

# Pustułka pęcherzykowata (*Hypogymnia physodes* (L.) Nyl.) – charakterystyka porostu i jego właściwości biologiczne

## *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. – characteristic of the lichen and its biological properties

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Farmakognozji, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu  
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. farm. Wiesława Byłka

<sup>2</sup>Instytut Środowiska Rolniczego i Leśnego, Polska Akademia Nauk w Poznaniu  
Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. n. farm. Lech W. Szajdak

---

### SUMMARY

*Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. is the lichenized fungus within the Parmeliaceae family, that commonly occurs both in Poland, and other parts of Europe as well as in many other parts of the world. It is the epiphytic lichen growing on trunks and branches of deciduous and coniferous trees. As a result of the specific relationship between a heterotrophic fungus and an autotrophic photobiont – algae or cyanobacteria among others some secondary compounds are produced by mycobiont, not found among plants and with interesting and little-known biological properties. Till now, the presence of: atranorin, chloroatranorin, physodic acid, 3-hydroxyphysodic acid, 2'-O-methylphysodic acid, physodalic acid, protocetraric acid and isophysodic acid, was confirmed in thallus of *H. physodes*. In vitro studies revealed interesting biological properties of compounds and extracts from *H. physodes*. Results of experiments proved their antibacterial and antioxidant activities, as well as cancer cell cytotoxicity and inhibitory effects on enzymes. Depsidones isolated from *H. physodes* also influenced on cells of the immune system. Moreover, this lichen is often used in bioindicator and biomonitoring studies that allow for assessment of environmental conditions, also air pollution with i.a. heavy metals.

**Keywords:** lichens, *Hypogymnia physodes*, secondary compounds, bioindicator

---

### STRESZCZENIE

Pustułka pęcherzykowata (*Hypogymnia physodes* (L.) Nyl.) jest porostem z rodziny tarczownicowatych (Parmeliaceae), powszechnie występującym w różnych częściach Europy, w tym w Polsce oraz na innych kontynentach. Jako epifit porasta pnie i gałęzie drzew liściastych oraz iglastych. W wyniku swoistych relacji pomiędzy cudzożywnym grzybem a samożywnym fotobiontem – glonem lub sinicą, dochodzi do wytwarzania przez pierwszego z wymienionych wyżej partnerów metabolitów wtórnych, niespotykanych w świecie roślin, o interesujących, słabo poznanych właściwościach biologicznych. Związki, których obecność w plechach pustułki pęcherzykowatej potwierdzono, to: atranoryna, chloroatranoryna, kwas fizodowy, kwas 3-hydroksyfizodowy, kwas 2'-O-metylofizodowy, kwas fizodalowy, kwas protocetrarowy oraz kwas izofizodowy. Prowadzone badania o charakterze in vitro wykazały, że związki i wyciągi z *H. physodes* wykazują wielokierunkowe właściwości biologiczne. Rezultaty eksperymentów świadczą o ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej, antyoksydacyjnej, cytotoksycznej wobec komórek nowotworowych oraz hamującej aktywność enzymatyczną. Depsydony izolowane z pustułki pęcherzykowatej wpływały również na komórki układu odpornościowego. Ponadto porost ten jest często wykorzystywany w badaniach bioindykacyjnych i biomonitoringowych na potrzeby oceny stanu środowiska, w tym zanieczyszczenia powietrza m.in. metalami ciężkimi.

**Słowa kluczowe:** porosty, *Hypogymnia physodes*, metabolity wtórne, biowskaźnik

---

### Wstęp

Porosty (grzyby zlichenizowane) to organizmy, których plecha zbudowana jest z komórek autotroficznego komponentu zielonego (glonu lub sinicy)

oraz cudzożywnego grzyba lichenizującego zwanego mikobiontem. Obaj partnerzy wchodzi w swoisty typ wzajemnej zależności o charakterze symbiozy. To dzięki zdolnościom fotosyntetycznym fotobionta możliwe jest wytwarzanie potrzebnych do wzrostu

składników odżywczych, natomiast przemiany biochemiczne zachodzące w strzępkach mikobionta pozwalają na produkcję metabolitów wtórnych. Związki te zapewniają porostom m.in. ochronę przed wpływem niekorzystnych czynników zewnętrznych.

Do tej pory na terenie Polski stwierdzono występowanie ok. 1500 gatunków grzybów zlichenizowanych (1). Jednym z nich jest pospolita na obszarze całego kraju pustułka pęcherzykowata (*Hypogymnia physodes* (L.) Nyl.). Dotąd niewykorzystywana w lecznictwie, wzbudziła zainteresowanie naukowców, a rezultaty prowadzonych eksperymentów świadczą o interesujących właściwościach badanego porostu, w tym o jego aktywności biologicznej. Praca stanowi przegląd informacji na temat porostu *H. physodes* i obejmuje jego charakterystykę, opis właściwości biologicznych ekstraktów otrzymanych z plechy pustułki oraz obecnych w niej związków o charakterze metabolitów wtórnych, a także omówienie roli gatunku w analizach bioindykacyjnych.

### Opis gatunku

*Hypogymnia physodes* jest gatunkiem powszechnie występującym w różnych częściach Europy, Ameryce Północnej, Afryce Wschodniej, a nawet w Himalajach (2, 3). Jako epifit porasta pnie i gałęzie drzew liściastych oraz iglastych. Jest gatunkiem kwasolubnym, dlatego szczególnie korzystne warunki dla swojego rozwoju znajduje na podłożach o niższym odczynie, np. na korze sosny, brzozy, świerka, dębu. Ponadto porost ten stwierdzany jest również na drewnie, słomianych dachach, rzadziej na piaszczystej glebie, humusie oraz na podłożu skalnym (3, 4).

Pustułka pęcherzykowata ma listkowatą, luźno przyrzućioną do podłoża plechę o kształcie rozetkowanym lub nieregularnym, silnie podzieloną na odcinki, o rozmiarze dochodzącym najczęściej do 5 cm (5). Górna powierzchnia plechy jest gładka, szara lub szarozielona, na końcach odcinków brunatnawo nabiegła, natomiast dolna część jest silnie pomarszczona i ma kolor czarny, przechodzący na obwodzie w odcień jasnobrazowy. Pustułka pęcherzykowata nie ma chwytników, natomiast do podłoża przyrzućiona jest za pomocą zmarszczek dolnej kory. Soralia, które stanowią skupienia sorediów (czyli wytworów na plezse składających się zwykle z kilku lub kilkunastu komórek glonów oplecionych strzępkami grzyba, służących namnażaniu się porostów), są typu paszczowatego i powstają wskutek pęknięcia plechy na granicy dolnej i górnej warstwy korowej na końcach odcinków (4). Owocniki, osiągające średnicę 2-8 mm, są bardzo rzadko obserwowane, natomiast zarodniki

są jednokomórkowe, bezbarwne, elipsoidalne o wymiarach 6-9 x 4-5  $\mu\text{m}$  (5).

### Związki chemiczne

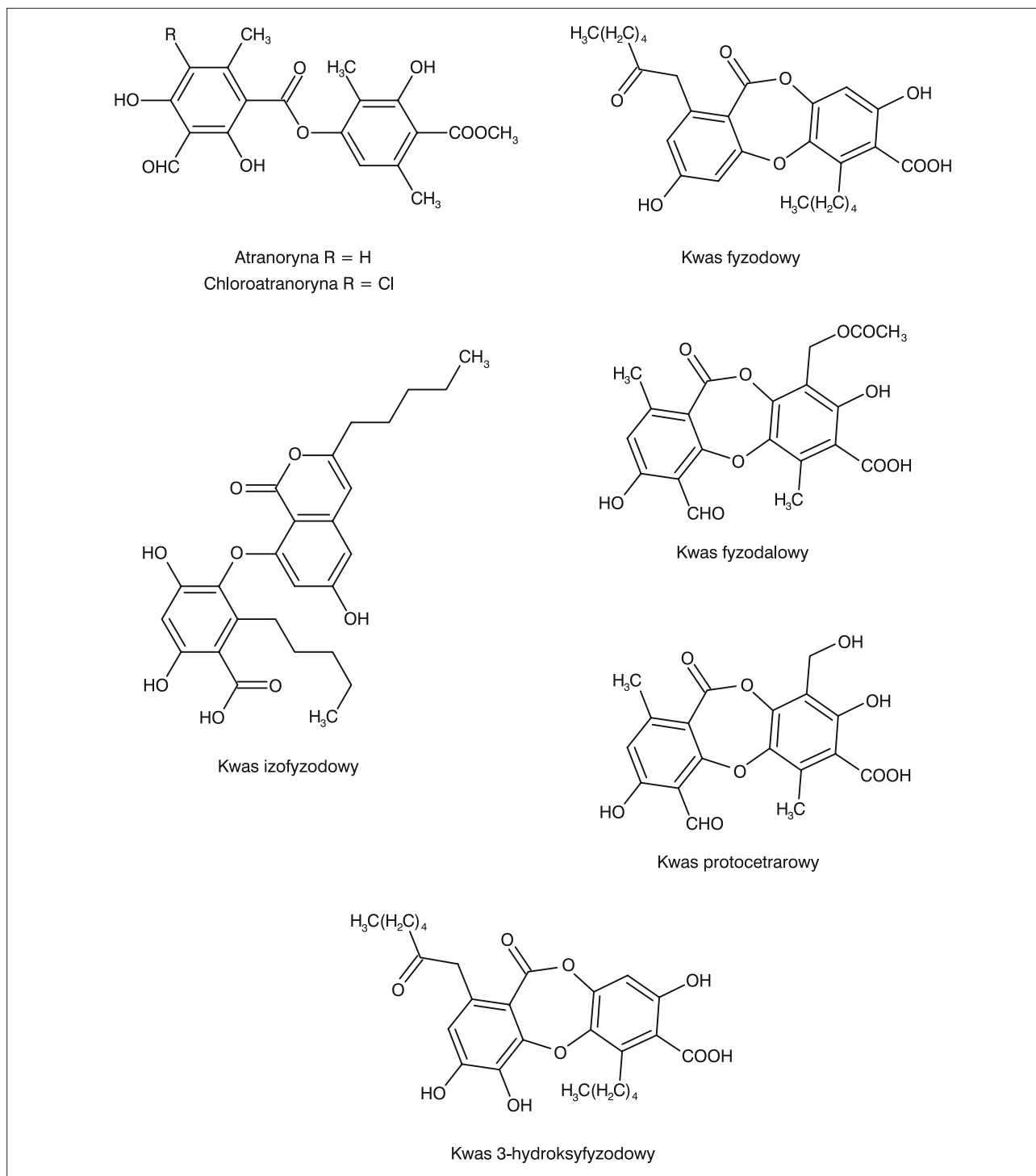
*H. physodes* wytwarza substancje chemiczne o charakterze depsydonów i depsydonów. Do pierwszej grupy należą atranoryna i chloroatranoryna (obecne w części korowej plechy). Do grupy depsydonów zaliczane są: kwas fizodowy, kwas 3-hydroksyfizodowy, kwas 2'-O-metylofizodowy, kwas fizodalowy oraz kwas protocetrarowy (w części rdzeniowej). Ponadto z plechy wyizolowano kwas izofizodowy (2, 6-10) (ryc. 1).

Wykonane analizy HPLC określające zawartość związków w plezse *H. physodes* zebranej na terenie Skandynawii (Norwegia) wykazały, że wśród obecnych w poroście metabolitów wtórnych, najwyższe stężenie charakteryzowało kwas fizodalowy (2,7-8,4% suchej masy) i fizodowy (3,3-5,0%), natomiast kwas protocetrarowy, a także substancje zawarte w części korowej: atranoryna i chloroatranoryna były obecne w znacznie mniejszej ilości (odpowiednio 0,26-0,52%; 0,14-0,43%; 0,03-0,18%) (8).

Badano również całkowitą zawartość polifenoli oraz flawonoidów w ekstraktach otrzymanych z plech *H. physodes*. Wyciąg metanolowy, uzyskany drogą 24-godzinnej maceracji w temp. pokojowej, charakteryzowała wysoka zawartość polifenoli (141,59 mg kwasu galusowego/g wyciągu) oraz znacznie niższa flawonoidów (20,14 mg rutyny/g wyciągu) (10). W innym badaniu zawartość polifenoli dla ekstraktów acetonowego, metanolowego oraz wodnego wynosiła odpowiednio 30,1; 86,8 i 6,3  $\mu\text{g}$  równoważnika pirokatecholu. Ilość flawonoidów była porównywalna dla ekstraktów acetonowego i metanolowego (30,1 i 32,1  $\mu\text{g}$  równoważnika rutyny) oraz znacznie niższa dla ekstraktu wodnego (11,3  $\mu\text{g}$  równoważnika rutyny) (11).

### Metabolity wtórne a czynniki środowiskowe

Ilość metabolitów wtórnych, obecnych w plezse pustułki pęcherzykowejatej, może ulegać zmianom wskutek działania różnorodnych czynników środowiskowych, w tym powiązanych z działalnością antropogeniczną. Zmiany te mogą przejawiać się wzrostem lub obniżeniem zawartości substancji porostowych (12). Solhaug i wsp. (8) przeprowadzili ilościową analizę stężenia metabolitów wtórnych w plechach *H. physodes* rosnących na stanowiskach o odmiennym stopniu nasłonecznienia. Zwiększenie całkowitej zawartości metabolitów wtórnych w badanym poroście powiązane było ze wzrostem nasłonecznienia. Ponadto wykazano dodatnie zależności pomiędzy ilością atranoryny i chloroatranoryny a bezpośrednim i rozproszonym



Ryc. 1. Wzory związków obecnych w *H. physodes*

promieniowaniem. W przypadku kwasów: fizodowego, fizodalowego i protocetrarowego wykryto lepsze korelacje ich zawartości z promieniowaniem słonecznym w porównaniu z promieniowaniem bezpośrednim (8).

Wpływ metali ciężkich na wytwarzanie metabolitów wtórnych u *H. physodes* oceniano u transplantów

eksponowanych przez 6 mies. na stanowiskach zlokalizowanych na terenie Krakowskiego Okręgu Przemysłowego (12). Największą zawartość Cd, Pb i Zn stwierdzono w plechach zebranych w pobliżu huty cynku i ołowiu, podczas gdy Cr i Ni – w sąsiedztwie zakładu chemicznego produkującego związku chromu, fosforu i siarki. Bliskość

zakładu przemysłowego wpłynęła na zmniejszenie ilości kwasów fizodowego i hydroksyfizodowego oraz atranoryny u transplantów. Podobne wyniki uzyskali Hauck i wsp. (13), którzy wykryli m.in. dodatnie korelacje pomiędzy zawartością kwasu fizodalowego u *H. physodes* a wzrostem  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Mn}^{2+}$  w substracie, przy zmniejszaniu się ilości kwasu 3-hydroksyfizodowego. Udowodniono, że związki o charakterze depsydonów, występujące w plesze *H. physodes*, mogą wykazywać zdolność wiązania kationów niektórych metali (14). Według danych piśmiennictwa kwas fizodalowy wykazywał niezwykle silną (95%) zdolność adsorbowania jonów metali  $\text{Fe}^{3+}$ . Właściwość tę miały również kwasy fizodowe i protocetrarowy, jednak w stopniu znacznie niższym od wymienionego wyżej związku (odpowiednio ok. 44 i 43%). Zjawiska nie zaobserwowano dla jonów  $\text{Fe}^{2+}$ . Zdolność adsorpcji kationów metali, jednak już w dużo mniejszym stopniu, dotyczyła także jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ .

Zwiększoną ilość kwasu fizodalowego w plechach wskutek ekspozycji na metale ciężkie można traktować jako przejaw funkcji tego związku w kształtowaniu strategii obronnej u *H. physodes* względem kumulujących się zanieczyszczeń (12-14). Wskazana wyżej właściwość może posłużyć wyjaśnieniu procesu wolniejszego ustępowania pustułki pęcherzykowejej wskutek zanieczyszczenia środowiska w porównaniu z innymi przedstawicielami tego rodzaju, tj. *H. farinacea*, *H. tubulosa* i *H. vittata*, czyli gatunkami, które nie mają w swojej plesze kwasu fizodalowego (14). Dane prezentowane w piśmiennictwie przedmiotu przemawiają za możliwością wykorzystania metabolitów wtórnych jako biomarkerów w badaniach środowiskowych (12).

Znane jest także oddziaływanie substancji porostowych na inne elementy biotyczne obecne w ekosystemach. Zdaniem Latkowskiej i wsp. (15) metabolity wtórne u pustułki pęcherzykowejej przyczyniły się do obniżenia żywotności świerku *Picea abies* i usychania jego gałęzi porośniętych obficie plechami porostu. Stwierdzenie to oparto na wynikach wskazujących na obecność kwasu fizodalowego, 3-hydroksyfizodowego oraz atranoryny w korze drzewa w miejscach bezpośrednio zasiedlonych przez porost (16). Ekstrakt acetonowy z *H. physodes* hamował rozwój grzybów chorobotwórczych tj. *Pythium ultimum*, *Ustilago maydis* i *Phytophthora infestans* (17). Sugeruje to, że metabolity wtórne inne niż atranoryna, znajdujące się u pustułki pęcherzykowejej, także hamują wzrost wymienionych powyżej grzybów (17).

## Aktywność biologiczna

### Działanie przeciwdrobnoustrojowe

Przeciwbakteryjne działanie ekstraktów otrzymanych z porostów oraz izolowanych z nich tzw. kwasów porostowych jest testowane od dawna. Mitrović i wsp. (10) badali ekstrakt metanolowy z *H. physodes* na 29 szczepach drobnoustrojów. W zależności od grupy testowanych drobnoustrojów aktywność znacznie różniła się. Ekstrakt wykazywał zróżnicowaną aktywność wobec *Bacillus* sp. (MIC = 0,04-0,08 mg/ml), *Enterococcus faecalis* (MIC = 0,08-5,0 mg/ml), *Staphylococcus aureus* (MIC = 0,04-0,3 mg/ml) i *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = 6,3 mg/ml). Ekstrakty metanolowe z *H. physodes* działały również przeciwgrzybiczo. Ekstrakt metanolowy z *H. physodes* wykazywał dość wysoką aktywność wobec szczepu wzorcowego *Aspergillus niger* (MIC = 0,01 mg/ml), przy czym aktywność wobec szczepu klinicznego *A. niger* była znacznie niższa (MIC = 5,0 mg/ml). Wykazane w badaniach minimalne stężenie hamujące rozwój innych grzybów pleśniowych i drożdżoidalnych wahało się dla omawianych wyciągów od 0,63 do 10 mg/ml. Aktywność flukonazolu wahała się w odniesieniu do badanych grzybów w granicach MIC = 0,03-0,5 mg/ml.

Aktywność przeciwbakteryjną wykazywał także obecny w *H. physodes* kwas fizodowy. Antybiotyczne działanie tego związku badano na różnych gatunkach drobnoustrojów. Okazało się, że testowany depsydon hamował rozwój bakterii Gram-dodatnich: *S. aureus* (MIC = 25  $\mu\text{g/ml}$ ) oraz *Mycobacterium smegmatis* (MIC = 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Substancją wzorcową był siarczan streptomycyny, który wzrost wymienionych mikroorganizmów hamował w stężeniu 5 i 1,25  $\mu\text{g/ml}$ . Kwas fizodowy nie wpływał w badanych stężeniach na rozwój bakterii: *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* oraz grzyba drożdżoidalnego *Candida albicans* (MIC > 100  $\mu\text{g/ml}$ ) (18).

Türk i wsp. (19) wykazali, że kwas fizodowy słabiej od chloroatranoryny i kwasu oliwetorowego hamował rozwój *Proteus vulgaris*, *S. aureus*, *Streptococcus faecalis* (MIC = 53,1 mmol), nie działał natomiast na bakterie *Aeromonas hydrophila*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. syringae*, *Salmonella typhimurium* oraz na wszystkie testowane grzyby pleśniowe. Ponadto kwas fizodowy działał silniej od chloroatranoryny, lecz słabiej od kwasu oliwetorowego na szczepy *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* i *Listeria monocytogenes* (MIC = 6,6-13,3 mmol). Stwierdzono, że badany depsydon, na skutek obecności wiązania



eterowego w cząsteczce, nie ma możliwości rotacji wokół wiązania estrowego. Depsydy (np. kwas oliwetorowy) pozbawione są blokady przestrzennej i zmieniając położenie w przestrzeni, mogą działać na centrum inhibicji zlokalizowane w komórkach grzyba (19).

W innych badaniach aktywność przeciwdrobnoustrojowa kwasu fizodowego była niższa niż testowanych równolegle substancji: atranoryny, kwasu gyroforowego i usninowego (MIC = 0,5-1 mg/ml dla kwasu fizodowego; MIC = 0,0075-0,5 mg/ml dla pozostałych związków). Opiswany depsydon działał najsilniej na *Botrytis cinerea* i *Paecilomyces variotii* (MIC = 0,5 mg/ml) (20).

Występujący w plechach pustułki pęcherzykowej kwas 3-hydroksyfizodowy został przebadany na 13 szczepach bakterii, 2 szczepach grzybów drożdżoidalnych i 10 szczepach grzybów pleśniowych. Pochodna kwasu fizodowego była aktywna wobec 9 spośród wszystkich badanych drobnoustrojów (*B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. vulgaris*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *S. faecalis*, *C. albicans*). Wyznaczona doświadczalnie wartość MIC wahała się między 0,08-2,57 mmol. Uwagę zwraca silna aktywność związku wobec *C. albicans* (MIC = 0,08 mmol) (21).

Interesującym jest fakt, iż kwas fizodowy oraz fizodalowy wraz z kwasem usninowym (związkiem izolowanym z porostów o silnym działaniu przeciwbakteryjnym) wchodziły w skład preparatu Evosin II, popularnego w II połowie XX wieku, głównie w Niemczech, jako środka do stosowania zewnętrznego w przypadku ropiejących i trudno gojących się ran (22).

### Działanie antyoksydacyjne

Zdolność zmiatania wolnych rodników przez wyściagi z *H. physodes* była określana w kilku badaniach z wykorzystaniem odczynnika DPPH. Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów metanolowych otrzymanych metodą 24-godzinnej maceracji oceniono, wyznaczając współczynnik  $EC_{50}$ . Okazało się, że stężenie ekstraktu w badanej próbie wymagane do zmniejszenia pierwotnego stężenia DPPH<sup>•</sup> o 50% wynosiło 79,7 µg/ml, podczas gdy  $EC_{50}$  dla zastosowanego jako wzorca BHT było równe 19,2 µg/ml (23).

Mitrović i wsp. (10) badali metanolowy ekstrakt przygotowany w analogiczny sposób. Eksperymentalnie wyznaczona wartość  $IC_{50}$  wynosiła 45,6 µg/ml. Następnie badano ekstrakty acetonowe, metanolowe i wodne z *H. physodes*, otrzymane metodą ekstrakcji w aparacie Soxhleta. Otrzymane wyniki wskazują, że wszystkie badane ekstrakty w stężeniu 1 mg/ml wykazywały

zdolność zmiatania rodnika odpowiednio w: 60,2; 73,2 i 31,0%. W przypadku zastosowanych w tym samym stężeniu wzorców, poziom rodnika DPPH<sup>•</sup> zmniejszał się odpowiednio dla witaminy C o 86,6%, BHA o 79,8% i α-tokoferolu o 64,0% (11).

Badano również redukujące właściwości acetonowych, metanolowych i wodnych ekstraktów z *H. physodes* metodą z heksacyjanożelazianem (III) potasu (11). Wyciągi, otrzymane metodą ekstrakcji w aparacie Soxhleta i zastosowane w stężeniu 1 mg/ml, wykazywały silniejszą zdolność redukcji jonów Fe<sup>3+</sup>, w porównaniu do badanych równocześnie ekstraktów uzyskanych z innych gatunków porostów (*Cladonia furcata*, *Parmelia caperata* i *Parmelia sulcata*). Odnotowane działanie było jednak słabsze od stosowanych jako wzorce: BHA, α-tokoferolu i witaminy C (11).

Właściwości przeciwutleniające kwasu fizodowego zostały zbadane metodą z odczynnikiem DPPH oraz metodą oceniającą zdolność zmiatania anionorodnika ponadtlenkowego (24). Otrzymane wyniki świadczyły o działaniu przeciwwolnorodnikowym blisko 11 razy słabszym od witaminy C (odpowiednio  $IC_{50}$  = 69,10 µg/ml oraz 6,42 µg/ml). Natomiast zdolność zmiatania anionu ponadtlenkowego była jedynie o ok. 46% niższa od działania witaminy C, uważanej za substancję o niezwykle silnym działaniu przeciwutleniającym (odpowiednio  $IC_{50}$  = 169,65 µg/ml oraz 115,61 µg/ml) (24).

Türkez i wsp. (25) w plazmie pozyskanej z hodowli komórek krwi określali całkowitą pojemność antyoksydacyjną (TAC) i całkowity status oksydacyjny (TOS). Stwierdzono, że wodny ekstrakt z pustułki pęcherzykowej (50 mg/l) powodował znaczący wzrost TAC, natomiast w wyższych stężeniach (1000 i 2000 mg/l) obserwowano spadek poziomu tego wskaźnika. Dla badanego ekstraktu TOS wzrastał wraz z testowanym stężeniem (250, 500, 1000 i 2000 mg/l) (25).

### Hamowanie aktywności enzymów

Badania wykazały, że obecny w plesze porostu *H. physodes* kwas fizodowy wykazuje zdolność blokowania integrazy HIV-1 – enzymu spełniającego ważną rolę w procesie uaktywniania replikacji wirusa HIV (26, 27). Ponadto kwas fizodowy hamuje aktywność elastazy trzustkowej oraz trypsyny. Stopień inhibicji enzymatycznej wynosił około 20% wobec elastazy (w stężeniu 100 µmol) i trypsyny (w stężeniu 500 µmol). Aktywność kwasu hydroksyfizodowego była wyższa. Poziom hamowania elastazy trzustkowej wynosił 74,3% przy stężeniu 100 µmol badanego związku. Wykazano ponadto, że hydroksylowa

pochodna kwasu fizodowego w stężeniu 500  $\mu\text{mol}$  obniżała działanie trypsyny o 29,7% (28).

#### **Wpływ na komórki układu odpornościowego**

Pavlovic i wsp. (9) prowadzili badania na komórkach układu odpornościowego wyizolowanych z *H. physodes* kwasów: fizodalowego, fizodowego, 3-hydroksyfizodowego oraz izofizodowego. Związki te poddano badaniu na szczurzych tymocytach. Oceniano wpływ wymienionych wyżej metabolitów wtórnych na proliferację, żywotność, produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) i potencjał błony mitochondrialnej (MMP) badanych komórek. Uzyskane wyniki wykazały, że najsilniej na komórki te działał kwas fizodalowy. Spadek proliferacji tymocytów obserwowano w stężeniach 1 i 10  $\mu\text{g}$  (kwas fizodalowy) lub 10  $\mu\text{g}$  (kwas fizodowy i 3-hydroksyfizodowy). Kwas izofizodowy powodował nieistotny statystycznie spadek proliferacji badanych komórek.

W celu oceny żywotności tymocytów przeprowadzono test z syntetycznym oktapeptydem CCK-8. Wzrost działania cytotoksycznego odnotowano dla różnych stężeń kwasu fizodalowego (1 i 10  $\mu\text{g}$ ). Kwasy fizodowy i 3-hydroksyfizodowy działały słabiej (10  $\mu\text{g}$ ). Kwas izofizodowy nie zmieniał żywotności tymocytów (9).

Badania wpływu substancji porostowych na produkcję reaktywnych form tlenu oraz potencjał błony mitochondrialnej wykazały, że w obu przypadkach kwas fizodalowy najsilniej zmieniał badane parametry (0,1; 1 i 10  $\mu\text{g}$ ), słabsze działanie wykazano dla kwasu fizodowego (10  $\mu\text{g}$ ). Dla pozostałych związków nie zaobserwowano istotnego statystycznie działania. W tym samym badaniu zauważono, że wzrost produkcji ROS powodował spadek potencjału MMP. Ekspozycja tymocytów na wzrastające stężenia kwasu 3-hydroksyfizodowego i izofizodowego nie wpływała na potencjał MMP (9).

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań stwierdzono, że toksyczny wpływ na badane komórki miał, obserwowany w przypadku poddania tymocytów działaniu kwasu fizodalowego i fizodowego, wzrastający poziom reaktywnych form tlenu i spadek mitochondrialnego potencjału błonowego (9).

#### **Działanie cytotoksyczne**

Wpływ metanolowego wyciągu z *H. physodes* na żywotność komórek nowotworu piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231 oraz wpływ tego ekstraktu na występowanie w komórkach zjawiska apoptozy oceniano w badaniach prowadzonych przez Ari i wsp. (29). Otrzymane wyniki wskazywały na właściwości cytotoksyczne ekstraktu wobec badanych linii komórkowych ( $\text{IC}_{50} = 50$  i 44  $\mu\text{g/ml}$ ; test MTT po 72 godz.

inkubacji). Zjawisko apoptozy badano, mierząc w komórkach poziom markera programowanej śmierci komórki – antygenu M30. Rezultaty wykazały, że ekstrakt metanolowy w stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$  po 72-godzinnej inkubacji wywoływał apoptozę komórek MCF-7, natomiast nie wpływał na komórki MDA-MB-231. Analiza z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego wykazała, że ekstrakt metanolowy spowodował fragmentację jądra w komórkach MCF-7, natomiast w komórkach MDA-MB-231 nie wywołał podobnych zmian, co świadczy o tym, że zjawisko apoptozy dotyczyło linii MCF-7. Rezultaty eksperymentu wskazują, że *H. physodes* może być źródłem substancji o właściwościach przeciwnowotworowych (29).

Kosanić i wsp. (30) badali wpływ acetonowego ekstraktu z *H. physodes* na komórki ludzkiego czerniaka (FemX) oraz ludzkiego nowotworu okrężnicy (LS 174). Otrzymane wyniki potwierdzały aktywność badanego ekstraktu, jednak w stężeniach wyższych niż cisplatyna, którą zastosowano jako substancję odniesienia.  $\text{IC}_{50}$  dla FemX wynosiła 43,45  $\mu\text{g/ml}$ , a dla LS 174 – 38,1  $\mu\text{g/ml}$ . Dla cisplatyny wartości te kształtowały się odpowiednio na poziomie 0,9 i 2,3  $\mu\text{g/ml}$ .

#### **Właściwości mutagenne i genotoksyczne**

Badania mutagennych właściwości kwasu fizodowego i fizodalowego prowadzono w latach 80.-90. XX wieku. Test Amesa przeprowadzono na dwóch szczepach *Salmonella typhimurium* (TA98 i TA100). Okazało się, że kwas fizodalowy wykazywał zależną od dawki mutagenność dla szczepu TA100 (31, 32).

Zbadano także właściwości genotoksyczne ekstraktu metanolowego z pustułki pęcherzykowej na komórkach limfocytów ludzkich, stosując test aberracji chromosomowych oraz test mikrojądrocy. Uzyskane wyniki dowiodły, że genotoksyczne działanie ekstraktu występowało przy relatywnie wysokich stężeniach (> 125  $\mu\text{g/ml}$ ), w porównaniu z jego aktywnością cytotoksyczną (29).

W innych badaniach prowadzonych z użyciem hodowli ludzkich limfocytów krwi obwodowej stwierdzono, że ekstrakt z pustułki pęcherzykowej w zastosowanych stężeniach (0-2000 mg/l) nie wykazywał działania, gdyż nie indukował istotnego statystycznie wzrostu liczby aberracji chromosomowych oraz ilości mikrojąder w badanych komórkach w porównaniu z próbą kontrolną (25).

#### **Pustułka pęcherzykowata jako biowskaźnik**

Pustułka pęcherzykowata jest często proponowana jako gatunek biotestowy w badaniach oceniających stan środowiska z wykorzystaniem porostów (3, 33, 34). Wynika to głównie z jej rozpowszechnienia i tym

samym dostępności, szybkiej reakcji na stres, łatwej identyfikacji zmian pojawiających się na jej plesze, umiarkowanej wrażliwości na  $\text{SO}_2$  i metale ciężkie, względnej tolerancji i wykazywanej dobrej zdolności do akumulacji zanieczyszczeń powietrza (4, 14, 33). Istnieje szereg metod badawczych stosowanych przy lichenoidyndacji, w których zaleca się prowadzenie obserwacji z wykorzystaniem *H. physodes* (33). Jedną z nich, zwaną metodą gatunków wskaźnikowych, wyróżnia omawiany porost jako wskaźnik wybranych stref porostowych o określonym stopniu zanieczyszczenia powietrza. W tym samym celu może być przeprowadzona analiza udziału form morfologicznych, w tym porostów o plesze listkowatej, do której to grupy należy również opisywany epifit (33). Metoda testu płytkowego (metoda transplantacji) pozwala określić stopień zamierania plech pustułki pęcherzykowatej przeniesionych ze stanowisk naturalnych na obszary znajdujące się pod znaczącym wpływem obiektów emitujących duże ilości zanieczyszczeń, tj. emitora punktowego (np. komin fabryczny, zakład przemysłowy) lub pasmowego (np. ruchliwa szosa) (4).

Piśmiennictwo zawiera wiele przykładów świadczących o dobrej zdolności do akumulacji zanieczyszczeń w plesze opisywanego porostu (12, 33, 35-37). Jednym z nich są analizy, w ramach których dokonano oceny zawartości mikroelementów (Pb, Ni, Cr, Cu, Zn, Fe) u *H. physodes* (33). Stwierdzono, że ich średnie stężenia były większe u transplantów eksponowanych w obrębie Białegostoku w porównaniu z próbą kontrolną na terenie Puszczy Knyszyńskiej. Ponadto niższe wartości uzyskiwano w pobliżu kompleksów leśnych niż terenów zabudowanych i otwartych. Szczególnie okres jesienny i zimowy zdaje się sprzyjać kumulacji zwiększonej ilości zanieczyszczeń, co jest związane z trwającym wówczas sezonem grzewczym oraz zwiększonym zużyciem i niepełnym spalaniem paliwa przez silniki pojazdów.

W ramach badań nad różnorodnością porostów nadrzewnych w zamierających lasach świerkowych porastających góry Harzu w Niemczech dowiedziono, iż stopień pokrycia plechami pni drzew przez pustułkę pęcherzykową zmniejszał się wraz ze wzrostem koncentracji wielu pierwiastków w korze (K, Fe, Cu) i w wodzie spływającej po pniu ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , S, K, Mg, Fe). Natomiast bezpośredni wpływ stwierdzono w odniesieniu do stężenia S w wodzie spływającej po pniu (38).

### Podsumowanie

*H. physodes* to występujący pospolicie gatunek porostu, wytwarzający metabolity wtórne o interesujących właściwościach biologicznych. Produkowane

przez tego grzyba związki chemiczne należą głównie do depsydów i depsydonów, z których w największej ilości w poroście występują kwasy: fizodowy i fizodalowy. Wyniki prowadzonych na przestrzeni ostatnich lat eksperymentów *in vitro* wykazały, że niestosowana dotychczas w lecznictwie pustułka pęcherzykowata wykazuje interesujące działanie biologiczne. Oprócz opisywanego od dawna w piśmiennictwie przeciwdrobnoustrojowego działania porostu wykazano, że aktywność przeciwutleniająca i cytotoksyczna ekstraktów otrzymanych z badanego grzyba była wysoka. Wyniki zaprezentowanych w pracy badań wskazują, że zarówno ekstrakty, jak i same związki izolowane z pustułki pęcherzykowatej mają potencjał leczniczy, jednak brak eksperymentów *in vivo* i prac klinicznych uniemożliwia ich zastosowanie w medycynie. Oprócz aspektu działania biologicznego istotną jest też możliwość wykorzystania *H. physodes* w bioindykacji i biomonitoringu, pozwalających na dokonanie oceny stanu środowiska, w tym zanieczyszczenia powietrza dwutlenkiem siarki czy metalami ciężkimi.

### Piśmiennictwo

1. Fałtynowicz W. The lichens, lichenicolous and allied fungi of Poland. An annotated checklist. Krytyczna lista porostów i grzybów naporostowych Polski. W Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków 2003.
2. Purvis OW, Coppins BJ, Hawksworth DL i wsp. (eds.). The lichen flora of Great Britain and Ireland. Natural History Publications, London 1992.
3. Fałtynowicz W. Porosty w lasach. Przewodnik terenowy dla leśników i taksatorów. Cent Inform Lasów Państw, Warszawa 2012.
4. Fałtynowicz W. Porosty jako bio wskaźniki zmian w środowisku Karkonoszy. Materiały edukacyjne Karkonoskiego Parku Narodowego. Karkonoski Park Narodowy, Jelenia Góra 2014.
5. Tobolewski Z. Porosty. Klucz do oznaczania gatunków krajowych. PWN, Warszawa 1972.
6. Culbertson CF. Chemical and botanical guide to lichen products. The University of North Carolina Press, Chapel Hill 1969.
7. Huneck S, Yoshimura I. Identification of lichen substances. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg 1996.
8. Solhaug KA, Lind M, Nybakken L i wsp. Possible functional roles of cortical depsides and medullary depsidones in the foliose lichen *Hypogymnia physodes*. Flora 2009; 204:40-8.
9. Pavlovic V, Stojanovic I, Jadranin M i wsp. Effect of four lichen acids isolated from *Hypogymnia physodes* on viability of rat thymocytes. Food Chem Toxicol 2013; 51:160-4.
10. Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V i wsp. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. Int J Mol Sci 2011; 12(8):5428-48.
11. Kosanić M, Ranković B, Vukojević J. Antioxidant properties of some lichen species. J Food Sci Technol 2011; 48(5):584-90.
12. Białońska D, Dayan FE. Chemistry of the lichen *Hypogymnia physodes* transplanted to an industrial region. J Chem Ecol 2005; 31:2975-91.
13. Hauck M, Böning J, Jacob M i wsp. Lichen substance concentrations in the lichen *Hypogymnia physodes* are correlated with heavy metal concentrations in the substratum. Environ Exper Bot 2013; 85:58-63.
14. Hauck M, Huneck S. Lichen substances affect metal adsorption in *Hypogymnia physodes*. J Chem Ecol 2007; 33:219-23.
15. Latkowska E, Chrapusta E, Bober B i wsp. Allelopathic effects of epiphytic lichen *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. colonization on the spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) bark. Allelopathy J 2015; 35(1):129-38.
16. Lat-



- kowska E, Bober B, Chrapusta E i wsp. Secondary metabolites of the lichens *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. and their presence in spruce (*Picea abies* (L.) H. Karst.) bark. *Phytochem* 2015; 118:116-23. **17.** Halama P, Van Haluwin Ch. Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. *BioControl* 2004; 49:95-107. **18.** Golapudi SR, Telikepalli H, Jampani HB i wsp. Alectosarmentin, a new antimicrobial dibenzofuranoid lactol from the lichen, *Alectoria sarmentosa*. *J Nat Prod* 1994; 57(7):934-8. **19.** Türk H, Yilmaz M, Tay T i wsp. Antimicrobial activity of extracts of chemical races of the lichen *Pseudevernia furfuracea* and their physodic acid, chloroatranorin, atranorin and olivetoric acid constituents. *Z Naturforsch [C]* 2006; 61c:499-507. **20.** Ranković B, Mišić M, Sukdolak S. The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipola*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*. *World J Microbiol Biotechnol* 2008; 24:1239-42. **21.** Yilmaz M, Tay T, Kivanç M i wsp. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Hypogymnia tubulosa* and its 3-hydroxyphysodic acid constituent. *Z Naturforsch [C]* 2005; 60(1-2):35-8. **22.** Ahmadjian V, Hale ME (eds.). *The Lichens*. Academic Press. New York, San Francisco, London 1973. **23.** Stojanović G, Stojanović I, Stankov-Jovanović V i wsp. Reducing power and radical scavenging activity of four *Parmeliaceae* species. *Centr Eur J Biol* 2010; 5(6):808-13. **24.** Ranković B, Kosanić M, Manojlović N i wsp. Chemical composition of *Hypogymnia physodes* lichen and biological activities of some its major metabolites. *Med Chem Res* 2014; 23(1):408-16. **25.** Türkez H, Aydin E, Aslan A. Effects of lichenic extracts (*Hypogymnia physodes*, *Ramalina polymorpha* and *Usnea florida*) on human blood cells: cytogenetic and biochemical study. *Iran J Pharm Res* 2012; 11(3):889-96. **26.** Müller K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001; 56:9-16. **27.** Neamati N, Hong H, Mazumder A i wsp. Depsides and depsidones as inhibitors of HIV-1 integrase: Discovery of Novel Inhibitors through 3D Database Searching. *J Med Chem* 1997; 40:942-51. **28.** Proksa B, Adamcová J, Sturdíková M i wsp. Metabolites of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. and their inhibition potential of proteolytic enzymes. *Pharmazie* 1994; 49(4):282-3. **29.** Ari F, Celikler S, Oran S i wsp. Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. on breast cancer cells. *Environ Toxicol* 2014; 29(7):804-13. **30.** Kosanić M, Ranković B, Stanojković T. Investigation of selected Serbian lichens for antioxidant, antimicrobial and anticancer properties. *JAPS* 2013; 23(6):1628-33. **31.** Shibamoto T, Wei CI. Mutagenicity of lichen constituents. *Environ Mutagen* 1984; 6(5):757-62. **32.** Osawa T, Kumon H, Reece CA i wsp. Inhibitory effect of lichen constituents on mutagenicity induced by heterocyclic amines. *Environ Mol Mutagen* 1991; 18(1):35-40. **33.** Matwiejuk A. Porosty Białegostoku jako wskaźniki zanieczyszczenia atmosfery. T. II. *Wyd Ekonomia i Środowisko, Białystok* 2007. **34.** Józwiak MA, Józwiak M, Szwed M. Metody transplantacji porostów stosowane w biomonitoringu powietrza atmosferycznego. *NEM* 2010; 11:15-23. **35.** Józwiak M. Kumulacja metali ciężkich i zmiany morfologiczne w plechach porostu *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. *NEM* 2007; 8:51-6. **36.** Józwiak MA, Józwiak M. Influence of cement industry on accumulation of heavy metals in bioindicators. *Ecol Chem Eng S* 2009; 16(3):323-34. **37.** Kłos A. Porosty w biomonitoringu środowiska. *Uniwersytet Opolski, Studia i Monografie nr 420, Opole* 2009. **38.** Hauck M, Runge M. Stemflow chemistry and epiphytic lichen diversity in dieback-affected spruce forest of the Harz Mountains, Germany. *Flora* 2002; 197:250-61.

**Konflikt interesów****Conflict of interest**

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 22.02.2016

zaakceptowano/accepted: 16.05.2016

Adres/address:

\*dr n. farm. Elżbieta Studzińska-Sroka

Katedra i Zakład Farmakognozji

Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

ul. Święcickiego 4, 60-781 Poznań

tel.: +48 (61) 854-67-09, fax: +48 (61) 854-67-01

e-mail: ela\_studzinska@op.pl