторних цитокина у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином.
29. Релативна експресија гена удружених са оксидационим стресом значајно је смањена у групама третираним ацетонским екстрактом лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинском киселином пре примене доксорубицина у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином при чему је ефекат у групи третираној уснинском киселином израженији.
30. Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до значајног повећања релативне експресије гена за Bcl-2 у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином односно оба третмана имају изражен антиапоптоски ефекат.
31. Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* или уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до значајног повећања релативне експресије гена за IL-10 у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином односно оба третмана имају изражен антиинфламаторни ефекат.
32. Примена ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* пре примене доксорубицина доводи до значајног смањења релативне експресије проинфламаторних гена за IL-13 и TNF α у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином.
33. Примена уснинске киселине пре примене доксорубицина доводи до значајног смањења релативне експресије свих испитиваних проинфламаторних гена у поређењу са групом која је третирана само доксорубицином.
34. Сумарни ефекат примене ацетонског екстракта лишаја *Xanthoparmelia stenophylla* и уснинске киселине указује да оба третмана испољавају кардиопротективно дејство на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.
35. Као главни потенцијални механизми кардиопротективног дејства издвојили су се смањење оксидационог стреса и утицај на процес апоптозе.
36. Неопходна су додатна истраживања како би се детаљно испитао механизам кардиопротективног дејства на моделу доксорубицином индуковане кардиотоксичности на ћелијском нивоу.

VII ЛИТЕРАТУРА

1. Di Marco A, Cassinelli G, Arcamone F. The discovery of daunorubicin. *Cancer Treat Rep.* 1981;65 Suppl 4:3-8.
2. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng.* 1969;11(6):1101-10.
3. Arcamone F, Cassinelli G. Biosynthetic anthracyclines. *Curr Med Chem.* 1998 Oct;5(5):391-419.
4. Johnson-Arbor K, Dubey R. Doxorubicin. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2023.
5. Aloss K, Hamar P. Recent Preclinical and Clinical Progress in Liposomal Doxorubicin. *Pharmaceutics.* 2023;15(3):893.
6. Rahdar A, Sargazi S, Barani M, Shahraki S, Sabir F, Aboudzadeh MA. Lignin-Stabilized Doxorubicin Microemulsions: Synthesis, Physical Characterization, and In Vitro Assessments. *Polymers (Basel).* 2021;13(4):641.
7. Zheng K, Liu H, Liu X, Jiang L, Li L, Wu X, Guo N, Ding C, Huang M. Photo-triggered release of doxorubicin from liposomes formulated by amphiphilic phthalocyanines for combination therapy to enhance antitumor efficacy. *Journal of Materials Chemistry B.* 2020;8(35):8022-36.
8. Li X, Diao W, Xue H, Wu F, Wang W, Jiang B, Bai J, Lian B, Feng W, Sun T, Yu W, Wu J, Qu M, Wang Y, Gao Z. Improved efficacy of doxorubicin delivery by a novel dual-ligand-modified liposome in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2020;489:163-173.
9. D'Angelo NA, Noronha MA, Câmara MCC, Kurnik IS, Feng C, Araujo VHS, Santos JHPM, Feitosa V, Molino JVD, Rangel-Yagui CO, Chorilli M, Ho EA, Lopes AM. Doxorubicin nanoformulations on therapy against cancer: An overview from the last 10 years. *Biomater Adv.* 2022;133:112623.
10. Rawat PS, Jaiswal A, Khurana A, Bhatti JS, Navik U. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomed Pharmacother.* 2021;139:111708.
11. Electronic Medicines Compendium [EMC]. Doxorubicin - Summary of Product Characteristics. [Internet]. Dostupno na: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/6184/smpc#gref>, Poslednji put posećeno: 07.04.2024.
12. Smith P, Lavery A, Turkington RC. An overview of acute gastrointestinal side effects of systemic anti-cancer therapy and their management. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2020;48-49:101691.
13. Lai C, Cole DE, Steinberg SM, Lucas N, Dombi E, Melani C, Roschewski M, Balis F, Widemann BC, Wilson WH. Doxorubicin pharmacokinetics and toxicity in patients with aggressive lymphoma and hepatic impairment. *Blood Adv.* 2023;7(4):529-532.
14. Ansari L, Shieh-zadeh F, Taherzadeh Z, Nikoofal-Sahlabadi S, Momtazi-Borojeni AA, Sahebkar A, Eslami S. The most prevalent side effects of pegylated liposomal doxorubicin monotherapy in women with metastatic breast cancer: a systematic review of clinical trials. *Cancer Gene Ther.* 2017;24(5):189-193.
15. Prasanna PL, Renu K, Valsala Gopalakrishnan A. New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Life Sci.* 2020;250:117599.

16. Yokomichi N, Nagasawa T, Coler-Reilly A, Suzuki H, Kubota Y, Yoshioka R, Tozawa A, Suzuki N, Yamaguchi Y. Pathogenesis of Hand-Foot Syndrome induced by PEG-modified liposomal Doxorubicin. *Hum Cell*. 2013;26(1):8-18.
17. Yadav N, Madke B, Kar S, Prasad K. Liposomal doxorubicin-induced palmoplantar erythrodyesthesia syndrome. *Indian Dermatol Online J*. 2015;6(5):366-8.
18. Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments. *Nat Rev Cardiol*. 2015;12(9):547-58.
19. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52(6):1213-25.
20. Simůnek T, Stěrba M, Popelová O, Adamcová M, Hrdina R, Gersl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep*. 2009;61(1):154-71.
21. Stěrba M, Popelová O, Vávrová A, Jirkovský E, Kovařiková P, Geršl V, Simůnek T. Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxid Redox Signal*. 2013 ;18(8):899-929.
22. Tatlıdede E, Şehirli O, Velioglu-Oğünç A, Cetinel S, Yeğen BC, Yarat A, Süleymanoğlu S, Sener G. Resveratrol treatment protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage. *Free Radic Res*. 2009;43(3):195-205.
23. Liu D, Ma Z, Xu L, Zhang X, Qiao S, Yuan J. PGC1 α activation by pterostilbene ameliorates acute doxorubicin cardiotoxicity by reducing oxidative stress via enhancing AMPK and SIRT1 cascades. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(22):10061-10073.
24. Reyes BA, Dufourt EC, Ross J, Warner MJ, Tanquilut NC, Leung AB. Selected phyto and marine bioactive compounds: Alternatives for the treatment of type 2 diabetes. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2018;55:111-43.
25. Abdel-Daim MM, Kilany OE, Khalifa HA, Ahmed AAM. Allicin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2017;80(4):745-753.
26. Urošević M, Nikolić L, Gajić I, Nikolić V, Dinić A, Miljković V. Curcumin: Biological Activities and Modern Pharmaceutical Forms. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(2):135.
27. Yu W, Qin X, Zhang Y, Qiu P, Wang L, Zha W, Ren J. Curcumin suppresses doxorubicin-induced cardiomyocyte pyroptosis via a PI3K/Akt/mTOR-dependent manner. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2020;10(4):752-769.
28. Honegger R. Functional aspects of the lichen symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 1991; 42(1): 553–578.
29. De Carolis R, Cometto A, Moya P, Barreno E, Grube M, Tretiach M, Leavitt SD, Muggia L. Photobiont diversity in lichen symbioses from extreme environments. *Frontiers in Microbiology*. 2022;13:809804.
30. Blázquez M, Hernández-Moreno LS, Gasulla F, Pérez-Vargas I, Pérez-Ortega S. The Role of Photobionts as Drivers of Diversification in an Island Radiation of Lichen-Forming Fungi. *Front Microbiol*. 2022;12:784182.
31. Perez-Ortega S, Ortiz-Álvarez R, Allan Green TG, de Los Ríos A. Lichen myco- and photobiont diversity and their relationships at the edge of life (McMurdo Dry Valleys, Antarctica). *FEMS Microbiology Ecology*. 2012;82(2):429-48.

32. Honegger R. Developmental biology of lichens. *New Phytologist*. 1993;125(4):659-77.
33. Sanders WB, Masumoto H. Lichen algae: the photosynthetic partners in lichen symbioses. *The Lichenologist*. 2021;53(5):347-93.
34. Roth R, Wagner R, Goodenough U. Lichen 3. Outer layers. *Algal Research*. 2021;56:102332.
35. Yang JH, Oh SY, Kim W, Woo JJ, Kim H, Hur JS. Effect of isolation conditions on diversity of endolichenic fungal communities from a foliose lichen, *Parmotrema tinctorum*. *Journal of Fungi*. 2021;7(5):335.
36. Arakawa S, Kanaseki T, Wagner R, Goodenough U. Ultrastructure of the foliose lichen *Myelochroa leucotyliza* and its solo fungal and algal (*Trebouxia* sp.) partners. *Algal Research*. 2022;62:102571.
37. Chekanov K, Lobakova E. Photosynthesis measurements on the upper and lower side of the thallus of the foliose lichen *Nephroma arcticum* (L.) Torss. *Photosynthesis Research*. 2021;149:289-301.
38. Armstrong R, Bradwell T. Growth of crustose lichens: a review. *Geografiska Annaler: Series A, Physical Geography*. 2010;92(1):3-17.
39. Armstrong RA. The biology of the crustose lichen *Rhizocarpon geographicum*. *Symbiosis*. 2011;55(2):53-67.
40. Joshi S, Upreti DK, Oh SO, Nguyen TT, Nguyen AD, Hur JS. New records of crustose lichens and a lichenicolous *Arthonia* from Vietnam. *Mycotaxon*. 2015;130(2):329-36.
41. Pathak A, Upreti DK, Dikshit A. Antidermatophytic activity of the fruticose lichen *Usnea orientalis*. *Medicines*. 2016;3(3):24.
42. Cho SM, Lee H, Hong SG, Lee J. Study of ecophysiological responses of the antarctic fruticose lichen *Cladonia borealis* using the PAM fluorescence system under natural and laboratory conditions. *Plants*. 2020;9(1):85.
43. Lendemer JC, Tripp EA. *Lecanora anakeestiicola* (Lecanorales): an unusual new fruticose species from Great Smoky Mountains National Park in eastern North America. *The Bryologist*. 2015;118(1):1-0.
44. Kanigowski P, Flakus A, Oset M, Kowalewska A, Rykaczewki M, Kukwa M. The lichen family Parmeliaceae in Poland. *Xanthoparmelia* species containing usnic acid. *Herzogia*. 2016;29(1):108-19.
45. Rankovic B. Lichen Secondary Metabolites—Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential. 2nd ed. Springer Nature Switzerland AG; Cham, Switzerland: 2019.
46. Galanty A, Paško P, Podolak I. Enantioselective activity of usnic acid: A comprehensive review and future perspectives. *Phytochemistry Reviews*. 2019;18:527-48.
47. Araújo AA, de Melo MG, Rabelo TK, Nunes PS, Santos SL, Serafini MR, Santos MR, Quintans-Júnior LJ, Gelain DP. Review of the biological properties and toxicity of usnic acid. *Nat Prod Res*. 2015;29(23):2167-80.
48. Luzina OA, Salakhutdinov NF. Usnic acid and its derivatives for pharmaceutical use: a patent review (2000-2017). *Expert Opin Ther Pat*. 2018;28(6):477-491.
49. Felczykowska A, Pastuszek-Skrzypczak A, Pawlik A, Bogucka K, Herman-Antosiewicz A, Guzow-Krzemińska B. Antibacterial and anticancer activities of acetone extracts from in vitro cultured lichen-forming fungi. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17(1):300.

50. Girardot M, Millot M, Hamion G, Billard JL, Juin C, Ntoutoume GMAN, Sol V, Mambu L, Imbert C. Lichen Polyphenolic Compounds for the Eradication of *Candida albicans* Biofilms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:698883.
51. Pandit S, Rahimi S, Derouiche A, Boulaoued A, Mijakovic I. Sustained release of usnic acid from graphene coatings ensures long term antibiofilm protection. *Sci Rep.* 2021;11(1):9956.
52. Chlumsky O, Smith HJ, Parker AE, Brileya K, Wilking JN, Purkrtova S, Michova H, Ulbrich P, Viktorova J, Demnerova K. Evaluation of the Antimicrobial Efficacy of N-Acetyl-L-Cysteine, Rhamnolipids, and Usnic Acid-Novel Approaches to Fight Food-Borne Pathogens. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11307.
53. Thadhani VM, Karunaratne V. Potential of Lichen Compounds as Antidiabetic Agents with Antioxidative Properties: A Review. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:2079697.
54. Huneck S, Yoshimura I. Identification of Lichen Substances. Berlin, Heidelberg: Springer; 1996.
55. Pharmacopoeia Jugoslavica (Ph. Jug.). 4th ed. Serbia: Federal Public Health Institute; 1984.
56. Aoussar N, Achmit M, Es-Sadeqy Y, Vasiljević P, Rhallabi N, Ait Mhand R, Zerouali K, Manojlović N, Mellouki F. Phytochemical constituents, antioxidant and antistaphylococcal activities of *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. and *Ramalina farinacea* (L.) Ach. from Morocco. *Arch Microbiol.* 2021;203(6):2887-94. doi: 10.1007/s00203-021-02288-5.
57. Manojlović NT, Rančić AB, Décor R, Vasiljević P, Tomović J. Determination of chemical composition and antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of lichens *Parmelia conspersa* and *Parmelia perlata*. *J Food Meas Charact.* 2020;15:686–96.
58. Kocovic A, Jeremic J, Bradic J, Sovrljic M, Tomovic J, Vasiljevic P, Andjic M, Draginic N, Grujovic M, Mladenovic K, Baskic D, Popovic S, Matic S, Zivkovic V, Jeremic N, Jakovljevic V, Manojlovic N. Phytochemical Analysis, Antioxidant, Antimicrobial, and Cytotoxic Activity of Different Extracts of *Xanthoparmelia stenophylla* Lichen from Stara Planina, Serbia. *Plants (Basel).* 2022;11(13):1624. doi: 10.3390/plants11131624.
59. Ranković B, Kosanić M, Stanojković T, Vasiljević P, Manojlović N. Biological activities of *Toninia candida* and *Usnea barbata* together with their norstictic acid and usnic acid constituents. *Int J Mol Sci.* 2012;13(11):14707-22.
60. Şengül Ü. Comparing determination methods of detection and quantification limits for aflatoxin analysis in hazelnut. *J Food Drug Anal.* 2016;24(1):56-62.
61. Wang SY, Shi XC, Liu FQ, Laborda P. Chromatographic Methods for Detection and Quantification of Carbendazim in Food. *J Agric Food Chem.* 2020;68(43):11880-94.
62. Machado S, Rezende AR, Gennari S, Conte-Junior CA, Costa M. Development of HPLC-fluorescence method for the determination of ivermectin residues in commercial milk. *J Exp Food Chem.* 2016;2(2):2472-0542.
63. Saran S, Menon S, Shailajan S, Pokharna P. Validated RP-HPLC method to estimate eugenol from commercial formulations like Caturjata Churna, Lavangadi Vati, Jatiphaladi Churna, Sitopaladi Churna and clove oil. *J Pharm Res.* 2013;6(1):53-60.
64. Mannino G, Campobenedetto C, Vigliante I, Contartese V, Gentile C, Berteà CM. The Application of a Plant Biostimulant Based on Seaweed and Yeast Extract

- Improved Tomato Fruit Development and Quality. *Biomolecules*. 2020;10(12):1662.
65. Tomović J, Kosanić M, Ranković B, Vasiljević P, Najman S, Manojlović N. Phytochemical analysis and biological activity of extracts of lichen *Physcia Semipinnata*: As a new source of pharmacologically active compounds. *Farmacia*. 2019;67(2):346-53.
66. Ristić S, Ranković B, Kosanić M, Stanojković T, Stamenković S, Vasiljević P, Manojlović I, Manojlović N. Phytochemical study and antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of *Melanelia subaurifera* and *Melanelia fuliginosa* lichens. *J Food Sci Technol*. 2016;53(6):2804-16.
67. Namvar K, Salehi EA, Mokhtarian N. Total phenolic compounds and antioxidant activity of *Stachys turcomanica*. *Biosci J*. 2018;34(5):1349-56.
68. Hudz N, Yezerska O, Grygorieva O, Brindza J, Felsöciová S, Kačániová M, Wieczorek PP. Analytical procedure elaboration of total flavonoid content determination and antimicrobial activity of bee bread extracts. *Acta Pol Pharm*. 2019;76(3):439-52.
69. Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chem*. 2012;130(4):1036-43.
70. Jug U, Naumoska K, Vovk I. (-)-Epicatechin-An Important Contributor to the Antioxidant Activity of Japanese Knotweed Rhizome Bark Extract as Determined by Antioxidant Activity-Guided Fractionation. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(1):133.
71. Hinneburg I, Dorman HD, Hiltunen R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem*. 2006;97(1):122-9.
72. Manojlovic NT, Vasiljevic PJ, Maskovic PZ, Juskovic M, Bogdanovic-Dusanovic G. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae). *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:452431.
73. Nishikimi M, Appaji N, Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun*. 1972;46(2):849-54.
74. Andrews JM. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 4). *J Antimicrob Chemother* 2005;56:60e76
75. Muruzović MŽ, Mladenović KG, Stefanović OD, Vasić SM, Čomić LR. Extracts of *Agrimonia eupatoria* L. as sources of biologically active compounds and evaluation of their antioxidant, antimicrobial, and antibiofilm activities. *J Food Drug Anal*. 2016;24(3):539-47.
76. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54(1):49-79.
77. Simões LC, Simões M, Lima N. Kinetics of biofilm formation by drinking water isolated *Penicillium expansum*. *Biofouling*. 2015;31(4):349-62.
78. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Method*. 1983;65(1-2):55-63.
79. Koch A, Tamez P, Pezzuto J, Soejarto D. Evaluation of plants used for antimalarial treatment by the Maasai of Kenya. *J Ethnopharmacol*. 2005;101(1-3):95-9.
80. Radonjic T, Rankovic M, Ravic M, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic J, Jeremic N, Sretenovic J, Matic S, Jakovljevic V, Nikolic Turnic T. The Effects of Thiamine

- Hydrochloride on Cardiac Function, Redox Status and Morphometric Alterations in Doxorubicin-Treated Rats. *Cardiovasc Toxicol.* 2020;20(2):111-120.
81. López Y López G, Tepox Galicia AY, Atonal Flores F, Flores Hernández J, Pérez Vizcaino F, Villa Mancera AE, Miguél GG, Reynoso Palomar A. Echocardiographic follow-up to right ventricular modifications in secondary pulmonary hypertension to diabetes in rats. *Clin Exp Hypertens.* 2021;43(3):242-53.
 82. Torregroza C, Feige K, Schneider L, Bunte S, Stroethoff M, Heinen A, Hollmann MW, Huhn R, Raupach A. Influence of Hyperglycemia on Dexmedetomidine-Induced Cardioprotection in the Isolated Perfused Rat Heart. *J Clin Med.* 2020;9(5):1445.
 83. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2011;50(6):940-50.
 84. Campos-Shimada LB, Hideo Gilglioni E, Fernandes Garcia R, Rizato Martins-Maciel E, Luiza Ishii-Iwamoto E, Luzia Salgueiro-Pagadigorria C. Superoxide dismutase: a review and a modified protocol for activities measurements in rat livers. *Arch Physiol Biochem.* 2020;126(4):292-9.
 85. Mu H, Liu H, Zhang J, Huang J, Zhu C, Lu Y, Shi Y, Wang Y. Ursolic acid prevents doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice through eNOS activation and inhibition of eNOS uncoupling. *J Cell Mol Med.* 2019;23(3):2174-83.
 86. He H, Wang L, Qiao Y, Zhou Q, Li H, Chen S, Yin D, Huang Q, He M. Doxorubicin Induces Endotheliotoxicity and Mitochondrial Dysfunction via ROS/eNOS/NO Pathway. *Front Pharmacol.* 2020;10:1531.
 87. Zhang Y, Liu S, Ma JL, Chen C, Huang P, Ji JH, Wu D, Ren LQ. Apocynum venetum leaf extract alleviated doxorubicin-induced cardiotoxicity through the AKT/Bcl-2 signaling pathway. *Phytomedicine.* 2022;94:153815.
 88. Zhang Q, Wu L. In Vitro and In Vivo Cardioprotective Effects of Curcumin against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Systematic Review. *J Oncol.* 2022;2022:7277562.
 89. Christidi E, Brunham LR. Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cell Death Dis.* 2021;12(4):339.
 90. Elblehi SS, El-Sayed YS, Soliman MM, Shukry M. Date Palm Pollen Extract Avert Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy Fibrosis and Associated Oxidative/Nitrosative Stress, Inflammatory Cascade, and Apoptosis-Targeting Bax/Bcl-2 and Caspase-3 Signaling Pathways. *Animals (Basel).* 2021;11(3):886.
 91. Jasim ST, Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI. *Ginkgo Biloba* protects cardiomyocytes against acute doxorubicin induced cardiotoxicity by suppressing oxidative stress. *J Pak Med Assoc.* 2019;69(Suppl 3)(8):S103-S107.
 92. Karakuyu NF, Savran M, Candan IA, Buyukbayram HI, Erzurumlu Y. Investigation of cardioprotective effect of lercanidipine on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2023.
 93. Arafa MH, Mohammad NS, Atteia HH, Abd-Elaziz HR. Protective effect of resveratrol against doxorubicin-induced cardiac toxicity and fibrosis in male experimental rats. *J Physiol Biochem.* 2014;70(3):701-11.
 94. Sadek KM, Mahmoud SFE, Zeweil MF, Abouzed TK. Proanthocyanidin alleviates doxorubicin-induced cardiac injury by inhibiting NF-κB pathway and modulating oxidative stress, cell cycle, and fibrogenesis. *J Biochem Mol Toxicol.* 2021;35(4):e22716.
 95. El-Agamy DS, El-Harbi KM, Khoshhal S, Ahmed N, Elkablawy MA, Shaaban AA, Abo-Haded HM. Pristimerin protects against doxorubicin-induced

- cardiotoxicity and fibrosis through modulation of Nrf2 and MAPK/NF- κ B signaling pathways. *Cancer Manag Res.* 2018;11:47-61.
96. Ma T, Kandhare AD, Mukherjee-Kandhare AA, Bodhankar SL. Fisetin, a plant flavonoid ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity in experimental rats: the decisive role of caspase-3, COX-II, cTn-I, iNOs and TNF- α . *Mol Biol Rep.* 2019;46(1):105-118.
97. Zhu J, Zhang J, Zhang L, Du R, Xiang D, Wu M, Zhang R, Han W. Interleukin-1 signaling mediates acute doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biomed Pharmacother.* 2011;65(7):481-5.
98. Ahmadian M, Dabidi Roshan V. Modulatory Effect of Aerobic Exercise Training on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats with Different Ages. *Cardiovasc Toxicol.* 2018;18(1):33-42.
99. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
100. Culberson CF. Improved conditions and new data for identification of lichen products by standardized thin-layer chromatographic method. *Journal of Chromatography A.* 1972;72(1):113-25.
101. Elix JA. A catalogue of standardized chromatographic data and biosynthetic relationships for lichen substances. 6th edition. Canberra: Published by the author; 2022.
102. Sovrlić M, Manojlović N, Kosanić M, Kočović A, Tomović J, Vasiljević P. Lichenochemical analysis and in vitro antioxidant activity of extracts and gyrophoric acid from lichen *Umbilicaria grisea*. 2nd International Conference on Chemo and Bioinformatics. September 28-29, 2023. Kragujevac, Serbia. Institute for Information Technologies. Book of Proceedings, p515-518.
103. White PA, Oliveira RC, Oliveira AP, Serafini MR, Araújo AA, Gelain DP, Moreira JC, Almeida JR, Quintans JS, Quintans-Junior LJ, Santos MR. Antioxidant activity and mechanisms of action of natural compounds isolated from lichens: a systematic review. *Molecules.* 2014;19(9):14496-527.
104. Sepahvand A, Studzińska-Sroka E, Ramak P, Karimian V. *Usnea* sp.: Antimicrobial potential, bioactive compounds, ethnopharmacological uses and other pharmacological properties; a review article. *J Ethnopharmacol.* 2021;268:113656.
105. Ali Redha A. Review on Extraction of Phenolic Compounds from Natural Sources Using Green Deep Eutectic Solvents. *J Agric Food Chem.* 2021;69(3):878-912.
106. Monteiro M, Santos RA, Iglesias P, Couto A, Serra CR, Gouvinhas I, Barros A, Oliva-Teles A, Enes P, Díaz-Rosales P. Effect of extraction method and solvent system on the phenolic content and antioxidant activity of selected macro and microalgae extracts. *Journal of Applied Phycology.* 2020;32:349-62.
107. Chen J, Yang J, Ma L, Li J, Shahzad N, Kim CK. Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Sci Rep.* 2020;10(1):2611.
108. Olszowy-Tomczyk M, Garbaczewska S, Wianowska D. Correlation Study of Biological Activity with Quercetin and Phenolics Content in Onion Extracts. *Molecules.* 2022;27(23):8164.
109. Muflihah YM, Gollavelli G, Ling YC. Correlation Study of Antioxidant Activity with Phenolic and Flavonoid Compounds in 12 Indonesian Indigenous Herbs. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(10):1530.

110. Becerril-Sánchez AL, Quintero-Salazar B, Dublán-García O, Escalona-Buendía HB. Phenolic Compounds in Honey and Their Relationship with Antioxidant Activity, Botanical Origin, and Color. *Antioxidants* (Basel). 2021;10(11):1700.
111. Chen X, Li H, Zhang B, Deng Z. The synergistic and antagonistic antioxidant interactions of dietary phytochemical combinations. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2022;62(20):5658-5677.
112. Wang S, Meckling KA, Marccone MF, Kakuda Y, Tsao R. Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. *J Agric Food Chem*. 2011;59(3):960-8.
113. Ureña-Vacas I, González-Burgos E, Divakar PK, Gómez-Serranillos MP. Lichen Extracts from Cetrarioid Clade Provide Neuroprotection against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress. *Molecules*. 2022;27(19):6520.
114. Elečko J, Vilková M, Frenák R, Routray D, Ručová D, Bačkor M, Goga M. A Comparative Study of Isolated Secondary Metabolites from Lichens and Their Antioxidative Properties. *Plants* (Basel). 2022;11(8):1077.
115. Alavi M, Hamblin MR, Kennedy JF. Antimicrobial applications of lichens: secondary metabolites and green synthesis of silver nanoparticles: a review. *Nano Micro Biosystems*. 2022;1(1):15-21.
116. Rattan R, Shukla S, Sharma B, Bhat M. A Mini-Review on Lichen-Based Nanoparticles and Their Applications as Antimicrobial Agents. *Front Microbiol*. 2022;12:633090.
117. Wethalawe AN, Alwis YV, Udukala DN, Paranagama PA. Antimicrobial Compounds Isolated from Endolichenic Fungi: A Review. *Molecules*. 2021;26(13):3901.
118. Hamida RS, Ali MA, Abdelmeguid NE, Al-Zaban MI, Baz L, Bin-Meferij MM. Lichens-A Potential Source for Nanoparticles Fabrication: A Review on Nanoparticles Biosynthesis and Their Prospective Applications. *J Fungi* (Basel). 2021;7(4):291.
119. Karaahmet Z, Kinalioğlu K, Aydın S. Antioxidant and Antibacterial Potencies of *Xanthoparmelia conspersa* (Ehrh. ex Ach.) Hale and *Dermatocarpon miniatum* (L.) W. Mann. Lichens from Black Sea Region in Turkey. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Derg*. 2019;9(3): 415–424.
120. Kinalioğlu K, Aydın S, İlhan Ö, Yılmaz Z. Phenol and Flavonoid Amounts, Antioxidant and Antibacterial Potencies of *Xanthoparmelia stenophylla* (Ach.) Ahti&D. Hawksw. *AKU-J Sci Eng*. 2016;16:6–15.
121. Sökmen BB, Kinalioğlu K, Aydın S. Evaluation of antifungal potentials and antioxidant capacities of some foliose lichen species. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 2018;22(1):148-52.
122. Simonyan A, Sargsyan R, Panosyan H, Trchounian A. Study of antibacterial and antioxidant activities of saxicolous lichen *Xanthoparmelia stenophylla*. *Proc YSU B Chem Biol Sci*. 2020;54.2(252):132–7.
123. Houshyar F, Jamshidi S, Sohrabi M. Antimicrobial in Vitro and in Vivo Potential of Five Lichen Species on *Fusarium Equiseti* and *Pectobacterium Carotovora* Pv. *Carotovora* Causal Agents of Potato Rots. *Int J Adv Biol Biomed Res*. 2014;2:412-7.
124. Nugraha AS, Untari LF, Laub A, Porzel A, Franke K, Wessjohann LA. Anthelmintic and antimicrobial activities of three new depsides and ten known depsides and phenols from Indonesian lichen: *Parmelia cetrata* Ach. *Nat Prod Res*. 2021;35(23):5001-5010.

125. Studzinska-Sroka E, Galanty A, Bylka W. Atranorin - An Interesting Lichen Secondary Metabolite. *Mini Rev Med Chem*. 2017;17(17):1633-1645.
126. Maciąg-Dorszyńska M, Węgrzyn G, Guzow-Krzemińska B. Antibacterial activity of lichen secondary metabolite usnic acid is primarily caused by inhibition of RNA and DNA synthesis. *FEMS Microbiol Lett*. 2014;353(1):57-62.
127. 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 Chemother*. 2004;48(11):4360-5.
128. Mitrovic T, Stamenkovic S, Cvetkovic V, Radulovic N, Mladenovic M, Stankovic M, Topuzovic M, Radojevic I, Stefanovic O, Vasic S, Comic L. *Platismatia glaucia* and *Pseudevernia furfuracea* lichens as sources of antioxidant, antimicrobial and antibiofilm agents. *EXCLI J*. 2014;13:938-53.
129. Pompilio A, Riviello A, Crocetta V, Di Giuseppe F, Pomponio S, Sulpizio M, Di Ilio C, Angelucci S, Barone L, Di Giulio A, Di Bonaventura G. Evaluation of antibacterial and antibiofilm mechanisms by usnic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol*. 2016;11:1315-1338.
130. Pompilio A, Pomponio S, Di Vincenzo V, Crocetta V, Nicoletti M, Piovano M, Garbarino JA, Di Bonaventura G. Antimicrobial and antibiofilm activity of secondary metabolites of lichens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cystic fibrosis patients. *Future Microbiol*. 2013;8(2):281-92.
131. Millot M, Girardot M, Dutreix L, Mambu L, Imbert C. Antifungal and Anti-Biofilm Activities of Acetone Lichen Extracts against *Candida albicans*. *Molecules*. 2017;22(4):651.
132. Guzzo F, Scognamiglio M, Fiorentino A, Buommino E, D'Abrosca B. Plant Derived Natural Products against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: Antibiofilm Activity and Molecular Mechanisms. *Molecules*. 2020;25(21):5024.
133. Slobodníková L, Fialová S, Rendeková K, Kováč J, Mučaji P. Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. *Molecules*. 2016;21(12):1717.
134. Matilla-Cuenca L, Gil C, Cuesta S, Rapún-Araiz B, Žiemytė M, Mira A, Lasa I, Valle J. Antibiofilm activity of flavonoids on staphylococcal biofilms through targeting BAP amyloids. *Sci Rep*. 2020;10(1):18968.
135. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 2007;42(4):321-4.
136. Pettit RK, Weber CA, Pettit GR. Application of a high throughput Alamar blue biofilm susceptibility assay to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2009;8:28.
137. Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2012;2(2):303-36.
138. Roser LA, Erkoç P, Ingelfinger R, Henke M, Ulshöfer T, Schneider AK, Laux V, Geisslinger G, Schmitt I, Fürst R, Schiffmann S. Lecanoric acid mediates anti-proliferative effects by an M phase arrest in colon cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2022;148:112734.
139. Solárová Z, Liskova A, Samec M, Kubatka P, Büsselberg D, Solár P. Anticancer Potential of Lichens' Secondary Metabolites. *Biomolecules*. 2020;10(1):87.
140. Pyrczak-Felczykowska A, Narlawar R, Pawlik A, Guzow-Krzemińska B, Artymiuk D, Hać A, Ryś K, Rendina LM, Reekie TA, Herman-Antosiewicz A, Kassiou M. Synthesis of Usnic Acid Derivatives and Evaluation of Their

- Antiproliferative Activity against Cancer Cells. *J Nat Prod.* 2019;82(7):1768-1778.
141. Kumar J, Dhar P, Tayade AB, Gupta D, Chaurasia OP, Upreti DK, Arora R, Srivastava RB. Antioxidant capacities, phenolic profile and cytotoxic effects of saxicolous lichens from trans-Himalayan cold desert of Ladakh. *PLoS One.* 2014;9(6):e98696.
142. Siddiqui AJ, Jahan S, Singh R, Saxena J, Ashraf SA, Khan A, Choudhary RK, Balakrishnan S, Badraoui R, Bardakci F, Adnan M. Plants in Anticancer Drug Discovery: From Molecular Mechanism to Chemoprevention. *Biomed Res Int.* 2022;2022:5425485.
143. Majolo F, Delwing LK, Marmitt DJ, Bustamante-Filho IC, Goettert MI. Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: Important advances for drug discovery. *Phytochem Let.* 2019;31:196-207.
144. Zambare VP, Christopher LP. Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharm Biol.* 2012;50(6):778-98.
145. Paluszczak J, Kleszcz R, Studzińska-Sroka E, Krajka-Kuźniak V. Lichen-derived caperatic acid and physodic acid inhibit Wnt signaling in colorectal cancer cells. *Mol Cell Biochem.* 2018;441(1-2):109-124.
146. Xing M, Yan F, Yu S, Shen P. Efficacy and Cardiotoxicity of Liposomal Doxorubicin-Based Chemotherapy in Advanced Breast Cancer: A Meta-Analysis of Ten Randomized Controlled Trials. *PLoS One.* 2015;10(7):e0133569.
147. Moutabian H, Ghahramani-Asl R, Mortezaadeh T, Laripour R, Narmani A, Zamani H, Ataei G, Bagheri H, Farhood B, Sathyapalan T, Sahebkar A. The cardioprotective effects of nano-curcumin against doxorubicin-induced cardiotoxicity: A systematic review. *Biofactors.* 2022;48(3):597-610.
148. Gu J, Hu W, Zhang DD. Resveratrol, a polyphenol phytoalexin, protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Cell Mol Med.* 2015;19(10):2324-8.
149. Chung WB, Yi JE, Jin JY, Choi YS, Park CS, Park WC, Song BJ, Youn HJ. Early cardiac function monitoring for detection of subclinical Doxorubicin cardiotoxicity in young adult patients with breast cancer. *J Breast Cancer.* 2013;16(2):178-83.
150. Podyacheva EY, Kushnareva EA, Karpov AA, Toropova YG. Analysis of Models of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Rats and Mice. A Modern View From the Perspective of the Pathophysiologist and the Clinician. *Front Pharmacol.* 2021;12:670479.
151. Sheibani M, Azizi Y, Shayan M, Nezamoleslami S, Eslami F, Farjoo MH, Dehpour AR. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: An Overview on Pre-clinical Therapeutic Approaches. *Cardiovasc Toxicol.* 2022;22(4):292-310.
152. Javanbakht S, Shaabani A. Carboxymethyl cellulose-based oral delivery systems. *Int J Biol Macromol.* 2019;133:21-29.
153. Bradic J, Andjic M, Novakovic J, Kocovic A, Tomovic M, Petrovic A, Nikolic M, Mitrovic S, Jakovljevic V, Pecarski D. Lady's Bedstraw as a Powerful Antioxidant for Attenuation of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Antioxidants (Basel).* 2023;12(6):1277.
154. Rankovic M, Dragicin N, Jeremic J, Samanovic AM, Stojkov S, Mitrovic S, Jeremic N, Radonjic T, Srejsovic I, Bolevich S, Svistunov A, Jakovljevic V, Turnic TN. Protective Role of Vitamin B1 in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats: Focus on Hemodynamic, Redox, and Apoptotic Markers in Heart. *Front Physiol.* 2021;12:690619.

155. Dantas D, Pereira AG, Fujimori ASS, Ribeiro APD, de Almeida Silva CCV, Monte MG, Corrêa CR, Fernandes AA, Bazan SGZ, Azevedo PS, Minicucci MF, de Paiva SAR, Zornoff LAM, Polegato BF. Doxycycline Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Improving Myocardial Energy Metabolism in Rats. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2022;9(8):254.
156. Baniahmad B, Safaeian L, Vaseghi G, Rabbani M, Mohammadi B. Cardioprotective effect of vanillic acid against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rat. *Res Pharm Sci.* 2020;15(1):87-96.
157. Elberry AA, Abdel-Naim AB, Abdel-Sattar EA, Nagy AA, Mosli HA, Mohamadin AM, Ashour OM. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(5):1178-84.
158. Reagan WJ, York M, Berridge B, Schultze E, Walker D, Pettit S. Comparison of cardiac troponin I and T, including the evaluation of an ultrasensitive assay, as indicators of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Pathol.* 2013;41(8):1146-58.
159. Zhang S, You ZQ, Yang L, Li LL, Wu YP, Gu LQ, Xin YF. Protective effect of Shenmai injection on doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulation of inflammatory mediators. *BMC Complement Altern Med.* 2019;19(1):317.
160. Dulf PL, Mocan M, Coadă CA, Dulf DV, Moldovan R, Baldea I, Farcas AD, Blendea D, Filip AG. Doxorubicin-induced acute cardiotoxicity is associated with increased oxidative stress, autophagy, and inflammation in a murine model. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2023;396(6):1105-1115.
161. Yarmohammadi F, Karbasforooshan H, Hayes AW, Karimi G. Inflammation suppression in doxorubicin-induced cardiotoxicity: natural compounds as therapeutic options. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2021;394(10):2003-2011.
162. Ahmed AZ, Mumbrekar KD, Satyam SM, Shetty P, D'Souza MR, Singh VK. Chia Seed Oil Ameliorates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Female Wistar Rats: An Electrocardiographic, Biochemical and Histopathological Approach. *Cardiovasc Toxicol.* 2021;21(7):533-542.
163. Shekari M, Gortany NK, Khalilzadeh M, Abdollahi A, Ghafari H, Dehpour AR, Ghazi-Khansari M. Cardioprotective effects of sodium thiosulfate against doxorubicin-induced cardiotoxicity in male rats. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2022;23(1):32.
164. Freiwan M, Kovács MG, Kovács ZZA, Szűcs G, Dinh H, Losonczy R, Siska A, Kriston A, Kovács F, Horváth P, Földesi I, Cserni G, Dux L, Csont T, Sárközy M. Investigation of the Antiremodeling Effects of Losartan, Mirabegron and Their Combination on the Development of Doxorubicin-Induced Chronic Cardiotoxicity in a Rat Model. *Int J Mol Sci.* 2022;23(4):2201.
165. Zhao D, Xue C, Li J, Feng K, Zeng P, Chen Y, Duan Y, Zhang S, Li X, Han J, Yang X. Adiponectin agonist ADP355 ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by decreasing cardiomyocyte apoptosis and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;533(3):304-312.
166. Alshabanah OA, Hafez MM, Al-Harbi MM, Hassan ZK, Al Rejaie SS, Asiri YA, Sayed-Ahmed MM. Doxorubicin toxicity can be ameliorated during antioxidant L-carnitine supplementation. *Oxid Med Cell Longev.* 2010;3(6):428-33.
167. Farag MR, Moselhy AAA, El-Mleeh A, Aljuaydi SH, Ismail TA, Di Cerbo A, Crescenzo G, Abou-Zeid SM. Quercetin Alleviates the Immunotoxic Impact

- Mediated by Oxidative Stress and Inflammation Induced by Doxorubicin Exposure in Rats. *Antioxidants* (Basel). 2021;10(12):1906.
168. Pecoraro M, Del Pizzo M, Marzocco S, Sorrentino R, Ciccarelli M, Iaccarino G, Pinto A, Popolo A. Inflammatory mediators in a short-time mouse model of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;293:44-52.
169. Reis-Mendes A, Padrão AI, Duarte JA, Gonçalves-Monteiro S, Duarte-Araújo M, Remião F, Carvalho F, Sousa E, Bastos ML, Costa VM. Role of Inflammation and Redox Status on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Infant and Adult CD-1 Male Mice. *Biomolecules*. 2021;11(11):1725.
170. Mendonça SC, de Vasconcelos CM, Cruz JS, Roman-Campos D, Menezes-Filho JE, Anjos-Neto RA, Martins DL, de Souza Araújo AA, da Silva LC, dos Santos Bezerra M, de Albuquerque-Júnior RL. (+)-Usnic acid isolated from the lichen *Cladonia substellata* impairs myocardial contractility. *Planta Medica International Open*. 2017 Apr;4(02):e59-65.
171. Kwong SP, Wang C. Review: Usnic acid-induced hepatotoxicity and cell death. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2020;80:103493.
172. Croce N, Pitaro M, Gallo V, Antonini G. Toxicity of Usnic Acid: A Narrative Review. *J Toxicol*. 2022;2022:8244340.
173. Singh SK, Mukerjee A, and Abhishek Tripathi HP. Nanoformulation of cinnamon oil/usnic acid blend:-An attempt to improve chemopreventive effect and reduce hepatotoxicity. *Journal of Medicinal Plants*. 2020;8(4):311-6.
174. Su ZQ, Mo ZZ, Liao JB, Feng XX, Liang YZ, Zhang X, Liu YH, Chen XY, Chen ZW, Su ZR, Lai XP. Usnic acid protects LPS-induced acute lung injury in mice through attenuating inflammatory responses and oxidative stress. *Int Immunopharmacol*. 2014;22(2):371-8.
175. Jin JQ, Li CQ, He LC. Down-regulatory effect of usnic acid on nuclear factor-kappaB-dependent tumor necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7. *Phyther Res*. 2008;22(12):1605-9.
176. Galanty A, Zagrodzki P, Gdula-Argasińska J, Grabowska K, Koczurkiewicz-Adamczyk P, Wróbel-Biedrawa D, Podolak I, Pękała E, Paśko P. A Comparative Survey of Anti-Melanoma and Anti-Inflammatory Potential of Usnic Acid Enantiomers-A Comprehensive In Vitro Approach. *Pharmaceuticals* (Basel). 2021;14(9):945.
177. Dos Santos PH, Mesquita T, Miguel-Dos-Santos R, de Almeida GKM, de Sá LA, Dos Passos Menezes P, de Souza Araujo AA, Lauton-Santos S. Inclusion complex with β -cyclodextrin is a key determining factor for the cardioprotection induced by usnic acid. *Chem Biol Interact*. 2020;332:109297.
178. Satin J, Schroder EA. Autoregulation of cardiac l-type calcium channels. *Trends Cardiovasc Med*. 2009;19(8):268-71.
179. Mitry MA, Edwards JG. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *Int J Cardiol Heart Vasc*. 2016;10:17-24.
180. Moro N, Dokshokova L, Perumal Vanaja I, Prando V, Cnudde SJA, Di Bona A, Bariani R, Schirone L, Bauce B, Angelini A, Sciarretta S, Ghigo A, Mongillo M, Zaglia T. Neurotoxic Effect of Doxorubicin Treatment on Cardiac Sympathetic Neurons. *Int J Mol Sci*. 2022;23(19):11098.
181. Boyette LC, Manna B. Physiology, Myocardial Oxygen Demand. 2023. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024.

-
182. Syahputra RA, Harahap U, Dalimunthe A, Nasution MP, Satria D. The Role of Flavonoids as a Cardioprotective Strategy against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Review. *Molecules*. 2022;27(4):1320.
 183. Mammadov R, Suleyman B, Altuner D, Demirci E, Cetin N, Yilmaz A, Baykal H, Alpcan H, Turumtay EA, Suleyman H. Effect of ethyl acetate extract of usnea longissima on esophagogastric adenocarcinoma in rats1. *Acta Cir Bras*. 2019;34(3):e201900305.
 184. Podyacheva E, Shmakova T, Kushnareva E, Onopchenko A, Martynov M, Andreeva D, Toropov R, Cheburkin Y, Levchuk K, Goldaeva A, Toropova Y. Modeling Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy With Fibrotic Myocardial Damage in Wistar Rats. *Cardiol Res*. 2022;13(6):339-356.

VIII ПРИЛОЗИ

БИОГРАФИЈА

Александар Кочовић, син Драгице и Горана, рођен 31. августа 1991. године у Крагујевцу. Завршио је основну и средњу медицинску школу у Крагујевцу као носилац дипломе „Вук Караџић“ и ђак генерације.

У јулу 2015. године дипломирао је на Интегрисаним академским студијама фармације, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, са дипломским радом: „Синтеза и карактеризација комплекса бакра(II) са S-алил дериватом тиосалицилне киселине“ и са просеком 9,90 (девет и 90/100) стекао звање магистра фармације. Током пете године студија био је стипендиста Фонда за младе таленте Републике Србије „Доситеја“. Такође, био је и корисник стипендије „Драгослав Срејовић“ коју додељује град Крагујевац. Стручни испит за магистра фармације положио је 28.04.2016. године пред испитном комисијом Министарства здравља Републике Србије.

Школске 2015/2016 године уписује докторске академске студије на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Тренутно је студент треће године докторских академских студија на изборном подручју Клиничка и експериментална фармакологија. Положио је све испите предвиђене програмом докторских академских студија са оценом 10. Усмени докторски испит положио је 26.06.2017. године са оценом 10.

Био је стипендиста је Министарства просвете, науке и технолошког развоја и распоређен је на пројекат Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу број ОИ 172014 под називом: „Синтеза, моделовање, физичко-хемијске и биолошке особине органских једињења и одговарајућих комплекса метала“.

Од јула 2018. године био је ангажован као истраживач на пројекту Министарства просвете, науке у технолошког развоја Републике Србије број ОИ 172015 под називом „Динамика нелинеарних физичко-хемијских и биохемијских система са моделирањем и предвиђањем њихових понашања под неравнотежним условима“.

Од фебруара 2022. године ангажован је као истраживач на пројекту Фонда за науку Републике Србије у оквиру позива ИДЕЈЕ под називом „Physicochemical aspects of rhythmicity in neuroendocrine systems: Dynamic and kinetic investigations of underlying reaction networks and their main compounds“ (NES7743504).

Од јануара 2024. године ангажован је као истраживач на пројекту Фонда за науку Републике Србије у оквиру позива ПРОМИС под називом „Unleashing Nature's Potential: Using Grape Skin Extract and Sustainable Materials for Advanced Chronic Wound Therapy“ (GraSP_MAT).

Од 2017. године је запослен као сарадник у настави за ужу научну област Фармацеутска анализа на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. 2019. године изабран у звање асистента за ужу научну област Фармацеутска анализа. Аутор је и коаутор 24 рада у часописима са СЦИ листе и учесник је већег броја домаћих и међународних научних конгреса. Завршио је курс из области Истраживачка етика (Research Ethics) у организацији Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, USA. Одлично чита, пише и говори енглески језик и познаје рад на рачунару.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Kocovic A**, Jeremic J, Bradic J, Sovrlac M, Tomovic J, Vasiljevic P, Andjic M, Draginic N, Grujovic M, Mladenovic K, Baskic D, Popovic S, Matic S, Zivkovic V, Jeremic N, Jakovljevic V, Manojlovic N. Phytochemical Analysis, Antioxidant, Antimicrobial, and Cytotoxic Activity of Different Extracts of *Xanthoparmelia stenophylla* Lichen from Stara Planina, Serbia. *Plants-Basel*. 2022;11(13):1624.
2. Nedeljković N, Nikolić M, Čanović P, Zarić M, Živković Zarić R, Bošković J, Vesović M, Bradić J, Anđić M, **Kočović A**, Nikolić M, Jakovljević V, Vujić Z, Dobričić V. Synthesis, characterization, and investigation of anti-inflammatory and antitumor activities of novel thiourea derivatives of naproxen. *Pharmaceutics-Basel*. 2023;16(1):1.
3. Kosanić M, Ranković B, Stanojković T, Vasiljević P, **Kočović A**, Manojlović A, Anđić M, Bradić J, Jakovljević V, Manojlović N. Phytochemical composition, biological activity and anti-inflammatory potential of acetone extract from the lichen *Platismatia glauca* (L.) W.L. Culb. & C.F. Culb. *Nat Prod Res*. 2023:1-11.
4. Bradic J, Andjic M, Novakovic J, **Kocovic A**, Tomovic M, Petrovic A, Nikolic M, Mitrovic S, Jakovljevic V, Pecarski D. Lady's Bedstraw as a Powerful Antioxidant for Attenuation of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Antioxidants-Basel*. 2023;12(6):1277.
5. Draginic N, Milosavljevic I, Andjic M, Jeremic J, Nikolic M, Sretenovic J, **Kocovic A**, Srejovic I, Zivkovic V, Bolevich S, Bolevich S, Curcic S, Jakovljevic V. Short-Term Administration of Lemon Balm Extract Ameliorates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Focus on Oxidative Stress. *Pharmaceutics-Basel*. 2022;15(7):840.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

„Екстракти лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*: фитохемијска анализа, биолошка активност и потенцијални кардиопротективни ефекти на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности“

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 08.04.2024. године,



потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

„Екстракти лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*: фитохемијска анализа, биолошка активност и потенцијални кардиопротективни ефекти на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности“

истоветне.

У Крагујевцу, 08.04.2024. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Александар Кочовић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

„Екстракти лишаја *Xanthoparmelia stenophylla*: фитохемијска анализа, биолошка активност и потенцијални кардиопротективни ефекти на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности“

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

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

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

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 08.04.2024. године,



потпис аутора

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