

UNIVERZITET U BEOGRADU  
HEMIJSKI FAKULTET



Ivana V. Sofrenić

Izolovanje, identifikacija i citotoksična aktivnost sekundarnih metabolita plodonosnih tela *Fomitopsis betulina* i primena HR MAS NMR spektroskopske tehnike u određivanju metaboličkog profila

Doktorska disertacija

Beograd, 2021.



UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF CHEMISTRY



Ivana V. Sofrenić

Isolation, identification and cytotoxic activity of  
secondary metabolites from fruiting bodies of  
*Fomitopsis betulina* and application of HR MAS NMR  
spectroscopic technique in determination of  
metabolic profile

Doctoral dissertation

Belgrade, 2021.



Mentori:

---

dr Ljubodrag Vujisić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

---

dr Miroslav Novaković, viši naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu - Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Članovi komisije:

---

dr Vele Tešević, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

---

dr Nina Todorović, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu - Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

---

dr Aleksandar Knežević, naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet



## Zahvalnica

Mentorima prof. dr Ljubodragu Vujisiću i dr Miroslavu Novakoviću se zahvaljujem na nesebičnoj pomoći, ukazanom poverenju i na korisnim savetima koji su mi pomogli da postanem bolji čovek i naučnik.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Veletu Teševiću. Hvala Vam na svakom savetu, podršci i što ste me naučili da za svaki problem postoji rešenje. Hvala što se na poslu osećam kao kod kuće.

Posebno se zahvaljujem članovima Komisije dr Nini Todorović i dr Aleksandru Kneževiću na pomoći tokom izrade i pisanja disertacije.

Izuzetnu zahvalnost dugujem akademiku prof. dr Slobodanu Milosavljeviću, na pruženom znanju, savetima i velikoj pomoći kako bi ova disertacija bila što kvalitetnija.

Zahvaljujem se dr Dejanu Gođevcu na velikoj pomoći i savetima pri izradi disertacije.

Kolegama iz Centra za instrumentalnu analizu prof. dr Vlatki Vajs, Dejanu Vučetiću, Marini Todosijević, dr Ivani Aljančić, dr Milki Jadranin, dr Snežani Trifunović i dr Borisu Mandiću se zahvaljujem na saradnji i prijatnoj atmosferi u kojoj je ova disertacija nastala.

Mojim saborcima dr Jovani Stanković Jeremić, dr Gordani Krstić i dr Mirjani Cvetković se zahvaljujem na lepom druženju u našoj lab. 311.

Mojim prijateljima i kolegama prof. dr Iris Đorđević, Katarini Simić, Jovani Ljujić i Stefanu Ivanoviću se zahvaljujem na svim nezaboravnim trenucima, puno smeha i lepoj atmosferi za rad. Srećna sam što ste moji prijatelji.

Posebnu zahvalnost dugujem kolegama iz NMR laboratorije Instituta za organsku hemiju sa centrom za fitohemiju, Bugarske akademije nauka u Sofiji, a pre svih prof. dr Pavleti Šestakovoj, prof. dr Svetlani Simovoj i dr Javoru Mitrevom.

Zahvaljujem se Dragani Stojkov na svemu. Gago, hvala što si uvek bila tu, radovala se svakom mom uspehu i bila mi oslonac u teškim trenucima. Tanji Krsmanović se zahvaljujem na dugogodišnjem prijateljstvu i podršci. Tanjac, hvala ti na lepim uspomenama.

Zahvaljujem se porodici Blank na podršci i svemu što su mi omogućili. Veliku zahvalnost dugujem porodicama Vučković i Tot.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici, mami Gordani i tati Vladimiru, bratu Luki, sestri Adriani, zetu Nevenu i sestriću Nikoli. Hvala na velikoj podršci i bezgraničnoj ljubavi koju ste mi pružili. Bez vas ovo ne bi bilo moguće. Bobanu hvala što me podržava, veruje u mene i čini da je sve moguće.

Mama i tata, ovu doktorsku disertaciju posvećujem vama. Uspeli smo!

**Autor**



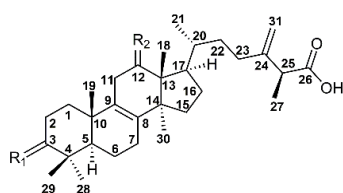


# Izolovanje, identifikacija i citotoksična aktivnost sekundarnih metabolita plodonosnih tela *Fomitopsis betulina* i primena HR MAS NMR spektroskopske tehnike u određivanju metaboličkog profila

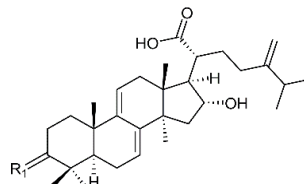
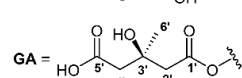
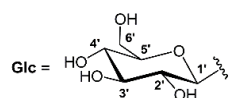
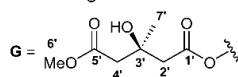
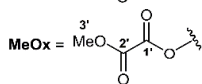
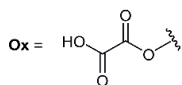
## SAŽETAK

Predmet proučavanja ove doktorske disertacije je medicinska gljiva *Fomitopsis betulina* poznata kao brezova guba ili brezov trud. Osnovni cilj ove disertacije je bio izolovanje bioaktivnih jedinjenja triterpenskog tipa i ispitivanje citotoksičnosti na ćelijskim linijama akutne promijelocitne leukemije (HL-60) i adenokarcinoma pluća (A549), kao i DNK protektivne aktivnosti na humanim limfocitima periferne krvi. Drugi deo disertacije odnosio se na kultivaciju plodonosnih tela u laboratorijskim uslovima i dobijanje metabolomičkih modela primenom rezultata FTIR i HR MAS NMR spektroskopskih tehnika za praćenje promena u hemijskom sastavu.

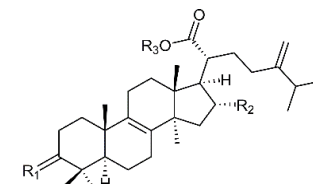
U okviru ove disertacije iz plodonosnih tela nekultivisane nativne gljive izolovano je i okarakterisano 31 jedinjenje triterpenskog tipa, od toga 13 jedinjenja (19-31) je po prvi put opisano u literaturi.



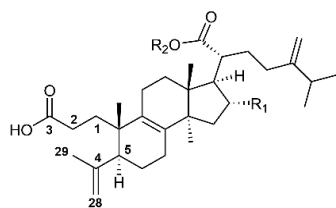
1. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -G,  $\beta$ -H; R<sub>2</sub> = O
2. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -GA,  $\beta$ -H; R<sub>2</sub> =  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H
3. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -G,  $\beta$ -H; R<sub>2</sub> =  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H
4. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H; R<sub>2</sub> =  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H
19. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -Ox,  $\beta$ -H; R<sub>2</sub> =  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H
20. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -MeOx,  $\beta$ -H; R<sub>2</sub> =  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H
21. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> =  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H
22. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H; R<sub>2</sub> = O



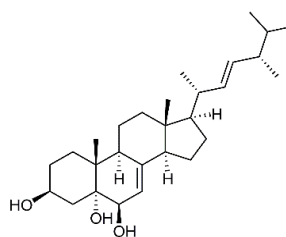
5. R<sub>1</sub> =  $\beta$ -OAc,  $\alpha$ -H
6. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -OAc,  $\beta$ -H
7. R<sub>1</sub> =  $\beta$ -OH,  $\alpha$ -H
8. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H
9. R<sub>1</sub> = O



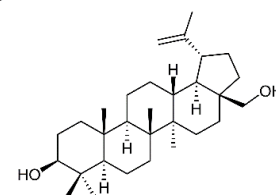
10. R<sub>1</sub> =  $\beta$ -OAc,  $\alpha$ -H; R<sub>2</sub> = OH,  $\beta$ -H; R<sub>3</sub> = H
11. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -OAc,  $\beta$ -H; R<sub>2</sub> = OH,  $\beta$ -H; R<sub>3</sub> = H
12. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub> = H
13. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> = OH,  $\beta$ -H; R<sub>3</sub> = H
14. R<sub>1</sub> =  $\beta$ -OH,  $\alpha$ -H; R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub> = Glc
27. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub> = Glc
28. R<sub>1</sub> =  $\beta$ -OAc,  $\alpha$ -H; R<sub>2</sub> = OH; R<sub>3</sub> = Glc
29. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -G,  $\beta$ -H; R<sub>2</sub> = OH; R<sub>3</sub> = Glc



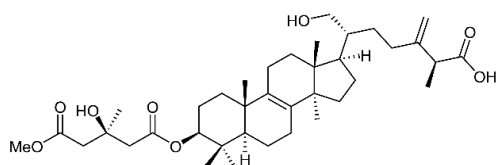
15. R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = H
16. R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = H
31. R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = Glc



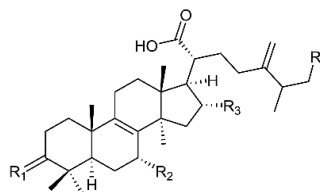
17



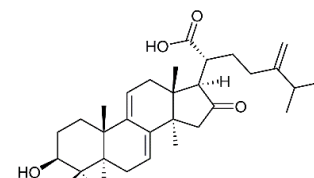
18



23



24. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH; R<sub>4</sub> = H
25. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> = OMe; R<sub>3</sub> = OH; R<sub>4</sub> = H
26. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = OH



30

Citotoksičnost i selektivnost su ispitane za jedinjenja 1-11 i 13-31, a DNK protektivna aktivnost za jedinjenja 3-6, 9-12, 16, 18, 20 i 21. Jedinjenja 3, 5, 7, 10, 14, 27 i 29, pokazala su značajnu citotoksičnu aktivnost prema ćelijskim linijama HL-60. Sva testirana jedinjenja (3-6, 9-12, 16, 18, 20 i 21) su pokazala visok stepen zaštite DNK i dovela do smanjenja broja mikronukleusa u

binuklernim ćeijama. Uočena je zavisnost od doze, veza strukture i aktivnosti i predložen je mehanizam delovanja.

Plodonosna tela, kultivisana na piljevini stabla breze, ruja i crne jove i unutrašnjoj ljusci pečenog lešnika, bila su predmet FTIR i HR MAS NMR metabolomičkih studija. Praćene su promene hemijskog sastava u procesu sazrevanja, kao i gajenja na različitim supstratima. OPLS-DA modelima određena je faza sazrevanja plodonosnih tela i definisane su promenljive karakteristične za stadijume razvoja i gajenje na alternativnim supstratima.

**Ključne reći:** medicinska gljiva, *Fomitopsis betulina*, triterpenske kiseline, HR MAS NMR, citotoksićna aktivnost, DNK protektivna aktivnost, plodonosna tela, kultivacija, metabolomika, metabolićki profil

**Naućna oblast:** Hemija

**Uža naućna oblast:** Organska hemija

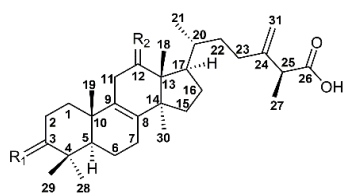
**UDK broj:** 547

# Isolation, identification and cytotoxic activity of secondary metabolites from fruiting bodies of *Fomitopsis betulina* and application of HR MAS NMR spectroscopic technique in determination of metabolic profile

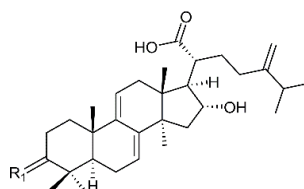
## ABSTRACT

The main goal of this dissertation was to isolate and characterize bioactive triterpene compounds from the medicinal mushroom *Fomitopsis betulina* and to investigate their cytotoxic activity against HL-60 leukemia and A549 lung cancer cell lines and DNA protective activity on peripheral human lymphocytes. Another aim was to employ FTIR and HR MAS NMR spectroscopic techniques in combination with metabolomics models to monitor changes in chemical composition.

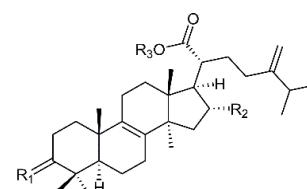
Within this dissertation, 31 triterpene type compounds were isolated and characterized from native fruiting bodies collected, while 13 (19-31) compounds were described in the literature for the first time.



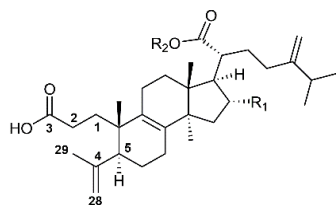
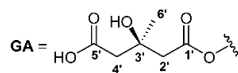
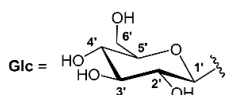
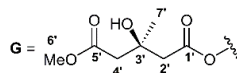
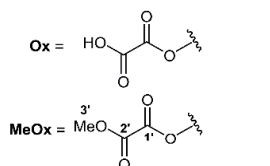
1. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -G,  $\beta$ -H; R<sub>2</sub> = O
2. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -GA,  $\beta$ -H; R<sub>2</sub> =  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H
3. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -G,  $\beta$ -H; R<sub>2</sub> =  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H
4. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H; R<sub>2</sub> =  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H
19. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -Ox,  $\beta$ -H; R<sub>2</sub> =  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H
20. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -MeOx,  $\beta$ -H; R<sub>2</sub> =  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H
21. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> =  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H
22. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H; R<sub>2</sub> = O



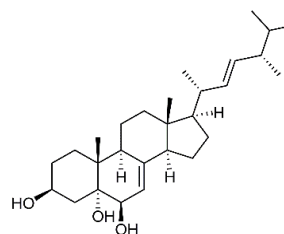
5. R<sub>1</sub> =  $\beta$ -OAc,  $\alpha$ -H
6. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -OAc,  $\beta$ -H
7. R<sub>1</sub> =  $\beta$ -OH,  $\alpha$ -H
8. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H
9. R<sub>1</sub> = O



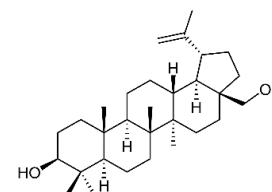
10. R<sub>1</sub> =  $\beta$ -OAc,  $\alpha$ -H; R<sub>2</sub> = OH,  $\beta$ -H; R<sub>3</sub> = H
11. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -OAc,  $\beta$ -H; R<sub>2</sub> = OH,  $\beta$ -H; R<sub>3</sub> = H
12. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub> = H
13. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> = OH,  $\beta$ -H; R<sub>3</sub> = H
14. R<sub>1</sub> =  $\beta$ -OH,  $\alpha$ -H; R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub> = Glc
27. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub> = Glc
28. R<sub>1</sub> =  $\beta$ -OAc,  $\alpha$ -H; R<sub>2</sub> = OH; R<sub>3</sub> = Glc
29. R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -G,  $\beta$ -H; R<sub>2</sub> = OH; R<sub>3</sub> = Glc



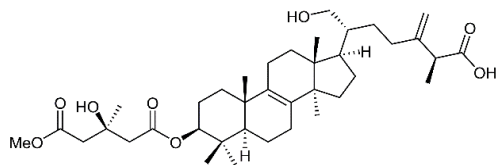
15. R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = H
16. R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = H
31. R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = Glc



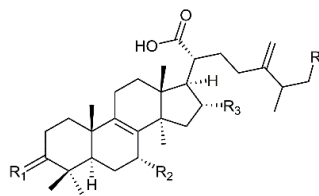
17



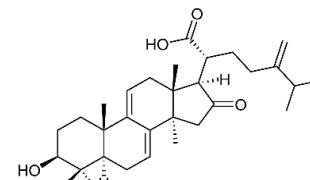
18



23



24. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH; R<sub>4</sub> = H
25. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> = OMe; R<sub>3</sub> = OH; R<sub>4</sub> = H
26. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = OH



30

The isolated compounds were tested for cytotoxic activity and DNA protective activity. Cytotoxicity and selectivity were tested for isolated compounds 1-11 and 13-31, and DNA protective activity for compounds 3-6, 9-12, 16, 18, 20 and 21. Compounds 3, 5, 7, 10, 14, 27 and 29 showed significant cytotoxic activity towards HL-60 cell lines. All tested compounds (3-6, 9-12, 16, 18, 20 and 21) showed a high degree of DNA protection and led to a decrease in the number of micronuclei in binuclear cells. Dose dependence and structure activity relationship revealed and mechanism of their action was proposed.

Fruiting bodies cultivated on substrates made of sawdust from birch, *Cotinus coggygria* and black alder and the inner shell of hazelnuts were subject of FTIR and HR MAS NMR metabolomics studies. Changes in chemical composition during maturing and effect of cultivation media were obtained. It has been shown that obtained OPLS-DA models can define maturing stage of fruiting bodies and determining variables characteristic for alternative cultivation media.

**Key words:** medicinal mushroom, *Fomitopsis betulina*, triterpenoid acids, HR MAS NMR, cytotoxic activity, DNA protective activity, fruiting bodies, cultivation, metabolomics, metabolic profiling

**Scientific field:** Chemistry

**Scientific subfield:** Organic Chemistry

**UDC number:** 547

## Sadržaj

|   |    |
|---|----|
| UVOD .....  | 1  |
| 1. OPŠTI DEO .....  | 2  |
| 1.1 Carstvo gljiva .....  | 2  |
| 1.2 Životni ciklus Basidiomycota .....  | 3  |
| 1.3 Red Polyporales .....   | 4  |
| 1.4 Uloga gljiva u tradicionalnoj medicini .....  | 5  |
| 1.5 Fomitopsis betulina (Bull.) B.K. Cui, M.L. Han & Y.C. ....  | 5  |
| 1.6 Primarni metaboliti gljiva i njihova biološka aktivnost .....   | 7  |
| 1.7 Sekundarni metaboliti gljiva i njihova biološka aktivnost .....   | 7  |
| 1.8 Primena HR MAS NMR spektroskopije u metabolomici .....  | 22 |
| 1.8.1. Najznačajnije HR MAS NMR pulsne sekvence u metabolomici .....  | 23 |
| 1.8.2. Odabrane HR MAS NMR metabolomičke studije .....  | 24 |
| 2. NAŠI RADOVI .....  | 28 |
| 2.1. Identifikacija materijala .....  | 30 |
| 2.2. Izolovana jedinjenja triterpenskog tipa .....  | 30 |
| 2.3. Određivanje strukture jedinjenja triterpenskog tipa .....  | 30 |
| 2.3.1. Određivanje strukture 3 $\alpha$ -(3'-hidroksi-4'-metoksikarbonil-3'-metilbutiriloksi)-12-okso-24-metilen-26-lanost-8-enske kiseline – palustriske kiseline F (1) .....  | 30 |
| 2.3.2. Određivanje strukture 3 $\alpha$ -(4-karboksi-3-hidroksi-3-metil-1-oksobutoksi)-12 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-26-lanost-8-enske kiseline (2) .....                    | 31 |
| 2.3.3. Određivanje strukture 3 $\alpha$ -(3'-hidroksi-4'-metoksikarbonil-3'-metilbutiriloksi)-12 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-26-lanost-8-enske kiseline (3) .....             | 33 |
| 2.3.4. Određivanje strukture 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-24-metilen-26-lanost-8-enske kiseline – poliporenske kiseline A (4) .....                                      | 35 |
| 2.3.5. Određivanje strukture 3 $\beta$ -(acetiloksi)-16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-24-lanost-7,9(11)-dienske kiseline – dehidropahiminske kiseline (5) .....                 | 36 |
| 2.3.6. Određivanje strukture 3 $\alpha$ -(acetiloksi)-16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-21-lanost-7,9(11)-dienske kiseline – 3- <i>epi</i> -dehidropahiminske kiseline (6) ..... | 37 |
| 2.3.7. Određivanje strukture 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroksi-24-metilen-21-lanost-7,9(11)-dienske kiseline – dehidrotumulozinske kiseline (7) .....                          | 40 |
| 2.3.8. Određivanje strukture 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -dihidroksi-24-metilen-21-lanost-7,9(11)-dienske kiseline – 3- <i>epi</i> -dehidrotumulozinske kiseline (8) .....          | 42 |
| 2.3.9. Određivanje strukture 16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-7,9(11)-dienske kiseline – poliporenske kiseline C (9) .....                                     | 43 |
| 2.3.10. Određivanje strukture 3 $\beta$ -(acetiloksi)-16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-21-lanost-8-enske kiseline – pahiminske kiseline (10) .....                              | 45 |
| 2.3.11. Određivanje strukture 3 $\alpha$ -(acetiloksi)-16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-21-lanost-8-enske kiseline – 3- <i>epi</i> -pahiminske kiseline (11) .....              | 46 |
| 2.3.12. Određivanje strukture 12 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-8-enske kiseline – fomeficinske kiseline A (12) .....   | 48 |

|  |     |
|--|-----|
| 2.3.13. Određivanje strukture 16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-8-enske kiseline – 16 $\alpha$ -hidroksieburikonske kiseline (13).....   | 50  |
| 2.3.14. Određivanje strukture $\beta$ -D-glukopiranozil estra 3 $\beta$ -hidroksi-24-metilen-21-lanost-8-enske kiseline – fomitozida J (14).....   | 52  |
| 2.3.15. Određivanje strukture 3,4- <i>seco</i> -16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-3,21-lanost-8-enske dikiseline – porikoinske kiseline H (15).....   | 53  |
| 2.3.16. Određivanje strukture 3,4- <i>seco</i> -24-metilen-3,21-lanost-8-enske dikiseline – piptolinske kiseline B (16).....   | 55  |
| 2.3.17. Određivanje strukture ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triola – cerevisterola (17).....   | 56  |
| 2.3.18. Određivanje strukture lup-20(29)-en-3 $\beta$ ,28-diola – betulina (18).....   | 58  |
| 2.3.19. Određivanje strukture 12 $\alpha$ -hidroksi-3 $\alpha$ -oksaliloksi-24-metilen-26-lanost-8-enske kiseline – poliporenske kiseline E (19).....  | 60  |
| 2.3.20. Određivanje strukture 12 $\alpha$ -hidroksi-3 $\alpha$ -(2'-O-metil-oksaliloksi)-24-metilen-26-lanost-8-enske kiseline – poliporenske kiseline F (20).....                                       | 64  |
| 2.3.21. Određivanje strukture 12 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-3-okso-26-lanost-8-enske kiseline – poliporenske kiseline G (21).....   | 70  |
| 2.3.22. Određivanje strukture 3 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-12-okso-26-lanost-8-enske kiseline – poliporenske kiseline H (22).....   | 75  |
| 2.3.23. Određivanje strukture 21-hidroksi-3 $\alpha$ -(5'-O-metil-3'-hidroksi-3'-metilglutariloksi)-24-metilen-26-lanost-8-enske kiseline – poliporenske kiseline I (23) ....                            | 79  |
| 2.3.24. Određivanje strukture 7 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -dihidroksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-8-enske kiseline – poliporenske kiseline J (24).....   | 83  |
| 2.3.25. Određivanje strukture 16 $\alpha$ -hidroksi-7 $\alpha$ -metoksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-8-enske kiseline – poliporenske kiseline K (25).....   | 88  |
| 2.3.26. Određivanje strukture 16 $\alpha$ -26-dihidroksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-8-enske kiseline – poliporenske kiseline L (26).....  | 92  |
| 2.3.27. Određivanje strukture 21-O- $\beta$ -D-glukopiranozida 24-metilen-3-okso-21-lanost-8-enske kiseline – fomitozida L (27).....   | 96  |
| 2.3.28. Određivanje strukture 21-O- $\beta$ -D-glukopiranozida 3 $\beta$ -acetoksi-16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-21-lanost-8-enske kiseline – fomitozida M (28).....                                  | 101 |
| 2.3.29. Određivanje strukture 21-O- $\beta$ -D-glukopiranozida 16 $\alpha$ -hidroksi-3 $\alpha$ -(5'-O-metil-3'-hidroksi-3'-metilglutariloksi)-24-metilen-21-lanost-8-enske kiseline – fomitozida N (29) | 106 |
| 2.3.30. Određivanje strukture 3 $\beta$ -hidroksi-24-metilen-16-okso-21-lanost-7,9(11)-dienske kiseline – poliporenske kiseline M (30).....  | 110 |
| 2.3.31. Određivanje strukture 21-O- $\beta$ -D-glukopiranozida 3,4- <i>seco</i> -24-metilen-3,21-lanost-4(28),8-dienske dikiseline – fomitozida O (31).....  | 115 |
| 2.4. Biološke aktivnosti izolovanih jedinjenja.....  | 122 |
| 2.4.1. Citotoksična aktivnost na ćelijama akutne promijelocitne leukemije.....   | 122 |
| 2.4.2. Citotoksična aktivnost na ćelijama adenokarcinoma pluća A549.....   | 124 |
| 2.4.3. Određivanje DNK protektivne aktivnosti na humanim limfocitima.....  | 124 |
| 2.5. Kultivacija (gajenje) plodonosnih tela na različitim podlogama.....   | 126 |
| 2.6. Metabolički profil kultivisanih plodonosnih tela <i>F. betulina</i> .....   | 128 |

|   |            |
|---|------------|
| 2.6.1. Promena metaboličkih profila usled sazrevanja i gajenja plodonosnih tela na različitim podlogama ..... | 132        |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DEO .....</b>   | <b>146</b> |
| 3.1. Instrumenti i rastvarači .....   | 146        |
| 3.2. Fungalni materijal.....  | 147        |
| 3.2.1. Plodonosna tela <i>F. betulina</i> iz prirode.....   | 147        |
| 3.2.2. Gajenje (kultivacija) plodonosnih tela <i>F. betulina</i> na različitim podlogama .....                | 148        |
| 3.3. Priprema ekstrakata i izolovanje čistih jedinjenja .....   | 149        |
| 3.3.1. Ekstrakcija plodonosnih tela <i>F. betulina</i> .....  | 149        |
| 3.3.2. Frakcionisanje ekstrakta hromatografijom na koloni .....   | 149        |
| 3.3.3. Preparativna tankoslojna hromatografija (TLC).....   | 151        |
| 3.3.4. Semipreparativna visokoefikasna tečna hromatografija .....   | 152        |
| 3.3.5. Kisela hidroliza triterpenskkih glikozida.....   | 152        |
| 3.3.6. Spektroskopski podaci za nova jedinjenja.....  | 153        |
| 3.4. Biološki testovi .....   | 155        |
| 3.4.1. Citotoksična aktivnost .....   | 155        |
| 3.4.2. DNK protektivna aktivnost.....   | 155        |
| 3.5. Metabolomička analiza plodonosnih tela <i>F. betulina</i> .....  | 156        |
| <b>4. ZAKLJUČAK .....</b>   | <b>157</b> |
| Literatura.....   | 159        |
| <b>BIOGRAFIJA.....</b>  | <b>167</b> |

## Spisak simbola i skraćenica

TLC – (Thin Layer Chromatography) tankoslojna hromatografija  
UV/VIS– (Ultraviolet and Visible Spectroscopy) ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija  
DAD – Diode Array Detection  
IR – (Infrared Spectroscopy) infracrvena spektroskopija  
 $^1\text{H}$  NMR – ( $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)  $^1\text{H}$  nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija  
 $^{13}\text{C}$  NMR – ( $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)  $^{13}\text{C}$  nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija  
HSQC – Heteronuclear Single Quantum Coherence  
HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Coherence  
NOESY – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy  
COSY – Correlated Spectroscopy  
TOCSY – Total Correlated Spectroscopy  
EI – (Electron Ionization) elektronska jonizacija  
HPLC – (High Performance Liquid Chromatography) visokoefikasna tečna hromatografija  
HR-ESI-MS – (High Resolution Electron Spray Ionization Mass) elektrosprej masena spektrometrija visoke rezolucije  
 $\delta_{\text{H}}$  – hemijsko pomerenje u  $^1\text{H}$  NMR spektru  
 $\delta_{\text{C}}$  – hemijsko pomerenje u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru  
 $[\text{M}+\text{H}]^+$  – protonovani molekularni jon  
 $[\text{M}-\text{H}]^-$  – deprotonovani molekularni jon dobijen odlaskom atoma vodonika  
 $J_{\text{x,y}}$  – konstanta sprezanja protona X sa protonom Y (u Hz)  
 $[\alpha]_{\text{D}}$  – specifična rotacija  
 $\Delta$  – položaj dvostruke veze  
Ox – oksalatna grupa  
MeOx – metiloksalatna grupa  
Glc – glukopiranozil grupa  
 $\text{CD}_3\text{OD}$  – deuterisani metanol  
 $\text{CDCl}_3$  – deuterisani hloroform  
TMS – tetrametilsilan  
TSP- $d_4$  – natirjumova so 3-trimetilsilil propanske kiseline-2,2,3,3- $d_4$   
BN – binuklearne ćelije  
MN – mikronukleus  
CBPI – (Cytokinesis Block Proliferation Index) proliferacioni indeks blokirane citokineze  
MMC – mitomicin C  
CC – (column chromatography) gravitaciona hromatografija na koloni  
A549 – ćelijska linija adenokarcinoma pluća  
HL-60 – ćelijska linija promijelocitne leukemije  
MRC-5 – (Medical Research Council cell strain 5) ćelijska linija plućnih fibroblasta fetusa  
MIK – Minimalna inhibitorna koncentracija  
SI – indeks selektivnosti  
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina  
DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil  
AAPH – 2,2-azo-bis-(2-amidinopropan)-dihidrohlorid  
HR MAS NMR – (High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija visoke rezolucije sa rotacijom pod magičnim uglom  
PCA – analiza glavnih komponenti  
OPLS-DA – diskriminativna analiza ortogonalne parcijalne regresije najmanjih kvadrata skrivenih struktura  
CV – krosvalidacija



VIP – (eng. Variable influence on projection) uticaj promenljive na predikciju  
SUS – (eng. Shared and Unique Structures) jedinstvene i zajedničke strukture

## UVOD

Cilj ovog istraživanja bio je izolovanje sekundarnih metabolita triterpenskog tipa medicinske gljive *Fomitopsis betulina* iz prirode i određivanje njihove citotoksične i DNK protektivne aktivnosti. U drugom delu istraživanja je *F. betulina* gajena u eksperimentalnim uslovima na podlogama na kojima se ne može naći u prirodi (na otpadu prehrambene i drvne industrije), praćene su promene u hemijskom sastavu plodonosnih tela tokom procesa sazrevanja i gajenja na različitim podlogama primenom metabolomičkih modela dobijenih na osnovu rezultata FTIR i HR MAS NMR spektroskopskih tehnika i OPLS-DA metodama multivarijantne analize.

U poglavlju **Opšti deo** dat je kraći osvrt na carstvo gljiva, njihove osnovne karakteristike, životni ciklus, klasifikaciju i istorijski značaj za čoveka. Opisani su neki od najznačajnijih predstavnika polipora i tabelarno su prikazana do sada izolovana jedinjenja triterpenskog tipa iz četiri evropske polipore: *F. officinalis*, *F. pinicola*, *F. betulina* i *F. palustris*. U nastavku ovog poglavlja prikazana je primena HR MAS NMR spektroskopije u metabolomici, kao i osvrt na odabrane studije koje su se bavile ovom tematikom do sada.

U poglavlju **Naši radovi** opisan je postupak prikupljanja, pripreme i identifikacije plodonosnih tela kao i prikaz izolovanih jedinjenja triterpenskog tipa i njihova karakterizacija. U ovom poglavlju su prikazani rezultati bioloških testova izolovanih jedinjenja i veza između njihove strukture i aktivnosti. Na kraju poglavlja dat je osvrt na gajenje plodonosnih tela i njihovu pripremu za metabolomičke studije kao i rezultati tih studija.

**Eksperimentalni deo** obuhvata detaljne informacije o korišćenim aparatima i rastvaračima, postupak gajenja, poreklu korišćenog biološkog materijala, postupke ekstrakcije i prečišćavanja, načinu pripreme uzoraka za pojedinačne analize, kao i primenjenim statističkim metodama i biološkim testovima. U ovom poglavlju dati su parametri snimanja za svaku od primenjenih instrumentalnih tehnika.

U **Zaključku** su prikazana najvažnija dostignuća iz ovog rada.

U poglavlju **Literatura** nalazi se ukupno 139 referenci navedenih na osnovu redosleda pojavljivanja u tekstu.

# 1. OPŠTI DEO

## 1.1 Carstvo gljiva

Gljive su heterotrofni, jednoćelijski ili višećelijski eukariotski organizmi, svrstani u zasebno carstvo živog sveta (Fungi). Do sada je opisano oko 120.000 vrsta a procene su da ih može biti između 2,2 i 3,8 miliona.<sup>1</sup> Veliki broj vrsta još uvek nije opisan, a procene o njihovom stvarnom broju, bazirane su na osnovu odnosa broja vrsta biljaka i gljiva na određenom staništu. Imaju veliku ekološku raznovrsnost, široko su rasprostranjeni organizmi, sposobni da kolonizuju različite supstrate, često u ekstremnim uslovima za život. Mogu se naći na najrazličitijim staništima od pustinja, slatina i u oblastima sa visokom radijacijom, do sedimenata u dubinama mora.<sup>2</sup> Osim osobina koje su zajedničke za sve eukariote, gljive odlikuje i niz posebnosti, zbog čega su svrstane u zasebno carstvo. Sve gljive imaju ćelijski zid izgrađen od hitina ( $\beta$ -1,4-vezanih jedinica N-acetilglukozamina), glavnog gradivnog elementa egzoskeleta zglavkara,  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukana, koji su neizostavni konstituenti ćelijskog zida biljaka.<sup>3</sup> Ovo je jedini primer u živom svetu da se ove dve polimerne komponente sreću zajedno. Razlikuju se dva tipa ćelijske organizacije kod gljiva: hife (kod filamentoznih vrsta) i ćelije (kod kvasaca). Hife ili filamenta su cevaste strukture koje obavija ćelijski zid, karakterišu se apikalnim rastom, granaju se u svim pravcima i formiraju miceliju. Gljive nikada ne formiraju tkiva, ali kod nekih dolazi do modifikacije micelije u strukture za obavljanje specifičnih funkcija. Pored modifikacija micelije, pojedine vrste gljiva mogu da formiraju strukture u vidu hifalnih agregata kao što su strome, sklerocije i plodonosna tela. Plodonosna tela mogu biti mikroskopska i makroskopska i u njima se formiraju polne i bespolne spore koje služe za razmnožavanje. Pored toga, gljive mogu da se razmnožavaju i fragmentacijom micelije, što je analogno vegetativnom razmnožavanju biljaka.<sup>4</sup> Gljive ne sadrže hlorofil i nemaju sposobnost stvaranja organskih materija od neorganskih u procesu fotosinteze, kao što je to slučaj sa zelenim biljkama i nekim vrstama fotosintetskih bakterija. Takođe, ne mogu se hraniti ingestijom. Odlikuje ih apsorpcioni način ishrane koji se zasniva na produkciji i ekskreciji ekstracelularnih enzima koji razlažu složene organske molekule (proteine, polisaharide i nukleinske kiseline) nakon čega se monomerne jedinice (aminokiseline, prosti šećeri i nukleotidi) apsorbuju kroz ćelijski zid i ćelijsku membranu. Po načinu života gljive mogu biti saprobi, paraziti i simbionti. Saprobnе vrste do organske materije dolaze direktnim razlaganjem. Parazitske vrste gljiva mogu da parazitiraju na biljkama i životinjama, hraneći se apsorpcijom nutrijenata koje proizvodi domaćin ili putem razgradnje tkiva domaćina. Postoje i simbiotske gljive koje žive udružene sa korenovim sistemom viših biljaka u posebnoj vrsti partnerstva koje se zove mikoriza. Takođe, jedan od tipova simbioze gljive i alge su lišajevi.<sup>3</sup>

Pored toga što gljive imaju ključnu ulogu u biorazgradnji organske materije i njenom kruženju u prirodi postoji čitav spektar osobina zbog kojih ih ljudi danas koriste za sopstvene potrebe. Među prvim gljivama kojima je čovek našao primenu je kvasac (*Saccharomyces cerevisiae*) koji se koristi u proizvodnji hleba, alkoholnih pića, pre svega piva i vina, kao i za dobijanje bioetanola.<sup>5</sup> Dve vrste roda *Penicillium* (*P. roquefortii* i *P. camembertii*) koriste se za poboljšanje aromatičnih svojstava poznatih sireva, koji su po njima i dobili naziv.<sup>5</sup> Iz vrste *Penicillium chrysogenum* izolovan je antibiotik penicilin, čije otkriće predstavlja jedan od najvećih doprinosa čovečanstvu. Otkriće antibiotskog dejstva penicilina od strane Aleksandra Fleminga je otvorilo put ka otkrivanju i drugih antibiotika. Ciklosporin, proizvod gljiva *Cylindrocarpon lucidum* i *Trichoderma polysporum*, važan je imunosupresant, koji se primenjuje nakon transplatacije organa, kako bi se sprečila pojava jakog imunskog odgovora i odbacivanja organa. Malobrojne vrste se gaje dok se veliki broj njih sakuplja u prirodi radi ishrane. Sa druge strane, negativni efekti gljiva su takođe raznovrsni i česti. Mnoge patogene gljiva izazivaju humane i animalne mikoze koje se dugotrajno i teško leče, a pojedine vrste proizvode sekundarne metabolite koji su toksični za ljude i životinje (mikotoksini) i mogu da budu izazivači mikotoksikoza. Posebno su važne gljive koje su fakultativni ili obligatni fitopatogeni, koji svojim prisustvom ili metabolitima koje sintetisaju deluju destruktivno na biljku domaćina i mogu dovesti do smanjenja ili potpunog odsustva prinosa, a finalno i do uvenuća. Pojedine vrste su

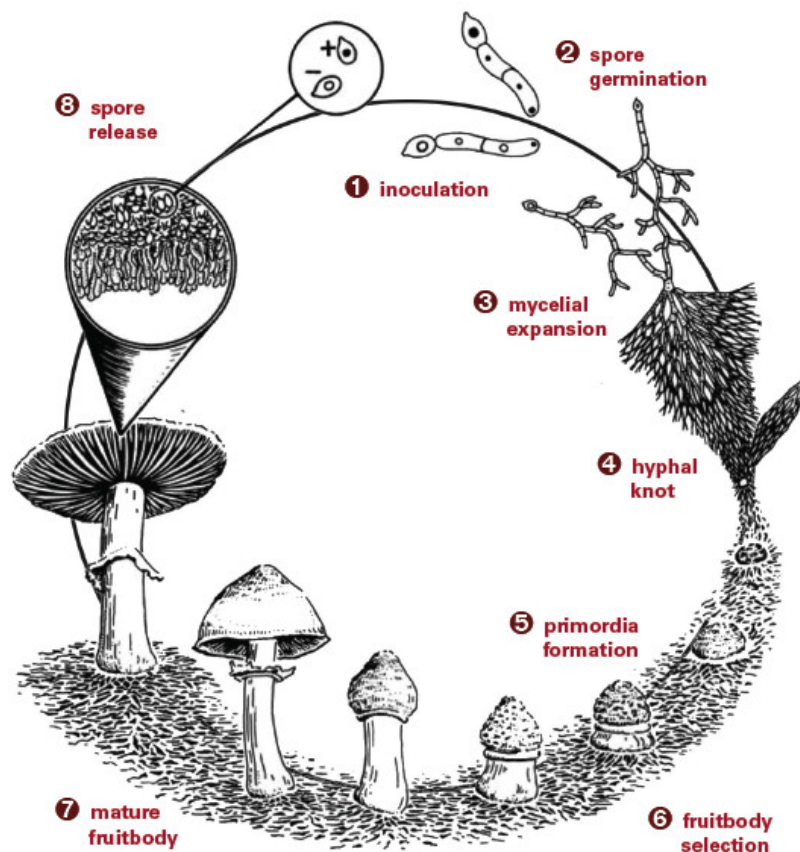
uzročnici truljenja voća i povrća i kvarenja hrane. Od posebnog značaja su gljive koje dovode do biodeterioracije predmeta od drveta, tkanina, papira, pergamenta kao i objekata kulturne baštine.<sup>6</sup>

Istorijski gledano, pristup u klasifikaciji gljiva je baziran na prisustvu reproduktivnih struktura koje se formiraju u toku životnog ciklusa, a ovo stanovište je prihvaćeno i u savremenoj mikologiji. Ne postoji jedinstven i opšte prihvaćen sistem u klasifikaciji gljiva, a najveći broj autora se slaže da se u okviru carstva Fungi gljive mogu svrstati u razdele: Ascomycota, Basidiomycota, Glomeromycota, Zygomycota i Chytridiomycota.<sup>7</sup>

Ako se izuzme manji broj vrsta iz razdela Ascomycota koje obrazuju makroskopska, golim okom vidljiva plodonosna tela, najveći broj gljiva koje karakteriše formiranje ovih struktura svrstan je u razdeo Basidiomycota, a plodonosna tela se zovu bazidiokarpi. U okviru ovog podrazdela, koji broji oko 35.000 vrsta, nalaze se forme poznate kao jestive i otrovne pečurke, puhare, trud-gljive, rđe, garke. Sa aspekta odnosa čoveka prema gljivama, posebno se izdvajaju upravo one vrste koje formiraju uočljive bazidiokarpe. Po tipu, bazidiokarpi mogu biti: resupinantni, želatinozni, konzolasti, trbušasti, bazidiokarpi tipa pečurke ili se mogu javiti u nekoj izvedenoj formi.<sup>6</sup>

## 1.2. Životni ciklus Basidiomycota

Životni ciklus gljiva ovog razdela (**Slika 1**) započinje oslobađanjem bazidiospora koje u kontaktu sa hranljivom podlogom (inokulacija), u odgovarajućim sredinskim uslovima, kličaju u primarnu miceliju koja je haploidna. Spajanjem ćelija primarnih micelija nastalih od bazidiospra različitih ukrštajućih tipova (+ i - hife) u procesu koji se zove somatogamija, nastaje sekundarna micelija koja je dikariotska. Do nastanka dikariotskog stanja dolazi usled toga što proces spajanja ćelijskih sadržaja (plazmogamija) nije praćen spajanjem sadržaja jedara (kariogamija). U ciklusu razvića ovih gljiva dominira sekundarna micelija i od nje su izgrađene sve somatske strukture, uključujući i plodonosna tela.<sup>6</sup> Micelija je dobro razvijena, nalazi se u supstratu i najduži deo životnog ciklusa nije vidljiva golim okom. Tokom ovog perioda micelija razgrađuje i apsorbuje hranjive materije iz okruženja. Ova faza je praćena i sintezom širokog spektra zaštitnih jedinjenja i enzima koji čine odbrambeni sistem gljive. U određenom trenutku i pod dejstvom egzogenih faktora dolazi do eksponencijalnog rasta i razvija micelije, pri čemu se formiraju hifalni čvorovi iz kojih se potom razvijaju začeci plodonosnih tela – primodije. Daljim razvojem i diferencijacijom primodija nastaju plodonosna tela – bazidiokarpi.<sup>8</sup>



**Slika 1.** Životni ciklus Basidiomycota, autor slike Paul Stamets, 2017.<sup>8</sup>  
 (1-inokulacija; 2-klijanje spora; 3-razvoj micelije; 4-hifalni čvor; 5-nastanak primordija; 6-odabir plodonosnih tela; 7-maturacija plodonosnih tela; 8-oslobađanje spora).

### 1.3. Red Polyporales

U okviru reda Polyporales (razdeo Basidiomycota) do sada je opisano oko 1.800 vrsta. Formiraju resupinantna, konzolasta i plodonosna tela tipa pečurke. To su gljive koje kao izvor ugljenika najčešće koriste celulozu i hemicelulozu iz drvene mase i glavni su razlagači lignina u prirodi.<sup>9</sup> Njihova sposobnost da razgrađuju drvo zasnovana je na sintezi ekstracelularnih lignocelulolitičkih enzima, što u najvećoj meri omogućava kruženje ugljenika u prirodi i balans u ekosistemima.<sup>10</sup> Po načinu razlaganja drvene mase dele se na dve velike grupe: gljive bele truleži i gljive braon truleži. Gljive bele truleži su jedini organizmi koji u potpunosti mogu da depolimerizuju i razgrade sve komponente lignina kao i celulozu i hemicelulozu. Gljive braon truleži razlažu celulozu i hemicelulozu dok je razgradnja lignina ograničena na proces demetilacije metoksil grupa, delimičnu oksidaciju i depolimerizaciju u neenzimskom katalitičkom ciklusu Fentonovog tipa, gde slobodnoradikalnu reakciju iniciraju hidroksil (OH•) radikali.<sup>11</sup> S obzirom da gljive izazivači braon truleži nemaju mogućnost razgradnje lignina, koji je inertan za dalju mikrobnu degradaciju, dolazi do sekvestracije ugljenika. Sekvestracija predstavlja proces zarobljavanja i skladištenja ugljen-dioksida, čime se sprečava njegovo oslobađanje u atmosferu. Sposobnost gljiva iz reda Polyporales da sintetišu lignocelulolitičke enzime nije samo od značaja za biogeohemijske cikluse u prirodi. Mogućnost upotrebe ovih enzima za konverziju biomase, mikoremedijaciju, razgradnju celuloze i primene za proizvodnju biogoriva, čini ih glavnim kandidatima za industrijsku primenu.<sup>12</sup>

Deo vrsta ovog reda su saprobi i javljaju se na mrtvim stablima ili granama. Neke vrste iz rodova *Ganoderma* i *Fomes*, napadaju živa stabla, i mogu biti značajni paraziti na drvenastim vrstama. Postoji veliki broj podataka o korišćenju plodonosnih tela ovih gljiva kao prirodnih lekova, kako u tradicionalnoj tako i u konvencionalnoj medicini što ih izdvaja u grupu poznatu kao medicinske gljive.<sup>13</sup>

## 1.4. Uloga gljiva u tradicionalnoj medicini

Na prostoru današnje Rusije, Kanade, Meksika, Venecuele, Severne Amerike a posebno u Kini postoje viševjekovni podaci o korišćenja gljiva u tretmanima mnogih bolesti u tradicionalnoj medicinskoj praksi. Od posebnog su značaja gljive reda Polyporales koje formiraju konzolasta plodonosna tela - trud-gljive, koje su mnogi naroda i plemena širom sveta tradicionalno upotrebljavali za lečenje.<sup>14</sup> Ustaljeno je verovanje da njihova tvrda višegodišnja plodonosna tela predstavljaju izvore snage i mudrosti. Od davnina plemena nisu jasno razlikovala spiritualnu i medicinsku upotrebu, te su ove gljive imale jako veliki uticaj od antičkog vremena do danas.<sup>13,15</sup> Određene vrste koje pripadaju rodu *Ganoderma* su jedne od najstarijih poznatih tradicionalnih lekova. *G. lucidum* je korišćena u kineskoj tradicionalnoj medicini kao tonik za poboljšanje zdravlja, večnu mladost i dugovečnost. Postoje mnoge studije koje svedoče o citotoksičnom, imunostimulišućem, antinflatomnom i antidijabetskom dejstvu ekstrakata i izolovanih jedinjenja iz *G. lucidum*.<sup>16</sup> Za razliku od *G. lucidum*, primer gljive koja se koristila u tradicionalnoj medicini evropskih zemalja je *Inonots obliquus*. U Rusiji je ova gljiva poznata kao „čaga”. Od XVI veka do danas, koristi se kao narodni lek za lečenje kancera, bolesti digestivnog trakta i tuberkuloze.<sup>17</sup> Poslednje studije ukazuju na njeno anti-HIV i imunostimulišuće dejstvo, kao i pozitivno dejstvo protiv visokog pritiska i masnoće u krvi.<sup>18</sup> Pored toga, značajne evropske vrste su *Fomitopsis officinalis*, *F. betulina* i *Fomes fomentarius*. Korišćene su za tretman gastrointestinalnih oboljenja, različitih tipova kancera, bronhijalne astme i mnogih drugih.<sup>13</sup>

Pronalaskom praistorijske evropske mumije „Ötzi - Ledeni čovek“ otkrivene 1991. godine u glečeru na Alpima, nedvosmisleno je utvrđeno da primena ovih gljiva datira iz perioda od pre više od 5.000 godina. Zajedno sa mumijom pronađena je i kožna torbica u kojoj se nalazio materijal za paljenje vatre, napravljen od gljive *Fomes fomentarius* i dva predmeta od gljive *Fomitopsis betulina*, za koje se smatra da su korišćeni u medicinske svrhe.<sup>19,20</sup>

Iako mehanizmi delovanja i struktura aktivnih komponenta preparata i/ili napitaka od gljiva nisu bili poznati praistorijskom čoveku, smatra se da je efekat na njegovo zdravlje bio dobro poznat, a poznat je i danas.<sup>21</sup> Razvoj ljudskog društva i naučnih disciplina kao što su biologija, hemija i medicina, dovelo je do toga da danas postoji veliki broj izolovanih, biološki aktivnih jedinjenja iz gljiva, čija je aktivnost detaljno ispitana.<sup>22</sup> Neka od najznačajnijih su polisahardi, kao što je lentinan izolovan iz *Lentinula edodes* (šitaka).<sup>23</sup> Ovaj polisaharid se odlikuje značajnim antikancerogenim dejstvom i danas se koristi kao pomoćno lekovito sredstvo u terapiji kancera u Japanu.<sup>24</sup> Osim toga, značajan je šizofilan, takođe polisaharid izolovan iz gljive *Schizophyllum commune*, koji je pokazao značajnu citostatičku aktivnost kod sarkoma.<sup>25</sup> Polisaharid-protein kompleksi (PSK i PSP), izolovani iz micelije *Trametes versicolor* (ćuranov rep), koriste se u Japanu kao pomoćni lekovi u terapiji različitih kancera.<sup>26</sup>

Triterpeni, zastupljeni u gljivama su biološki aktivna jedinjenja. Značajne su triterpenske kiseline, poznate kao ganodermske i lucidenske kiseline iz roda *Ganoderma*, zaslužne za različita terapeutska dejstva (antikancerogeno, antiinflamatorno, antialergijsko i sedativno), kojima se vrste ovog roda odlikuju.<sup>27,28</sup>

## 1.5. *Fomitopsis betulina* (Bull.) B.K. Cui, M.L. Han & Y.C. Dai

*Fomitopsis betulina* (lat. *fomitopsis* – sličan *Fomes*-u, lat. *betulina* – brezina, ona koja nastanjuje brezu) je prvi put opisana 1788. godine kao *Boletus betulinus*, dok je 1881. godine svrstana u rod *Piptoporus*. Novije studije su pokazale da je vrsta filogenetski sličnija rodu *Fomitopsis* nego *Piptoporus*, pa je reklasifikovana u rod *Fomitopsis* 2016. godine (**Tabela 1**). U narodu je ova vrsta poznata kao brezina guba, brezin kopitnjak ili brezin trud.<sup>31</sup> Plodonosna tela ove gljive su konzolasta, široka od 10 do 25 cm, u početku bubrežastog, a kasnije lepezastog oblika. Najčešće su nepravilno spljoštena, sa vijugavim i zaobljenim ivicama. Gornja površina je glatka i suva, svetlo smeđe boje, a sa donje strane se nalaze otvori cevastog himenofora (**Slika 2**). Unutrašnjost je bele boje i plutaste

konzistencije. Dok su mlada, plodonosna tela ove vrste su jestiva, što je retkost za gljive ovog tipa. Odlikuje se jakim i prijatnim mirisom, a oštrim i prodornim ukusom.

*F. betulina* je po načinu života parazit i razvija se isključivo na brezama (*Betula* spp.), gde je uzročnik braon truljenja. Na mrtvoj kori ili nakon uvenuća domaćina nastavlja da živi kao saprob i predstavlja najčešću gljivu koja se nalazi na kori breze. Rasprostranjena je širom Evrope, Azije i Severne Amerike, u umerenom klimatskom pojasu.<sup>29</sup>

Ova gljiva je korišćena u narodnoj medicini mnogo pre nego što je konvencionalna medicina ustanovila način primene.<sup>13</sup> U Rusiji, čaj od plodonosnih tela koristi se za umirenje i ima imunostimulišuće dejstvo. U Baltičkoj oblasti, posebno u Finskoj, primenjavana je u tretmanu različitih vrsta kancera. U Poljskoj, ekstrakt plodonosnih tela korišćen je za tretman vaginalnih tumora kod pasa, pri čemu je efekat izlečenja bio vidljiv već nakon nekoliko nedelja od primene. Postoje podaci da su se komadići plodonosnih tela koristili kao antiseptik, dok je osušena i usitnjena gljiva ušmrkavana kao analgetik u Austriji, Sibiru i Severnoj Americi.<sup>13</sup> Istraživanja su pokazala da se ova gljiva koristi kao antimikrobni, antikancerogeni i antiinflamatorni agens. Farmakološke studije su ovo potvrdile i proširile na anti-parazitsku, antivirusnu, neuroprotektivnu i imunomodulirajuću aktivnost.<sup>13,32</sup> Hemijski sastav *F. betulina* je raznovrsan i zbog toga sve više postaje predmet proučavanja.<sup>33</sup> Veliki broj istraživanja je usmeren ka analizi triterpenskih kiselina, široko zastupljenih u medicinskim gljivama iz reda Polyporales, koje se odlikuju različitim biološkim aktivnostima.<sup>27</sup>



Slika 2. *Fomitopsis betulina* (lična arhiva).

Pored nutritivne i medicinske, odlikuje se i drugim primenama. Baršunasta površina plodonosnih tela *F. betulina* tradicionalno je korišćena umesto kaiša, za završnu obradu ivice britve. Osim toga, izrezbarena plodonosna tela su u Austriji korišćena su kao amajlija za životinje. *F. betulina* je jedna od dve gljive čija su plodonosna tela pronađena u torbici neolitskog „Ledenog čoveka“ na Alpima, nakon otapanja glečera.<sup>30</sup>

Tabela 1. Taksonomija gljive *Fomitopsis betulina*<sup>31</sup>

|           |                            |
|-----------|----------------------------|
| Carstvo:  | Fungi                      |
| Razdeo:   | Basidiomycota              |
| Klasa:    | Agaricomycetes             |
| Red:      | Polyporales                |
| Familija: | Fomitopsidaceae            |
| Rod:      | <i>Fomitopsis</i>          |
| Vrsta:    | <i>Fomitopsis betulina</i> |

## 1.6. Primarni metaboliti gljiva i njihova biološka aktivnost

Veliki broj radova je posvećen ispitivanju primarnih metabolita iz plodonosnih tela gljiva i njihove biološke aktivnosti.<sup>34</sup> Najvažniji primarni metaboliti gljiva odlikuju se velikom molekulskom masom, dominantni su polisahardi, proteini i kompleksi polisaharida i proteina. Pored toga, važni su određeni pigmenti i nukleinske kiseline.<sup>2,13</sup>

Polisahardi iz gljiva mogu se podeliti na  $\alpha$ -glukane (skrob, celuloza i hitin), koji nemaju značajnu biološku aktivnost i  $\beta$ -glukane i njihove derivate, koji su odgovorni za širok spektar aktivnosti.  $\beta$ -glukani i njihovi derivati predstavljaju jedan od glavnih sastojaka ćelijskog zida gljiva, izgrađenog od glukoze povezane  $\beta$ -(1,3)-glikozidnim vezama, često sa bočnim lancima vezanih  $\beta$ -(1,6) vezom. Učestalost granjanja varira i samim tim dolazi do javljanja različitih tipova polisaharidnih lanaca. Biološka aktivnost polisaharida iz gljiva je imunostimulativna, antivirusna, antinflamatorna i antitumorska. Veoma je značajno pomenuti da polisaharidi nemaju neželjenih sporednih efekata, već naprotiv, pomažu organizmu da se prilagodi na biološki stres. Karboksimetilovani  $\alpha$ -(1,3)-D-glukani iz plodonosnih tela *F. betulina* pokazali su značajnu citokosličnu aktivnost.<sup>13,35</sup>

Proteini su, pored polisaharida, drugi najzastupljeniji makromolekuli u gljivama. Biološke aktivnosti, koje se pripisuju proteinima, su antitumorska, antivirusna, antioksidativna i imunomodulirajuća aktivnost.<sup>36</sup> Sa stanovništa strukture, proteini gljiva mogu se kategorizovati kao klasični proteini/peptidi (uključujući enzime) ili kao lektini, proteini koji vezuju šećere. Lektini usled svoje specifične strukture i imunostimulativnog delovanja veoma su zanimljivi u ispitivanju lečenja kancera. Posebna pažnja se obraća na toksikološke studije bioaktivnih proteina kako bi se utvrdila njihova bezbednost.<sup>13</sup>

Polisaharidni kompleksi mogu biti veoma složeni ukoliko dođe do kovalentnog vezivanja sa drugim molekulima, kao što su polipeptidi i proteini.<sup>37</sup> Ovakvi polisaharid-protein kompleksi ili polisaharopeptidi pokazuju značajnu imunostimulativnu aktivnost. Postoji nekoliko studija, na osnovu kojih je potvrđena aktivnost ovih kompleksa izolovanih iz jestivih gljiva, bez ikakvog toksičnog uticaja na organizam. Najbolji primer iz ove klase primarnih metabolita predstavlja komercijalno dostupan polisaharid-K (krestin, PSK)<sup>37</sup> i njegov analog polisaharid peptid (PSP), izolovani iz *Trametes versicolor*.<sup>26</sup> Važno je napomenuti da ovi kompleksi mogu biti izolovani iz različitih faza rasta gljive (micelija, plodonosno telo ili kultivacioni medijum) i samim tim mogu se razlikovati po strukturi, sastavu i biološkoj aktivnosti.<sup>13</sup>

Aktivnost melanin-glukan kompleksa (MGC, 80% melanina i 20%  $\beta$ -glukana) ispitivana je na više patogena, pri čemu je pokazano *in vitro* fungistatično dejstvo protiv *Candida albicans*. Pored toga, utvrđeno je antimikrobno dejstvo na *Helicobacter pylori*, identične jačine kao dejstvo antibiotika eritromicina, pri svim ispitivanim koncentracijama.<sup>38</sup> Značajan je nerastvorni kompleks hitin-glukan-melanina (ChGMC, 70% hitina, 20%  $\beta$ -glukana i 10% melanina) koji se odlikuje značajnim antiinfektivnim aktivnostima.<sup>38</sup>

Iz plodonosnih tela *F. betulina* izolovano je nekoliko nukleinskih kiselina koje redukuju broj plakova *Vaccinia* virusa u fibroblastu embriona pilića.<sup>39</sup>

## 1.7. Sekundarni metaboliti gljiva i njihova biološka aktivnost

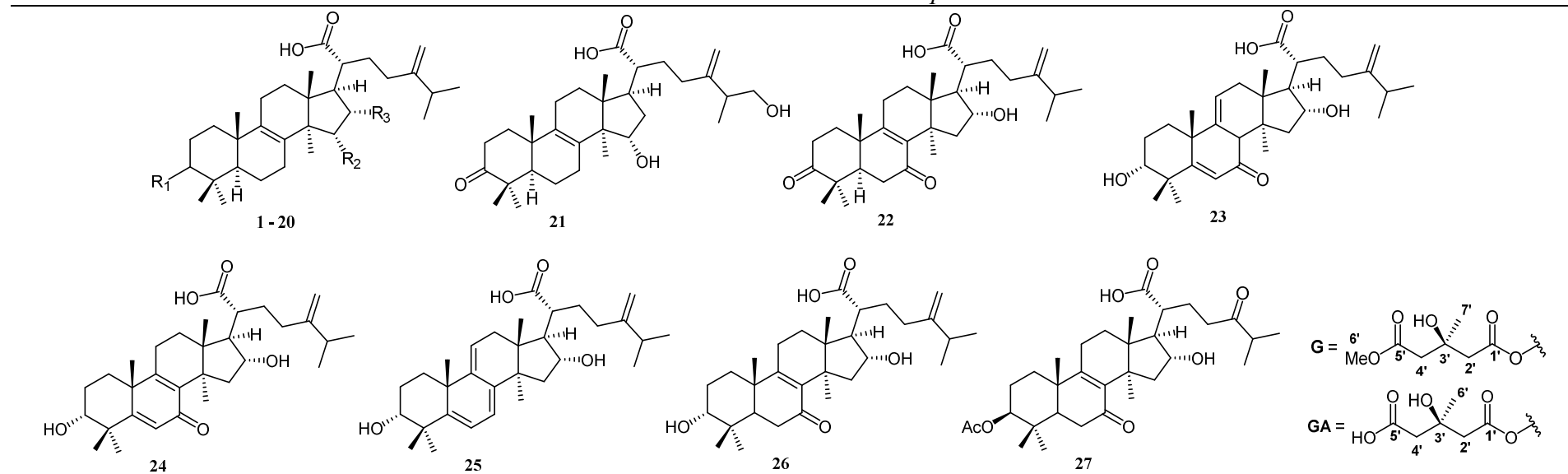
Izolovani i okarakterisani sekundarni metaboliti određenih vrsta gljiva mogu se klasifikovati kao triterpeni, organske kiseline i slična jedinjenja, benzofurani, flavonoidi, kumarini i jedinjenja azota. Najveću zastupljenost kod većine vrsta imaju triterpeni.<sup>40</sup> Oni pripadaju lanostanima, a na osnovu biosinteze određenih vrsta mogu se podeliti na kiseline, estre i laktone, alkohole, glikozide i druge triterpene.<sup>13</sup> Lanostani su triterpeni koji imaju 30 ugljenikovih atoma i karakterističan tetraciklični skelet, a nastaju biosintezom iz lanosterola. Triterpeni izolovani iz najrasprostranjenijih evropskih gljiva, koje pripadaju rodu *Fomitopsis*, prikazani su u daljem tekstu. Najpoznatije vrste iz ovog roda su: *F. officinalis* poznata kao agarikon, *F. pinicola* ili borova guba, najčešća gljiva u četinarskim šumama, *F. betulina* i *F. palustris*.



Na osnovu položaja dvostrukih veza, oksidacije i glikozilacije bočnog niza, kao i drugih strukturnih karakteristika, izvršena je klasifikacija do sada izolovanih triterpenskih derivata lanostanskog tipa na:

1. 24-metilen-21-lanostanske kiseline (**Tabela 2**),
2. 21-lanost-8,25-dijske kiseline (**Tabela 3**),
3. 26-lanost-8-enske kiseline (**Tabela 4**),
4. 24-metilen-21-lanost-7,9(11)-dienske kiseline (**Tabela 5**),
5. 21-lanost-7,9(11),25-trijske kiseline i slične derivate (**Tabela 6**),
6. Triterpenske glikozide (**Tabela 7**),
7. Triterpenske laktone (**Tabela 8**),
8. Različite derivate, uključujući triterpenske alkohole, 3,4-*seco*-lanostane i druga jedinjenja koja ne pripadaju nijednoj od sedam prethodno opisanih kategorija (**Tabela 9**).

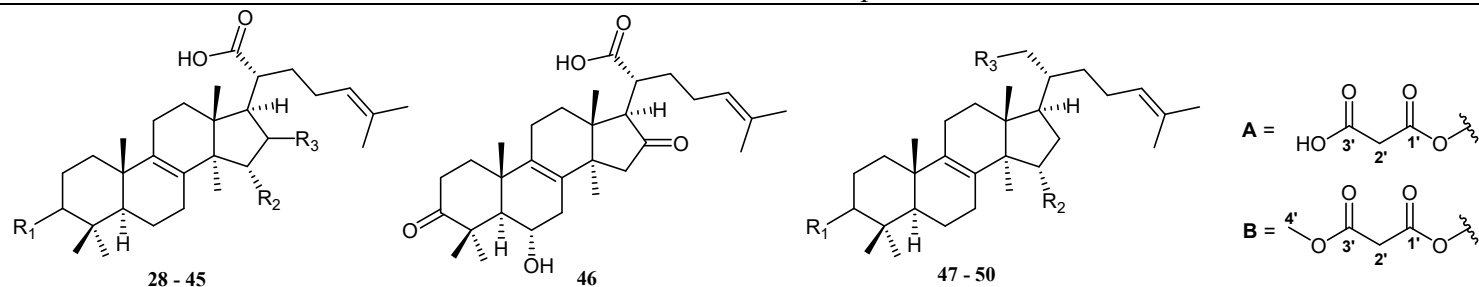
**Tabela 2.** Izolovane 24-metilen-21-lanostanske kiseline iz odabranih vrsta roda *Fomitopsis*.



| Broj | Naziv jedinjenja   | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | Vrsta   |
|------|--|----------------|----------------|----------------|---|
| 1    | Eburicinska kiselina   | $\beta$ -OH    | H              | H              | <i>F. officinalis</i> <sup>41</sup>                                   |
| 2    | Sumporenska kiselina   | $\beta$ -OH    | OH             | H              | <i>F. officinalis</i> <sup>41</sup>                                   |
| 3    | Fomeficinska kiselina A  | O              | H              | H              | <i>F. officinalis</i> <sup>42</sup>                                   |
| 4    | Fomeficinska kiselina D  | O              | OH             | H              | <i>F. officinalis</i> <sup>42</sup>                                   |
| 5    | Fomeficinska kiselina C  | $\alpha$ -OH   | OH             | H              | <i>F. officinalis</i> <sup>42</sup>                                   |
| 6    | Versisponska kiselina D  | $\beta$ -OH    | OAc            | H              | <i>F. officinalis</i> <sup>41</sup>                                   |
| 7    | Pahiminska kiselina  | $\beta$ -OAc   | H              | OH             | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup><br><i>F. palustris</i> <sup>44</sup> |
| 8    | 16 $\alpha$ -Hidroksieburicinska kiselina  | O              | H              | OH             | <i>F. betulina</i> <sup>45</sup><br><i>F. pinicola</i> <sup>46</sup>  |
| 9    | Palustriska kiselina H   | $\alpha$ -G    | H              | OH             | <i>F. palustris</i> <sup>44</sup>                                     |
| 10   | Poliporenska kiselina B  | $\beta$ -OH    | H              | OH             | <i>F. pinicola</i> <sup>47</sup><br><i>F. palustris</i> <sup>44</sup> |
| 11   | 3 $\alpha$ -(3'-hidroksi-4'-karboksil-3'-metil-1,5-dioksopentiloksi)-24-metilen-21-lanost-8-enska kiselina | $\alpha$ -GA   | H              | H              | <i>F. pinicola</i> <sup>48</sup>                                      |

|    |  |               |    |     |                                     |
|----|--|---------------|----|-----|-------------------------------------|
| 12 | 3 $\beta$ -acetoksi-16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-21-lanost-8-enska kiselina  | $\beta$ -OAc  | H  | OH  | <i>F. pinicola</i> <sup>48</sup>    |
| 13 | 16 $\alpha$ -acetoksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-8-enska kiselina               | O             | H  | OAc | <i>F. pinicola</i> <sup>48</sup>    |
| 14 | Dehidroeburikonska kiselina  | O             | H  | H   | <i>F. pinicola</i> <sup>48</sup>    |
| 15 | Forpinska kiselina A   | $\alpha$ -G   | H  | OAc | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup>    |
| 16 | Forpinska kiselina B   | $\alpha$ -G   | OH | H   | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup>    |
| 17 | 16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-8-enska kiselina               | O             | H  | OH  | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup>    |
| 18 | 3- <i>epi</i> -pahiminska kiselina   | $\alpha$ -OAc | H  | OH  | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup>    |
| 19 | Alustriska kiselina  | $\alpha$ -G   | H  | OH  | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup>    |
| 20 | Piptolinska kiselina H   | $\alpha$ -OH  | H  | OH  | <i>F. betulina</i> <sup>45</sup>    |
| 21 | Fomeficinska kiselina F  | /             | /  | /   | <i>F. officinalis</i> <sup>49</sup> |
| 22 | Forpinska kiselina C   | /             | /  | /   | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup>    |
| 23 | Piptolinska kiselina F   | /             | /  | /   | <i>F. betulina</i> <sup>45</sup>    |
| 24 | Piptolinska kiselina G   | /             | /  | /   | <i>F. betulina</i> <sup>45</sup>    |
| 25 | Piptolinska kiselina I   | /             | /  | /   | <i>F. betulina</i> <sup>45</sup>    |
| 26 | 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -dihidroksi-24-metilen-7-okso-21-lanost-8-enska kiselina | /             | /  | /   | <i>F. betulina</i> <sup>45</sup>    |
| 27 | 3 $\beta$ -acetoksi-16 $\alpha$ -hidroksi-24-okso-21-lanost-8-enska kiselina     | /             | /  | /   | <i>F. betulina</i> <sup>50</sup>    |

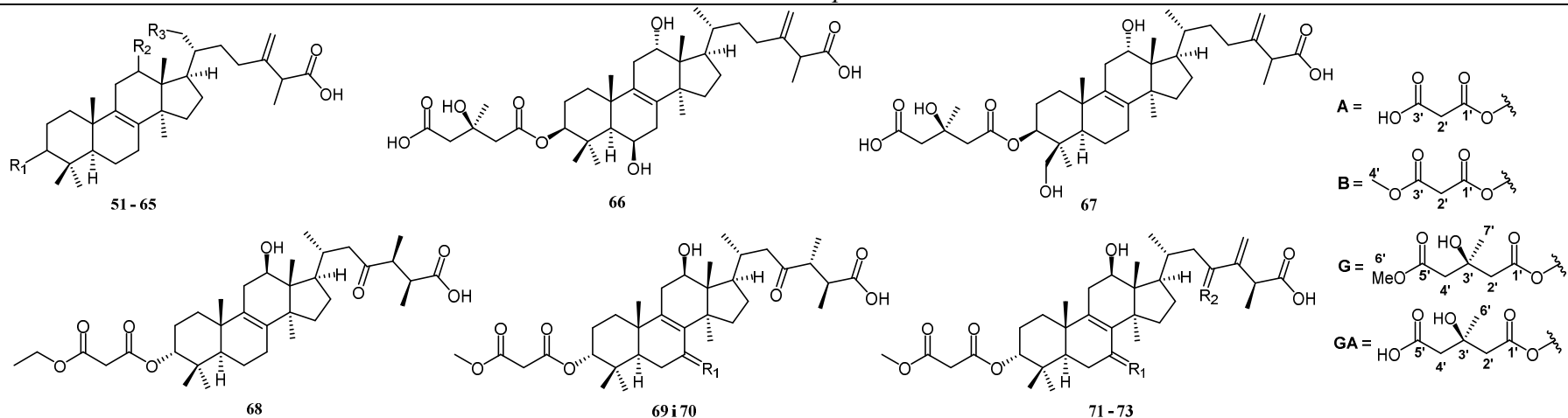
**Tabela 3.** Izolovane 21-lanost-8,25-dijske kiseline iz odabranih vrsta roda *Fomitopsis*.



| Broj | Naziv jedinjenja   | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | Vrsta                            |
|------|--|----------------|----------------|----------------|----------------------------------|
| 28   | Trametenolna kiselina B  | $\beta$ -OH    | H              | H              | <i>F. pinicola</i> <sup>51</sup> |
| 29   | 16 $\alpha$ -Hidroksitrametenolna kiselina                                 | $\beta$ -OH    | H              | $\alpha$ -OH   | <i>F. pinicola</i> <sup>47</sup> |
| 30   | 3 $\beta$ -acetoksi-15 $\alpha$ -hidroksi-21-lanost-8,24-dijenska kiselina | $\beta$ -OAc   | OH             | H              | <i>F. pinicola</i> <sup>47</sup> |
| 31   | Tsugarinska kiselina A   | $\alpha$ -OAc  | H              | H              | <i>F. pinicola</i> <sup>51</sup> |
| 32   | Pinikolna kiselina A   | O              | H              | H              | <i>F. pinicola</i> <sup>51</sup> |
| 33   | Pinikolna kiselina B   | O              | H              | O              | <i>F. pinicola</i> <sup>51</sup> |
| 34   | Pinikolna kiselina E   | O              | H              | $\alpha$ -OH   | <i>F. pinicola</i> <sup>52</sup> |
| 35   | Fomitopsinska kiselina   | G              | H              | H              | <i>F. pinicola</i> <sup>53</sup> |
| 36   | Formipinska kiselina A   | $\beta$ -GA    | H              | H              | <i>F. pinicola</i> <sup>53</sup> |
| 37   | Formipinska kiselina B   | $\alpha$ -G    | OH             | H              | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup> |
| 38   | Formipinska kiselina C   | $\alpha$ -OAc  | H              | $\alpha$ -OH   | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup> |
| 39   | Formipinska kiselina D   | $\alpha$ -OAc  | H              | O              | <i>F. pinicola</i> <sup>53</sup> |
| 40   | Formipinska kiselina G   | $\beta$ -OAc   | H              | O              | <i>F. pinicola</i> <sup>53</sup> |
| 41   | Formipinska kiselina H   | $\alpha$ -G    | H              | O              | <i>F. pinicola</i> <sup>53</sup> |
| 42   | 3 $\beta$ -hidroksi-21-lanost-8,24-dijenska kiselina                       | $\beta$ -OH    | H              | H              | <i>F. pinicola</i> <sup>53</sup> |
| 43   | 3-okso-21-lanost-8,24-dijenska kiselina                                    | O              | H              | H              | <i>F. pinicola</i> <sup>53</sup> |
| 44   | 15 $\alpha$ -hidroksi-3-okso-21-lanost-8,24-dijenska kiselina              | O              | OH             | H              | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup> |
| 45   | 15 $\alpha$ -Hidroksitrametenolna kiselina                                 | $\beta$ -OH    | OH             | H              | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup> |
| 46   | Formipinska kiselina E   | /              | /              | /              | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup> |
| 47   | Formitopsinska kiselina A  | O              | OH             | A              | <i>F. pinicola</i> <sup>53</sup> |
| 48   | Formitopsinska kiselina F  | $\beta$ -OH    | H              | A              | <i>F. pinicola</i> <sup>53</sup> |
| 49   | Formipiniat A  | O              | H              | B              | <i>F. pinicola</i> <sup>53</sup> |
| 50   | Formipiniat  | $\alpha$ -G    | OH             | B              | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup> |



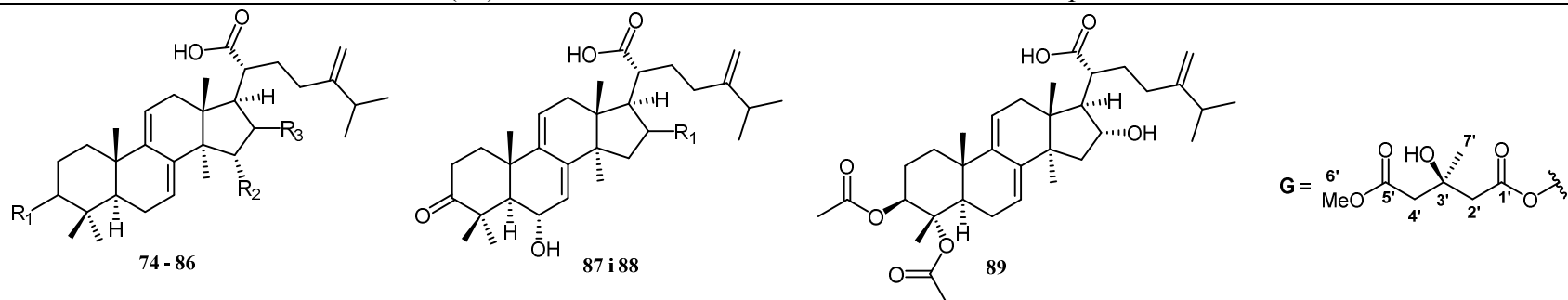
**Tabela 4.** Izolovane 26-lanost-8-enske kiseline iz odabranih vrsta roda *Fomitopsis*.



| Broj | Naziv jedinjenja  | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | Vrsta   |
|------|---|----------------|----------------|----------------|---|
| 51   | Poliporenska kiselina A   | $\alpha$ -OH   | $\alpha$ -OH   | H              | <i>F. betulina</i> <sup>54</sup>                                      |
| 52   | Fomeficinska kiselina G   | $\beta$ -OH    | $\alpha$ -OH   | H              | <i>F. officinalis</i> <sup>49</sup>                                   |
| 53   | 3 $\alpha$ -acetoksi-12 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-26-lanost-8-enska kiselina  | $\beta$ -OAc   | $\alpha$ -OH   | H              | <i>F. betulina</i> <sup>55</sup>                                      |
| 54   | 3 $\alpha$ -[(karboksiaetil)oksi]-12 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-26-lanost-8-enska kiselina                             | $\alpha$ -A    | $\alpha$ -OH   | H              | <i>F. betulina</i> <sup>54</sup>                                      |
| 55   | 12 $\alpha$ -hidroksi-3 $\alpha$ -(3-metoksi-1,3-dioksopropoksi)-24-metilen-26-lanost-8-enska kiselina                    | $\alpha$ -B    | $\alpha$ -OH   | H              | <i>F. betulina</i> <sup>55</sup>                                      |
| 56   | 3 $\alpha$ -(3-hidroksi-3-metilglutariloksi)-12 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-26-lanost-8-enska kiselina                  | $\alpha$ -GA   | $\alpha$ -OH   | H              | <i>F. betulina</i> <sup>54</sup><br><i>F. palustris</i> <sup>44</sup> |
| 57   | 12 $\alpha$ -hidroksi-3 $\alpha$ -(3-hidroksi-4-metoksikarbonil-3-metilbutiriloksi)-24-metilen-26-lanost-8-enska kiselina | $\alpha$ -G    | $\alpha$ -OH   | H              | <i>F. betulina</i> <sup>54</sup><br><i>F. palustris</i> <sup>44</sup> |
| 58   | Palustriska kiselina F  | $\alpha$ -G    | O              | H              | <i>F. pinicola</i> <sup>48</sup>                                      |
| 59   | Poliporenska kiselina D   | $\beta$ -OH    | H              | H              | <i>F. pinicola</i> <sup>48</sup>                                      |
| 60   | Palustriska kiselina B  | $\beta$ -GA    | $\alpha$ -OH   | H              | <i>F. palustris</i> <sup>44</sup>                                     |
| 61   | Palustriska kiselina C  | $\beta$ -GA    | $\beta$ -OH    | H              | <i>F. palustris</i> <sup>44</sup>                                     |
| 62   | Palustriska kiselina D  | $\beta$ -GA    | H              | OH             | <i>F. palustris</i> <sup>44</sup>                                     |
| 63   | Palustriska kiselina E  | $\alpha$ -GA   | H              | OH             | <i>F. palustris</i> <sup>44</sup>                                     |

|    |   |                |                |   |                                     |
|----|---|----------------|----------------|---|-------------------------------------|
| 64 | Palustriska kiselina G  | $\beta$ -OH    | $\alpha$ -OH   | H | <i>F. palustris</i> <sup>44</sup>   |
| 65 | 3 $\alpha$ -acetylpoliporenska kiselina   | $\alpha$ -OAc  | $\alpha$ -OH   | H | <i>F. palustris</i> <sup>44</sup>   |
| 66 | Palustriska kiselina A  | /              | /              | / | <i>F. palustris</i> <sup>44</sup>   |
| 67 | 12 $\alpha$ ,28-dihidroksi-3 $\alpha$ -(3-hidroksi-3-metilglutariloksi)-24-metilen-26-lanost-8-enska kiselina | /              | /              | / | <i>F. betulina</i> <sup>54</sup>    |
| 68 | Fomitopsin D  | /              | /              | / | <i>F. officinalis</i> <sup>56</sup> |
| 69 | Oficimalonska kiselina D  | O              | /              | / | <i>F. officinalis</i> <sup>57</sup> |
| 70 | Oficimalonska kiselina E  | H <sub>2</sub> | /              | / | <i>F. officinalis</i> <sup>57</sup> |
| 71 | Oficimalonska kiselina F  | O              | H <sub>2</sub> | / | <i>F. officinalis</i> <sup>57</sup> |
| 72 | Oficimalonska kiselina G  | H <sub>2</sub> | O              | / | <i>F. officinalis</i> <sup>57</sup> |
| 73 | Oficimalonska kiselina H  | H <sub>2</sub> | H <sub>2</sub> | / | <i>F. officinalis</i> <sup>57</sup> |

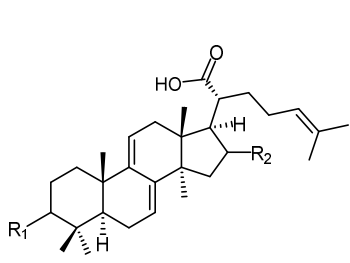
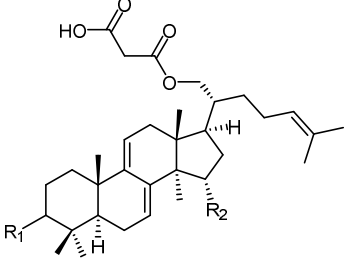
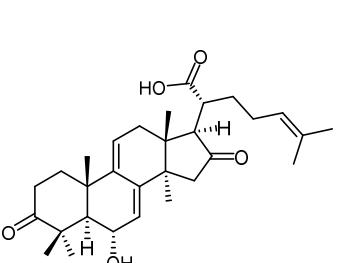
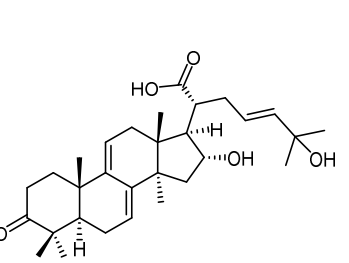
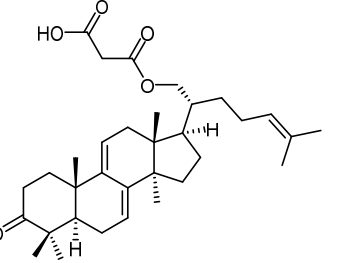
**Tabela 5.** Izolovane 24-metilen-21-lanost-7,9(11)-dienske kiseline iz odabranih vrsta roda *Fomitopsis*.



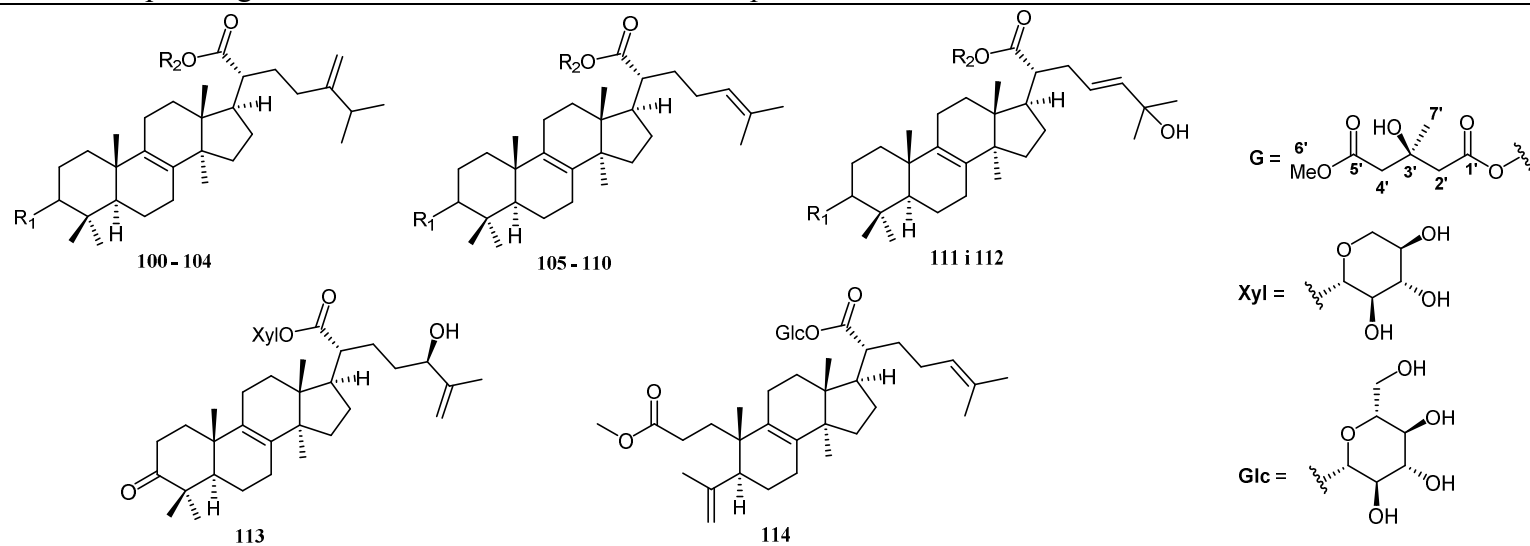
| Broj | Naziv jedinjenja   | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | Vrsta   |
|------|--|----------------|----------------|----------------|---|
| 74   | Dehidroeburicinska kiselina  | $\beta$ -OH    | H              | H              | <i>F. officinalis</i> <sup>58</sup><br><i>F. betulina</i> <sup>59</sup> |
| 75   | Dehidrosumporenska kiselina  | $\beta$ -OH    | OH             | H              | <i>F. officinalis</i> <sup>58</sup>                                     |
| 76   | Fomeficinska kiselina B  | $\alpha$ -OH   | OH             | H              | <i>F. officinalis</i> <sup>42</sup>                                     |
| 77   | Dehidroeburikonska kiselina  | O              | H              | H              | <i>F. officinalis</i> <sup>58</sup>                                     |
| 78   | Poliporenska kiselina C  | O              | H              | $\alpha$ -OH   | <i>F. betulina</i> <sup>54</sup><br><i>F. pinicola</i> <sup>48</sup>    |
| 79   | 16 $\alpha$ -acetoksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-7,9(11)-dienska kiselina | O              | H              | $\alpha$ -OAc  | <i>F. pinicola</i> <sup>46</sup>  |
| 80   | 3-ketodehidrosumporenska kiselina  | O              | OH             | H              | <i>F. officinalis</i> <sup>58</sup>                                     |
| 81   | Fomeficinska kiselina E  | O              | OAc            | H              | <i>F. officinalis</i> <sup>42</sup>                                     |
| 82   | Dehidrotumulozinska kiselina   | $\beta$ -OH    | H              | $\alpha$ -OH   | <i>F. pinicola</i> <sup>47</sup>  |
| 83   | 3- <i>epi</i> -dehidrotumulozinska kiselina                                | $\alpha$ -OH   | H              | $\alpha$ -OH   | <i>F. palustris</i> <sup>44</sup><br><i>F. pinicola</i> <sup>47</sup>   |
| 84   | 3- <i>epi</i> -dehidropahiminska kiselina                                  | $\alpha$ -OAc  | H              | $\alpha$ -OH   | <i>F. betulina</i> <sup>59</sup>  |
| 85   | Forpinska kiselina D   | O              | H              | O              | <i>F. pinicola</i> <sup>48</sup>  |
| 86   | Forpinska kiselina F   | $\alpha$ -G    | H              | O              | <i>F. pinicola</i> <sup>48</sup>  |
| 87   | 6 $\alpha$ -hidroksipoliporenska kiselina C                                | $\alpha$ -OH   | /              | /              | <i>F. pinicola</i> <sup>47</sup><br><i>F. betulina</i> <sup>59</sup>    |
| 88   | Forpinska kiselina E   | O              | /              | /              | <i>F. pinicola</i> <sup>48</sup>  |
| 89   | Forpinska kiselina G   | /              | /              | /              | <i>F. pinicola</i> <sup>48</sup>  |



**Tabela 6.** Izolovane 21-lanost-7,9(11),25-trienske kiseline iz odabranih vrsta roda *Fomitopsis*.

| Broj    | Naziv jedinjenja  | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | Vrsta  |
|---------|---|----------------|----------------|--|
| 90-94   |    |                |                |  |
| 95 i 96 |    |                |                |  |
| 97      |   |                |                |  |
| 98      |  |                |                |  |
| 99      |  |                |                |  |
| 90      | 3β,16α-dihidroksi-21-lanost-7,9(11),24-trienska kiselina                            | β-OH           | α-OH           | <i>F. pinicola</i> <sup>47</sup>                                     |
| 91      | 16α-hidroksi-3-okso-21-lanost-7,9(11),24-trienska kiselina                          | O              | α-OH           | <i>F. pinicola</i> <sup>47</sup>                                     |
| 92      | Piptolinska kiselina D  | O              | O              | <i>F. betulina</i> <sup>59</sup><br><i>F. pinicola</i> <sup>47</sup> |
| 93      | 3β-hidroksi-16-okso-21-lanost-7,9(11),24-trienska kiselina                          | β-OH           | O              | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup>                                     |
| 94      | 3β-acetoksi-16α-hidroksidehidrotrametenolikacidna kiselina                          | β-OAc          | α-OH           | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup>                                     |
| 95      | Formitopsinska kiselina C   | O              | OH             | <i>F. pinicola</i> <sup>48</sup>                                     |
| 96      | Formitopsinska kiselina D   | β-OH           | H              | <i>F. pinicola</i> <sup>48</sup>                                     |
| 97      | Formipinska kiselina F  | /              | /              | <i>F. pinicola</i> <sup>48</sup>                                     |
| 98      | Piptolinska kiselina E  | /              | /              | <i>F. betulina</i> <sup>59</sup>                                     |
| 99      | Fomitopsinska kiselina B  | /              | /              | <i>F. pinicola</i> <sup>48</sup>                                     |

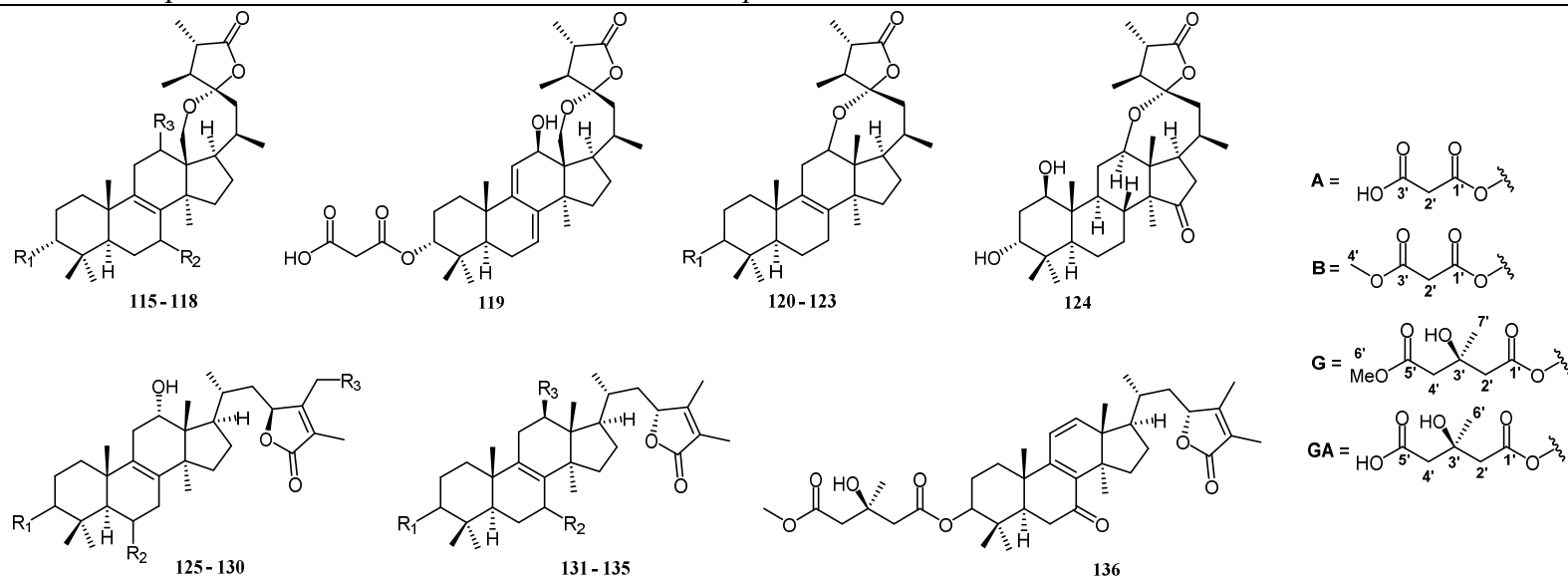
**Tabela 7.** Izolovani triterpenski glikozidi iz odabranih vrsta roda *Fomitopsis*.



| Broj | Naziv jedinjenja   | $R_1$         | $R_2$ | Vrsta                            |
|------|--|---------------|-------|----------------------------------|
| 100  | Forpiniozid  | $\alpha$ -G   | Xyl   | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup> |
| 101  | Fomitozid K  | $\alpha$ -OAc | Glc   | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup> |
| 102  | Fomitozid J  | $\beta$ -OH   | Glc   | <i>F. pinicola</i> <sup>60</sup> |
| 103  | Fomitozid D  | O             | Xyl   | <i>F. pinicola</i> <sup>60</sup> |
| 104  | Fomitozid G  | $\alpha$ -OAc | Xyl   | <i>F. pinicola</i> <sup>60</sup> |
| 105  | Ganosinozid A  | O             | Glc   | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup> |
| 106  | Fomitozid C  | O             | Xyl   | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup> |
| 107  | Fomitozid I  | $\beta$ -OH   | Glc   | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup> |
| 108  | 21-O- $\beta$ -D-glukopiranozid 3 $\alpha$ -acetoksi-21-lanost-8,24-dienska kiseline | $\alpha$ -OAc | Glc   | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup> |
| 109  | Fomitozid F  | $\alpha$ -OAc | Xyl   | <i>F. pinicola</i> <sup>60</sup> |
| 110  | Fomitozid H  | $\alpha$ -G   | Xyl   | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup> |
| 111  | Fomitozid A  | O             | Xyl   | <i>F. pinicola</i> <sup>60</sup> |
| 112  | Fomitpid E   | $\alpha$ -OAc | Xyl   | <i>F. pinicola</i> <sup>60</sup> |
| 113  | Fomitozid B  | /             | /     | <i>F. pinicola</i> <sup>60</sup> |
| 114  | Formipiniozid  | /             | /     | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup> |



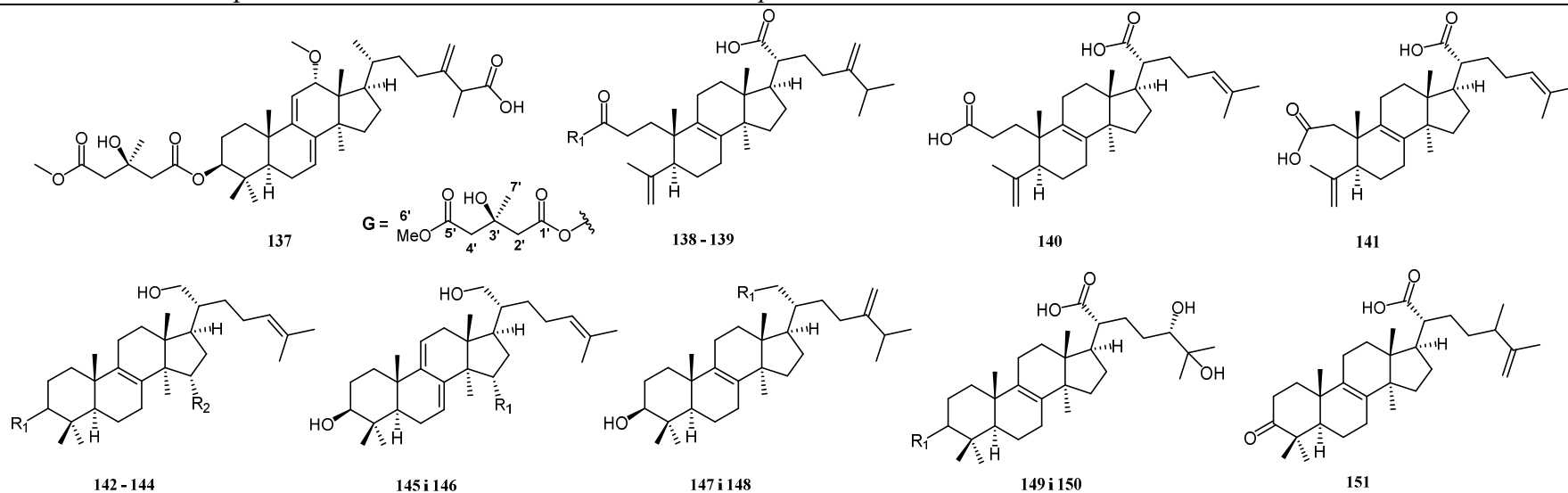
**Tabela 8.** Izolovani triterpenski laktoni iz odabranih vrsta roda *Fomitopsis*.



| Broj | Naziv jedinjenja         | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | Vrsta                               |
|------|--------------------------|----------------|----------------|----------------|-------------------------------------|
| 115  | Fomeficinol A            | OH             | H              | $\alpha$ -OH   | <i>F. officinalis</i> <sup>49</sup> |
| 116  | Oficimalonska kiselina C | A              | O              | $\beta$ -OH    | <i>F. officinalis</i> <sup>57</sup> |
| 117  | Oficimalonska kiselina I | A              | H              | $\beta$ -OH    | <i>F. officinalis</i> <sup>61</sup> |
| 118  | Oficimalonska kiselina J | A              | H              | H              | <i>F. officinalis</i> <sup>61</sup> |
| 119  | Oficimalonska kiselina K | /              | /              | /              | <i>F. officinalis</i> <sup>61</sup> |
| 120  | Fomlakton A              | $\alpha$ -OAc  | /              | /              | <i>F. officinalis</i> <sup>49</sup> |
| 121  | Fomlakton B              | $\alpha$ -OH   | /              | /              | <i>F. officinalis</i> <sup>49</sup> |
| 122  | Fomlakton C              | O              | /              | /              | <i>F. officinalis</i> <sup>49</sup> |
| 123  | Fomitopsin F             | $\alpha$ -A    | /              | /              | <i>F. officinalis</i> <sup>56</sup> |
| 124  | Fomeficinol B            | /              | /              | /              | <i>F. officinalis</i> <sup>49</sup> |
| 125  | Palustrisolid A          | $\alpha$ -G    | H              | H              | <i>F. palustris</i> <sup>44</sup>   |
| 126  | Palustrisolid B          | $\alpha$ -GA   | H              | H              | <i>F. palustris</i> <sup>44</sup>   |
| 127  | Palustrisolid C          | $\alpha$ -G    | H              | OH             | <i>F. palustris</i> <sup>44</sup>   |
| 128  | Palustrisolid D          | $\alpha$ -A    | H              | H              | <i>F. palustris</i> <sup>44</sup>   |
| 129  | Palustrisolid E          | $\beta$ -GA    | H              | H              | <i>F. palustris</i> <sup>44</sup>   |
| 130  | Palustrisolid F          | $\beta$ -GA    | $\beta$ -OH    | H              | <i>F. palustris</i> <sup>44</sup>   |

|     |                          |              |   |    |                                     |
|-----|--------------------------|--------------|---|----|-------------------------------------|
| 131 | Oficimalonska kiselina B | $\alpha$ -A  | O | OH | <i>F. officinalis</i> <sup>57</sup> |
| 132 | Oficimalonska kiselina L | $\alpha$ -A  | H | OH | <i>F. officinalis</i> <sup>61</sup> |
| 133 | Oficimalonska kiselina M | $\alpha$ -B  | O | OH | <i>F. officinalis</i> <sup>61</sup> |
| 134 | Oficimalonska kiselina N | $\alpha$ -OH | H | OH | <i>F. officinalis</i> <sup>61</sup> |
| 135 | Oficimalonska kiselina O | $\beta$ -OH  | H | H  | <i>F. officinalis</i> <sup>61</sup> |
| 136 | Palustrisolid G          | /            | / | /  | <i>F. palustris</i> <sup>44</sup>   |

**Tabela 9.** Izolovani triterpenski derivati iz odabranih vrsta roda *Fomitopsis*.



| Broj | Naziv jedinjenja                                       | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | Vrsta                               |
|------|--|----------------|----------------|-------------------------------------|
| 137  | Piptolinska kiselina A                                 | /              | /              | <i>F. betulina</i> <sup>59</sup>    |
| 138  | Piptolinska kiselina B                                 | OH             | /              | <i>F. betulina</i> <sup>59</sup>    |
| 139  | Piptolinska kiselina C                                 | OMe            | /              | <i>F. betulina</i> <sup>59</sup>    |
| 140  | Piptolinska kiselina J                                 | /              | /              | <i>F. betulina</i> <sup>45</sup>    |
| 141  | Pinikolna kiselina C                                   | /              | /              | <i>F. pinicola</i> <sup>48</sup>    |
| 142  | Formipinol   | $\alpha$ -G    | OH             | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup>    |
| 143  | Fomiroid A   | O              | OH             | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup>    |
| 144  | 21-hidroksi-lanost-8,24-dien-3-on                      | O              | H              | <i>F. pinicola</i> <sup>45</sup>    |
| 145  | 5 $\alpha$ -lanost-7,9(11),24-trien-3 $\beta$ ,21-diol | H              | /              | <i>F. pinicola</i> <sup>51</sup>    |
| 146  | Pinakolol B  | OH             | /              | <i>F. pinicola</i> <sup>51</sup>    |
| 147  | Obtusifoldienol  | H              | /              | <i>F. officinalis</i> <sup>62</sup> |
| 148  | Eburicodiol  | OH             | /              | <i>F. officinalis</i> <sup>63</sup> |
| 149  | Fomitopinska kiselina A                                | O              | /              | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup>    |
| 150  | Fomitopinska kiselina B                                | $\alpha$ -OAc  | /              | <i>F. pinicola</i> <sup>43</sup>    |
| 151  | 24-metil-3-okso-21-lanost-8,25-dienska kiselina        | /              | /              | <i>F. pinicola</i> <sup>46</sup>    |

Predstavljeni pregled literature ukazuje na veliki medicinski potencijal odabranih vrsta roda *Fomitopsis*. Dosadašnje studije pokazale su da podjednak značaj treba dati i primarnim i sekundarnim metabolitima. Moćna alatka za sveobuhvatnu analizu kompletnog metaboličkog profila je metabolomika.

### 1.8. Primena HR MAS NMR spektroskopije u metabolomici

Metabolomika je razvijena kako bi se prvenstveno pojednostavilo ispitivanje biljaka, ali je koncept primenljiv i na druge organizme.<sup>64</sup> Ona pruža mogućnost za sticanje kvalitativnog i kvantitativnog uvida u sve metabolite prisutne u organizmima, sa različitim osobinama i funkcijama. Ukoliko se posmatra carstvo biljaka, postoji više od milion metabolita, što metabolomiku čini veoma izazovnim poljem.<sup>64,65</sup> Promene u metaboličkom profilu dešavaju se veoma brzo usled cirkadijalnog ritma i uticaja spoljašnjeg stresa na organe, tkiva, pa i ćelije. Metabolom je povezan sa fenotipom organizma jer metaboliti predstavljaju kraj ćelijskih procesa.<sup>66</sup> Metabolomika se koristi za proučavanje promena pri normalnim i abiotskim uslovima (temperatura, svetlost) i uslovima biotičkog stresa (prisustvo mirkomiceta, parazita i insekata), ispitivanje bezbednosti genetski modifikovanih useva, uticaja skladištenja voća i otkrivanja prevara sa lažnom hranom.<sup>67-69</sup>

Veliki broj analitičkih metoda dostupan je za metabolomičko ispitivanje, od kojih se najviše koristi <sup>1</sup>H NMR spektroskopija tečnog stanja i masena spektrometrija. Obe tehnike imaju prednosti i ograničenja. <sup>1</sup>H NMR Spektroskopija tečnog stanja pruža mogućnost za kvantitativnu, nedestruktivnu i brzu analizu s odličnom ponovljivošću, ali slabom osetljivošću. Osetljivost NMR spektroskopije može se delimično poboljšati na nekoliko načina: primenom jačeg magnetnog polja, šigemi kivetama i krio- i mikroprobama.<sup>70,71</sup> Sa druge strane, masena spektrometrija je znatno osetljivija tehnika koja pruža mogućnost za detektovanje velikog broja metabolita u istom uzorku. Najčešće se koristi u kombinaciji sa gasom ili tečnom hromatografijom za različite klase metabolita. Masena spektrometrija je destruktivna metoda, uglavnom se primenjuje za ciljanu (analizu) i problematična je kvantifikacija, jer su nedostupni standardni za nove metabolite.<sup>72</sup> Za obe pomenute tehnike, ključni korak predstavlja ekstrakcija metabolita, koja sama po sebi je vremenski zahtevna dovodi i do velikih gubitaka ili razgradnje molekula, što nije poželjno.<sup>64</sup> Za metabolomičke studije je idealno da se uzorci analiziraju u celosti bez ikakve ekstrakcije.

Kod HR NMR analize tečnih uzoraka, koji su homogeni, moguće je dobiti oštre i jasne signale širokog spektra metabolita, dok polučvrsti uzorci, kao što su različita tkiva, ćelije i organizmi su heterogeni i dovode do pojave širokih signala, koji onemogućavaju detaljnu metaboličku analizu. Primenom nuklearno-magnetno rezonantne spektroskopije visoke rezolucije sa magičnim uglom rotacije (HR MAS NMR – High resolution magic angle spinning NMR) prevazilazi se taj problem i omogućava analiza heterogenih uzoraka.<sup>64</sup>

HR MAS NMR je tehnika analize polučvrstog stanja pogodna za uzorke koji imaju ograničenu rastvorljivost ili su nerastvorni u dostupnim NMR rastvaračima. Ova tehnika kombinuje dva uspešna NMR aspekta: visoku rezoluciju za tečne i sužavanje linija za čvrste uzorke. Predstavlja prosek gradijenta magnetne osetljivosti i rezidualnog dipolarnog kuplovanja svojstvenog heterogenim sistemima. Kao rezultat, dobijaju se NMR spektri polučvrstih uzoraka sa podjednako dobrom rezolucijom kao kod NMR spektroskopije tečnog stanja, bez obzira na njihovu smanjenu pokretljivost.<sup>73</sup>

Postoji veliki broj prednosti polučvrstog u odnosu na NMR tečnog stanja, pre svega zaobilazanje koraka rastvaranja, pa se uzorak analizira u celini. Kod ispitivanja hemijskog sastava gljiva veoma je važno analizirati celokupni materijal, što je u velikom broju slučajeva teško izvodljivo, jer ne postoji adekvatan rastvarač, koji bi tokom ekstrakcije, obuhvatio širok spektar jedinjenja koja se nalaze u gljivama.

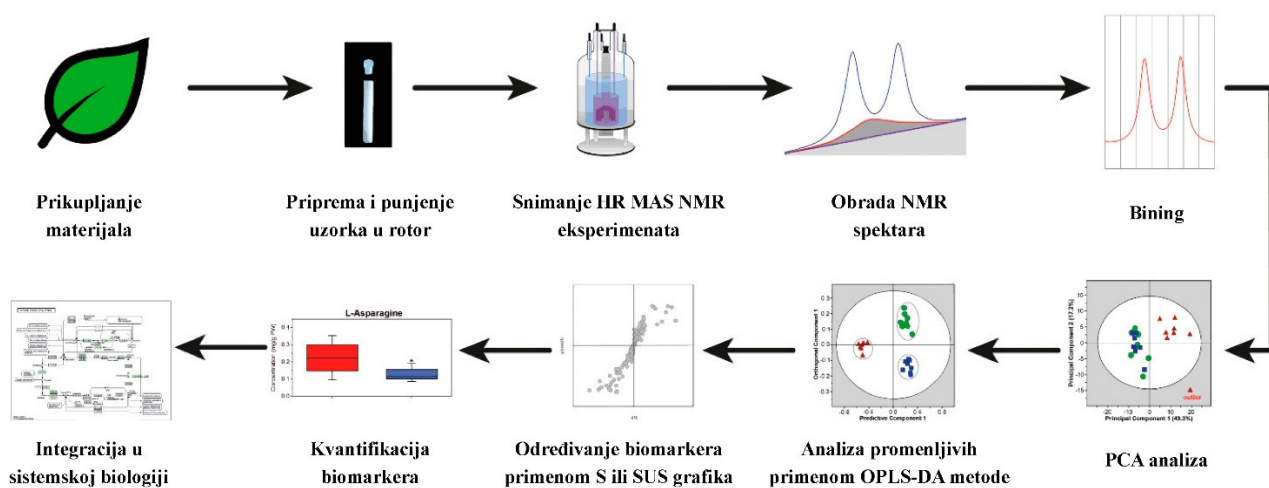
NMR eksperiment može se opisati sa Hamiltonianom nuklearnog spina<sup>64</sup>:

$$H = H_{CS} + H_D^{IS} + H_D^{II}$$

gde  $H_{CS}$  predstavlja anizotropnu interakciju jezgra sa elektronima koji ga okružuju,  $H_D^{IS}$  je heteronuklearno dipolarno kuplovanje između dva različita jezgra I i S, a  $H_D^{II}$  predstavlja

homonuklearno kuplovanje. Sve tri interakcije su u direktnoj zavisnosti od vrednosti  $(3\cos^2(\theta) - 1)$ , gde parametar  $\theta$  predstavlja magični ugao koji opisuje orijentaciju spoljašnjeg magnetnog polja  $B_0$  u okviru glavne ose tenzora hemijskog pomeranja i dipolarne interakcije. Kod ove tehnike, uzorci se brzo rotiraju pod „magičnim uglom” od  $54,7^\circ$ , pri čemu se poništava proširenje linija u spektru.<sup>64</sup> Iako anizotropne interakcije dovode do stvaranja bočno deformisanih signala („sidebendova”) usled rotacije, ovo je moguće poništiti rotacijom na frekvencijama bliskim i/ili višim od radne frekvencije magneta ( $>3$  kHz) pri čemu se dobija spektar sa ostrim i uskim signalima.<sup>64,74</sup>

Put jednog metabolomičkog eksperimenta dobijenog primenom HR MAS NMR tehnike prikazan je na **Slici 3**.<sup>64</sup> Iz prikupljenog biološkog materijala se uklanja voda, zatim se zamrzava i usitnjava do finog praha. Osušeni i usitnjeni materijal se nakvasi deuterisanom vodom do forme paste i pakuje u cirkonijumski rotor kako bi se započela HR MAS NMR analiza. Nakon snimanja spektara, dobijeni podaci se obrađuju. Obrada podataka podrazumeva poravnavanje (eng. alignment), korekciju bazne linije, pakovanje (eng. binning), normalizaciju i skaliranje.<sup>75,76</sup> Nakon toga, podaci su spremni za multivarijantnu analizu. Analiza se sastoji iz tri osnovna koraka: identifikacija promenljivih (varijabli), analiza promena u različitim uzorcima i odabir potencijalnih kandidata za biomarkere.<sup>64</sup>



**Slika 3.** Šematski prikaz metabolomičkog HR MAS NMR eksperimenta.<sup>64</sup>

### 1.8.1. Najznačajnije HR MAS NMR pulsne sekvence u metabolomici

Sve pulsne sekvence koje se primenjuju kod NMR tehnike tečnog stanja, mogu se primeniti i za HR MAS NMR eksperimente. Od 1D NMR metoda najviše se koriste  $^1\text{H}$ -NOESY (eng. Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) sa supersijom vode i  $^1\text{H}$ -CPMG (Carr–Purcell–Meiboom–Gill) eksperimenti.<sup>64</sup>  $^1\text{H}$ -NOESY spektar pruža uvid u kompletan kvantitativni profil metabolita sa poništenim (suprimovanim) signalom vode, bez uticaj na intenzitete ostalih signala u okolini. CPMG je pulsna sekvenca kojom se uklanjaju široki signali makromolekula, kao što su signali proteina i lipida.<sup>77</sup> U 1D NMR spektrima javlja se veliki broj signala različitih metabolita, koji su u najvećem broju slučajeva na bliskim hemijskim pomeranjima i preklopljeni. Da bi se ovaj problem prevazišao za identifikaciju pojedinačnih metabolita se primenjuju 2D NMR tehnike. Najčešće se koriste COSY (eng. Correlation Spectroscopy), TOCSY (eng. Total Correlation Spectroscopy) i 2D  $J$  razložna tehnika. U slučajevima kada je potrebno identifikovati nove metabolite, korisne su 2D heteronuklearne tehnike od kojih se najčešće primenjuju HSQC (eng. Heteronuclear Single-Quantum Correlation) i HMBC (eng. Heteronuclear Multiple-Bond Correlation).<sup>73</sup>



## 1.8.2. Odabrane HR MAS NMR metabolomičke studije

HR MAS NMR spektroskopija u kombinaciji sa multivarijantnom analizom predstavlja veoma moćnu alatku za metabolomiku. Ove tehnike danas imaju veliki potencijal i širok dijapazon primene, od analize novih materijala do primene u medicini. Primena HR MAS NMR spektroskopije u kliničkim ispitivanjima poslednjih godina se intenzivno razvija. Istraživači i lekari saraduju na primeni HR MAS NMR analitičke platforme za analizu metabolita nakon biopsije ljudskog tkiva u patološkim stanjima, najčešće kod karcinoma.<sup>73</sup> Primena HR MAS NMR spektroskopije u analizi biljnog materijala poslednjih godina je u porastu, pa je u daljem tekstu prikazan pregled literature, koja se bavi ovom tematikom.

Različite studije pokazale su uticaj biotičkog i abiotičkog stresa na metabolički profil biljaka.<sup>78-89</sup> Pored toga, primenom ove tehnike, praćene su promene metabolita tokom sazrevanja voća i povrća (manga i paradajza)<sup>90,91</sup>, zatim uticaj skladištenja na kvalitet jabuke sorte „Zlatni delišes”.<sup>92</sup> Ova tehnika omogućila je i proučavanje određenih ćelija biljaka.<sup>95</sup> Pored toga, ispitivanje metaboličkog profila je značajno za karakterizaciju novih vrsta ili mutanata kod biljaka.<sup>96,97</sup> Primenom HR MAS NMR spektroskopije ispitivano je geografsko poreklo slatke paprike, belog luka i kaka.<sup>101-103</sup> Određene namirnice sa zaštićenim geografskim poreklom takođe su bile predmet analiza, kako bi se izbegle prevare sa potencijalnim falsifikatima. Primer za to su ispitivanja čeri paradajza iz Pachina (Sicilija), limuna iz Messine (Sicilija) i paradajza iz Almerije (Španija).<sup>104-106</sup> Primenom ove tehnike moguće je odrediti različite hibride ili sorte biljaka, što je posebno važno ukoliko postoji potreba za njihovim intenzivnim gajenjem u medicinske, prehrambene ili industrijske svrhe.<sup>109-117</sup> Studije koje se bave metabolomikom biljaka baziranom na primeni HR MAS NMR spektroskopije predstavljeni su u **Tabeli 10**.<sup>64,94,108</sup>

**Tabela 10.** HR MAS NMR metabolomičke studije.

| Biljna vrsta   | Predmet istraživanja  | Pulsne sekvence   | Modeli multivarijantne analize |
|--|---|---|--------------------------------|
| <b>Ispitivanje uticaja biotičkog i abiotičkog stresa</b>                             |   |   |                                |
| Pšenica<br>( <i>Triticum aestivum</i> ) <sup>78</sup>                                | Uticaj različitih tretmana suše   | 1D  | PCA                            |
| Barbadoski oraščić<br>( <i>Jatropha curcas</i> ) <sup>79</sup>                       | Uticaj načina obrezivanja i zalivanja   | Zg  | -                              |
| Crna ribizla<br>( <i>Ribes nigrum</i> ) <sup>80</sup>                                | Uticaj sezonskog promjenljivog zagrevanja   | CPMG, HSQC  | PCA                            |
| Soja <sup>81</sup>   | Uticaj nedostatka vode  | CPMG, NOESY   | PLS-DA                         |
| Barbadoski oraščić<br>( <i>Jatropha curcas</i> ) <sup>82</sup>                       | Uticaj <i>Jatropha</i> mosaic virusa na metabolički profil                                  | NOESY, CPMG,<br>COSY  | -                              |
| Kruška ( <i>Pyrus communis</i> ) i<br>dunja ( <i>Cydonia oblonga</i> ) <sup>83</sup> | Uticaj huminske kiseline na morfogenezu kruške i dunje                                      | <sup>13</sup> C, CPMG, 1D LED,<br>COSY, TOCSY,<br>HSQC                              | PCA                            |
| Zelena salata<br>( <i>Lactuca sativa</i> ) <sup>84</sup>                             | Uticaj fungicida mancozeba na lišće tokom različitih faza rasta                             | NOESY, TOCSY,<br>HSQC   | PCA, PLS-DA                    |
| Paradajz<br>( <i>Solanum lycopersicum</i> ) <sup>85</sup>                            | Uticaj 6-pentil-2H-piran-2-ona i harzijske kiseline na lišće                                | CPMG, COSY,<br>TOCSY, 2DJ, HSQC,<br>HMBC  | PCA                            |
| Kukuruz<br>( <i>Zea mays</i> ) <sup>86</sup>   | Određivanje toksičnog uticaja organohlornih pesticida na koren kukuruza                     | CPMG  | OPLS-DA                        |
| Kukuruz<br>( <i>Zea mays</i> ) <sup>87</sup>   | Uticaj minerala ili đubriva i inokulacije sa arbuskularnim mikorznim gljivama               | CPMG, COSY,<br>TOCSY, 2DJ, HSQC,<br>HMBC  | PCA                            |
| Soja <sup>88</sup>   | Ispitivanje metaboličkih promena izazvanih infekcijom prouzrokovanom <i>S. sclerotiorum</i> | CPPR, TOCSY, HSQC   | PCA                            |
| Crni luk<br>( <i>Allium cepa</i> L.) <sup>89</sup>                                   | Utvrđivanje efekta virusa žutih patuljaka luka na metabolite                                | Zgpr  |                                |
| <b>Ispitivanje uticaja sazrevanja i skladištenja voća</b>                            |   |   |                                |
| Mango<br>( <i>Mangifera indica</i> ) <sup>90</sup>                                   | Metabolički profil pulpe od mangu tokom sazrevanja  | <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C korelisanane<br>tehnikе, TOCSY, 2DJ | -                              |
| Paradajz<br>( <i>Solanum lycopersicum</i> ) <sup>91</sup>                            | Ispitivanje različitih tkiva paradajza tokom sazrevanja                                     | NOESY, TOCSY,<br>HMQC   | PCA                            |
| Jabuke „Zlatni delišes” <sup>92</sup>  | Uticaj vremena skladištenja i sistema proizvodnje   | NOESY, COSY,<br>TOCSY   | PCA, PLS-DA                    |
| Ginseng <sup>93</sup>  | Određivanje starosti primenom metabolomike  | CPMG  | PCA, PLS-DA,<br>OPLS-DA        |

|   |  |   |                      |
|---|--|---|----------------------|
| Aglianico grožđe <sup>94</sup>  | Uticao terroir i efekta starenja pulpe grožđa sorte Aglianico                                    | <sup>1</sup> H, COSY, TOCSY, 2D <sub>J</sub> , HSQC, HMBC | PCA, PLS-DA          |
| <b>Ispitivanje različitih tipova ćelija biljaka</b>                               |  |   |                      |
| Limun ( <i>Citrus limon</i> ) i četrun ( <i>Citrus medica</i> ) <sup>95</sup>     | Određivanje metaboličkog profila različitih delova limuna i četruna                              | <sup>1</sup> H, CPMG, COSY, TOCSY, HSQC                   | -                    |
| <b>Karakterizacija biljaka</b>  |  |   |                      |
| Šafran ( <i>Crocus sativus</i> ) <sup>96</sup>                                    | Određivanje glavnih metabolita latica šafrana  | <sup>1</sup> H, COSY, TOCSY, HSQC, HMBC                   | -                    |
| Berberis laurina ( <i>Berberidaceae</i> ) <sup>97</sup>                           | Određivanje glavnih metabolita iz listova, stabljike i korena                                    | Zg, HSQC, HMBC  | PCA                  |
| <b>Razumevanje transgenetskih biljaka</b>   |  |   |                      |
| Topola ( <i>Populus tremula</i> ) <sup>98</sup>                                   | Ispitivanje metaboličkog profila u zavisnosti od vremena i rasta PttMYB76 i divljih vrsta topola | CPMG  | PCA, PLS-DA          |
| Pasulj ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) <sup>99</sup>                                | Razlikovanje konvencionalnog i transegenetskog pasulja   | CPMG  | PCA                  |
| Citrumelo <sup>100</sup>  | Određivanje metaboličkog profila netransgenetskog i transgenetskog citrumela                     | <sup>1</sup> H, TOCSY, HSQC                               | PCA, PLS-DA          |
| <b>Geografsko poreklo biljaka</b>   |  |   |                      |
| Slatka paprika ( <i>Capsicum annum</i> ) <sup>101</sup>                           | Razlikovanje slatkih paprika na osnovu njihovog geografskog porekla                              | NOESY, <sup>13</sup> C, TOCSY                             | PLS-DA               |
| Beli luk ( <i>Allium sativum</i> ) <sup>102</sup>                                 | Karakterizacija dve sorte belog luka iz različitih delova Italije                                | NOESY, <sup>13</sup> C, TOCSY, HMQC                       | PLS-DA               |
| Kakao <sup>103</sup>  | Određivanje geografskog porekla fermentisanih i osušenih zrna kakaa                              | <sup>1</sup> H  | PCA, PLS-DA, OPLS-DA |
| Čeri paradajz iz Paćina <sup>104</sup>  | Određivanja glavnih metabolite iz čeri paradajza iz Paćina                                       | <sup>1</sup> H  | PCA                  |
| PGI interdonato limun iz Mesine i crveni beli luk iz Nubia <sup>105</sup>         | Identifikacija i kvantifikacija metabolita tri tipična predstavnika u mediteranskoj ishrani      | <sup>1</sup> H  | PCA                  |
| PGI interdonato limun iz Mesine <sup>106</sup>                                    | Određivanje metabolita karakterističnih za PGI interdonato limun iz Mesine                       | <sup>1</sup> H, COSY, TOCSY, HSQC                         | -                    |
| Paradajz ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) <sup>107</sup>                        | Utvrđivanje različitih metabolite između komercijalno dostupnih varijanti                        | NOESY, HSQC   | PCA                  |
| Beli ( <i>Allium sativum</i> L) i crni luk ( <i>Allium cepa</i> L) <sup>108</sup> | Razlikovanje geografskog porekla crnog i belog luka  | <sup>1</sup> H  | PCA                  |

| Razlikovanje kultivara                                     |  |                              |                      |
|--|--|------------------------------|----------------------|
| <i>Trichilia catigua</i> <sup>109</sup>                    | Klasifikacija komercijalnih uzoraka Cataube                                      | CPMG                         | PCA, HCA             |
| <i>Withania somnifera</i> <sup>110</sup>                   | Određivanje metaboličkog profila četiri različita hemotipa<br><i>W.somnifera</i> | NOESY, CPMG,<br>COSY, HSQC   | PCA                  |
| Jabuke <sup>111</sup>                                      | Razlikovanje tri različite sorte jabuka na osnovu metaboličkog profila           | NOESY, COSY,<br>TOCSY        | PCA, PLS-DA          |
| Dinja <sup>112</sup><br>( <i>Cucumis melo</i> )            | Kvantifikacija šećera i poređenje dve sorte                                      | <sup>1</sup> H               | -                    |
| Riža<br>( <i>Oryza sativa</i> ) <sup>113</sup>             | Određivanje metaboličkih promena različitih kultivara riže                       | CPMG, TOCSY,<br>HSQC, STOCSY | PCA, OPLS-DA         |
| Kaki <sup>114</sup><br>( <i>Diospyros kaki</i> )           | Metaboličke promene tokom razvoja različitih kultivara                           | NOESY                        | PCA                  |
| Azijski ginseng <sup>115</sup><br>( <i>Panax ginseng</i> ) | Ispitivanje primarnih metabolita sedam kultivara ginseng bobica                  | CPMG                         | PCA, PLS-DA, OPLS-DA |
| Badem <sup>116</sup><br>( <i>Prunus dulcis</i> )           | Utvrđivanje razlika između sedam različitih vrsta badema                         | Zg, COSY                     | PCA                  |
| <i>Passiflora alata</i> <sup>117</sup>                     | Sedam lekovitih preparata sa ekstraktom lišća <i>Passiflora</i> vrsta            | Zg, COSY                     | PCA, KNN             |

## 2. NAŠI RADOVI

Ova doktorska disertacija je imala za ciljeve:

a) Analiziranje sadržaja sekundarnih metabolita triterpenskog tipa iz plodonosnih tela medicinske gljive *Fomitopsis betulina* sakupljenih u prirodi, sa nativnog supstrata i ispitivanje njihove biološke aktivnosti.

b) Određivanje metaboličkih profila plodonosnih tela ove gljive kultivisane na različitim podlogama. Povezivanje promena metaboličkih profila usled različite faze plodonošenja i prirode supstrata sa promenama u hemijskom sastavu.

Nativni materijal iz prirode je osušen i ekstrahovan po metodama detaljno opisanim u Eksperimentalnom delu. Početnim ekstrakcijama različitim rastvaračima izvršeno je grubo razdvajanje komponenti po polarnosti. Etil-acetatni ekstrakt, koji je bio najbogatiji triterpenskim kiselinama, je prečišćen hromatografijom na koloni. Finalno prečišćavanje, u cilju izolovanja čistih jedinjenja urađeno je reverzno-faznom visokoeфикаsnom hromatografijom (RP HPLC), primenom više različitih programa. Detaljni postupci ekstrakcije i hromatografskih razdvajanja opisani su u Eksperimentalnom delu (poglavlje 3.2.).

Nakon izolovanja čistih jedinjenja ispitane su njihove biološke aktivnosti, citotoksična aktivnost na ćelijama akutne promijelocitne leukemije (HL-60) i ćelijama adenokarcinoma pluća (A549), kao i DNK protektivna aktivnost na humanim leukocitima.

Strukture izolovanih jedinjenja određene su primenom 1D ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$ ) i 2D (COSY, TOCSY, 2DJ, NOESY, HSQC i HMBC) NMR spektroskopskih tehnika, kao i primenom IR spektroskopije, masene spektrometrije visoke rezolucije (HR-ESI-MS) i polarimetrije.

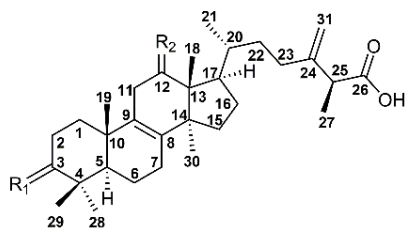
U ovom delu disertacije prikazano je detaljno određivanje strukture izolovanih jedinjenja, njihovi NMR spektri i rezultati masene spektrometrije. Predstavljani su rezultati bioloških testova i tabele sa hemijskim pomeranjima za svako jedinjenje. Ostali spektroskopski podaci dati su u Eksperimentalnom delu (poglavlje 3.2.7.).

Iz plodonosnih tela medicinske gljive *F. betulina* izolovano je 31 jedinjenje triterpenskog tipa, a od toga 13 (**19-31**) jedinjenja je po prvi put opisano u literaturi. Jedinjenja **19-29** poseduju isti 24-metilen-lanosta-8-enski skelet karboksilne kiseline, a podeljena su na dve grupe, na osnovu položaja karboksilne grupe, 26-lanostanske (**19-23**) i 21-lanostanske (**24-29**) kiseline. Jedinjenje **30** sadrži  $\Delta^{7,9(11)}$  dienski sistem, a jedinjenje **31** predstavlja derivat 3,4-*seco*-lanostana. Na **Slici 3** prikazane su strukture svih izolovanih jedinjenja.

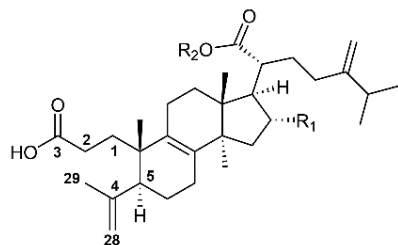
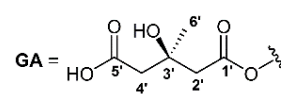
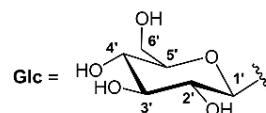
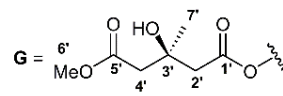
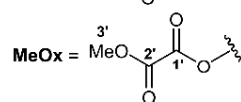
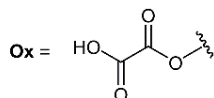
Prvi put su izolovani triterpenski glikozidi iz ove gljive (**27-29**), a jedinjenje **31** predstavlja prvi izolovan glikozid sa skeletom 24-metilen-3,4-*seco*-lanostana, koji nije opisan u literaturi. Jedinjenje **19** poseduje jedinstven tip supstituenta na triterpenskom skeletu, koji do sada nije opisan u literaturi.

Plodnosna tela *F. betulina* su kultivisana na četiri različita supstrata (podloge): (i) piljevina stabla breze (*Betula alba*), (ii) ruja (*Cotinus coggygria*), (iii) crne jove (*Alnus glutinosa*) i (iv) pečena unutrašnja ljuska lešnika (*Corylus avellana*). Piljevina breze je izabrana da bude kontrolni supstrat zato što *F. betulina* u prirodi raste na brezi. Piljevina ruja i crne jove su izabrane zbog svoje izrazite antioksidativne aktivnosti, dok je ljuska lešnika odabrana u cilju razvoja bezotpadne tehnologije prerade lešnika u prehrambenoj industiji. Kako su do sada plodnosna tela uspešno kultivisana samo na brezi, ovi rezultati predstavljaju prvu uspešnu kultivaciju *F. betulina* na alternativnim supstratima.

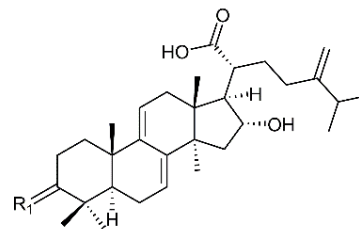
Na osnovu morfoloških karakteristika definisane su četiri faze rasta plodnosnih tela. Osušen, samleven materijal je dalje analiziran primenom FTIR i HR MAS NMR spektroskopskih tehnika. Obradom dobijenih rezultata u kombinaciji sa multivarijatnom analizom pokazalo se da u eksperimentima gajenja plodnosnih tela dolazi do promene metaboličkog profila zavisno od faze sazrevanja plodnosnih tela (faze plodonošenja) kao i do promene hemijskog sastava.



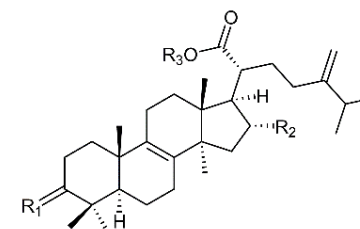
- 1. R<sub>1</sub> = α-G, β-H; R<sub>2</sub> = O
- 2. R<sub>1</sub> = α-GA, β-H; R<sub>2</sub> = α-OH, β-H
- 3. R<sub>1</sub> = α-G, β-H; R<sub>2</sub> = α-OH, β-H
- 4. R<sub>1</sub> = α-OH, β-H; R<sub>2</sub> = α-OH, β-H
- 19. R<sub>1</sub> = α-Ox, β-H; R<sub>2</sub> = α-OH, β-H
- 20. R<sub>1</sub> = α-MeOx, β-H; R<sub>2</sub> = α-OH, β-H
- 21. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> = α-OH, β-H
- 22. R<sub>1</sub> = α-OH, β-H; R<sub>2</sub> = O



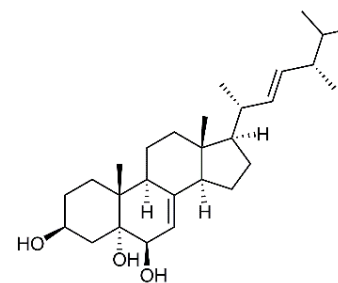
- 15. R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = H
- 16. R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = H
- 31. R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = Glc



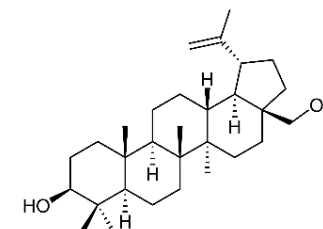
- 5. R<sub>1</sub> = β-OAc, α-H
- 6. R<sub>1</sub> = α-OAc, β-H
- 7. R<sub>1</sub> = β-OH, α-H
- 8. R<sub>1</sub> = α-OH, β-H
- 9. R<sub>1</sub> = O



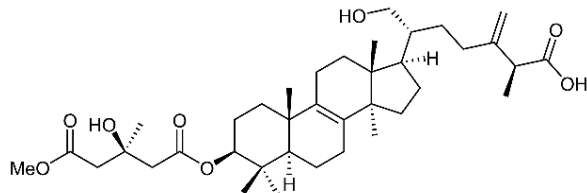
- 10. R<sub>1</sub> = β-OAc, α-H; R<sub>2</sub> = OH, β-H; R<sub>3</sub> = H
- 11. R<sub>1</sub> = α-OAc, β-H; R<sub>2</sub> = OH, β-H; R<sub>3</sub> = H
- 12. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub> = H
- 13. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> = OH, β-H; R<sub>3</sub> = H
- 14. R<sub>1</sub> = β-OH, α-H; R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub> = Glc
- 27. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub> = Glc
- 28. R<sub>1</sub> = β-OAc, α-H; R<sub>2</sub> = OH; R<sub>3</sub> = Glc
- 29. R<sub>1</sub> = α-G, β-H; R<sub>2</sub> = OH; R<sub>3</sub> = Glc



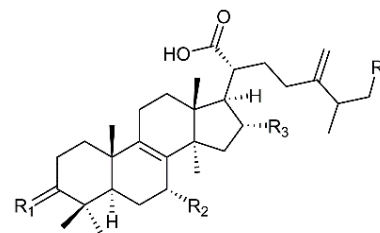
17



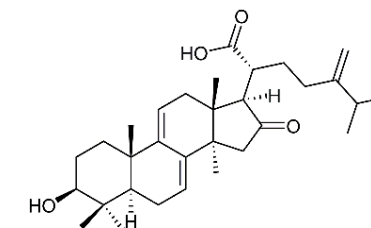
18



23



- 24. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH; R<sub>4</sub> = H
- 25. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> = OMe; R<sub>3</sub> = OH; R<sub>4</sub> = H
- 26. R<sub>1</sub> = O; R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = OH



30

Slika 4. Izolovana jedinjenja iz plodonosnih tela *Fomitopsis betulina*.

## 2.1. Identifikacija materijala

Identifikacija vrste određena je na osnovu makro- i mikromorfoloških karakteristika, a potvrđena je molekularnom analizom. Nakon izolacije DNK izvršena je amplifikacija *ITS* (interni transkribovani region) genskog regiona, prečišćeni produkti su sekvencirani a dobijene sekvence su upoređene sa drugim srodnim sekvencama u GenBank NCBI bazi sekvenci radi identifikacije. Na osnovu pretrage GenBank NCBI baze zaključeno je da sekvenca izolovane DNK *F. betulina* BEOFB1011 ima 99,84% nukleotidnog preklapanja sa gljivom *F. betulina* a sekvenca je nakon toga deponovana u bazi pod brojem MW130134 za *Fomitopsis betulina* BEOFB1011.

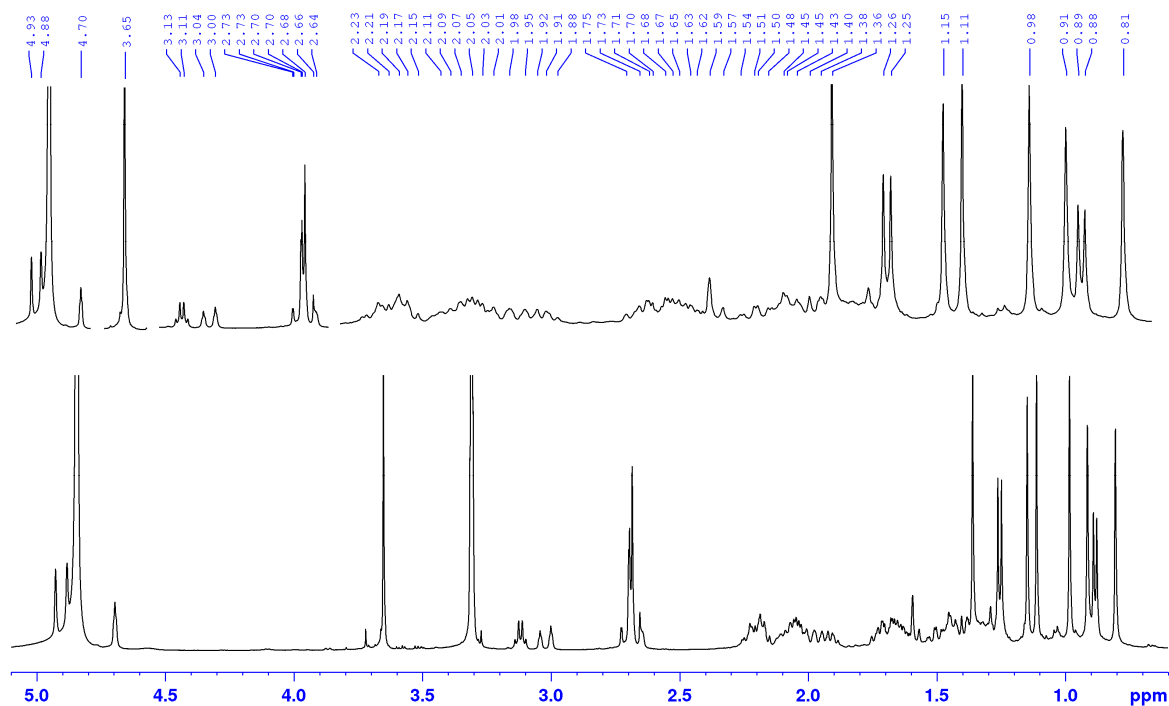
## 2.2. Izolovana jedinjenja triterpenskog tipa

Frakcionisanjem i prečišćavanjem etil-acetatnog ekstrakta plodonosnih tela izolovano je 31 jedinjenje triterpenskog tipa. Iz frakcije 18 izolovano je jedinjenje **18**. Jedinjenje **12** izolovano je iz frakcije 20. Iz frakcija 24-29 izolovana su jedinjenja **5**, **6** i **11**. Prečišćavanjem frakcija 30 i 31 izolovana su jedinjenja **9** i **10**. Iz frakcija 35-37 izolovana su jedinjenja **7**, **8**, **9**, **13** i **30**, a jedinjenja **1**, **3**, **16**, **20**, **21** i **22** su izolovana iz frakcija 41-44. Jedinjenja **3**, **4**, **24** i **25** su izolovana iz frakcija 47-49. Iz frakcija 50-52 su izolovana jedinjenja **14**, **15**, **17**, **23**, **26**, **27**, **28** i **29**. Jedinjenje **31** je izolovano iz frakcije 57, dok su jedinjenja **2** i **19** izolovana iz frakcije 65. Detaljni postupak izolovanja i prečišćavanja je dat u Eksperimentalnom delu, poglavlje 3.3.

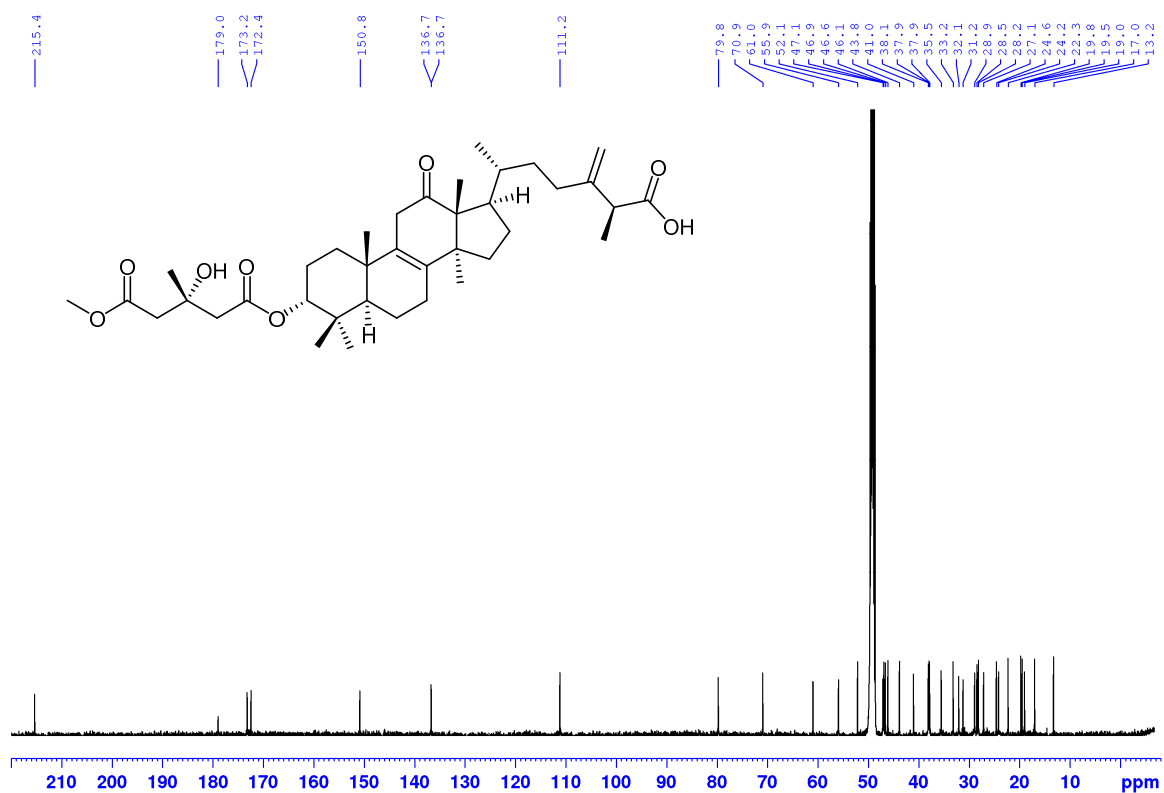
## 2.3. Određivanje strukture jedinjenja triterpenskog tipa

### 2.3.1. Određivanje strukture 3 $\alpha$ -(3'-hidroksi-4'-metoksikarbonil-3'-metilbutiriloksi)-12-okso-24-metilen-26-lanost-8-enske kiseline – palustriske kiseline F (1)

Jedinjenje **1** izolovano je kao bela čvrsta supstanca. Molekulska formula C<sub>38</sub>H<sub>58</sub>O<sub>8</sub> je dobijena iz HR-ESI-MS spektra na osnovu protonovanog molekuskog jona [M+H]<sup>+</sup> na *m/z* 643,4231. U <sup>1</sup>H NMR spektru (**Slika 5**, **Tabela 11**) jedinjenja **1** uočava se sedam singleta ( $\delta_H$  0,81; 0,91; 0,98; 1,11; 1,15; 1,37 i 3,66) i dva dubleta ( $\delta_H$  0,89 i 1,26) koji potiču od metil grupa. Na  $\delta_H$  4,70 prisutan je signal od metinskog protona pored kiseonika, a na  $\delta_H$  4,88 i 4,93 su signali vinilnih protona. Analiza <sup>13</sup>C spektra (**Slika 6**) pokazala je da se u molekulu nalaze dva oksigenovana ugljenikova atoma na  $\delta_C$  70,9 i 79,8 ppm, a na osnovu korelacija u HSQC NMR spektru potvrđeno je da  $\delta_C$  70,9 potiče od kvaternog ugljenikovog atoma. Pored toga, uočavaju se signali četiri olefinska ugljenika na  $\delta_C$  111,2, 136,6, 136,7 i 150,8, na osnovu kojih je zaključeno da se u molekulu nalaze dve dvostruke veze. Analizom signala olefinskih ugljenika (<sup>13</sup>C spektar) i protona iz (<sup>1</sup>H spektar) utvrđeno je prisustvo egzometilenske ( $\Delta^{24(31)}$ ) i tetrasupstituisane ( $\Delta^{8,9}$ ) dvostruke veze. Na  $\delta_C$  172,4 i 173,2 uočavaju se signali estarskih karbonilnih ugljenika, na  $\delta_C$  179,0 kiselinski i na  $\delta_C$  215,4 keto karbonilni ugljenik. Položaj karbonilnih ugljenika utvrđen je na osnovu HSQC i HMBC korelacija. Na osnovu položaja karbonilnih ugljenikovih atoma utvrđeno je da jedinjenje **1** predstavlja derivat 24-metilen-26-lanost-8-enske kiseline u kojoj je 3 $\alpha$ -hidroksilna grupa esterifikovana sa 5-*O*-metil-3-hidroksi-3-metilglutarnom kiselinom. Na osnovu svega navedenog, kao i poređenjem sa literaturinim podacima, zaključeno je da jedinjenje **1**, 3 $\alpha$ -(3'-hidroksi-4'-metoksikarbonil-3'-metilbutiriloksi)-12-okso-24-metilen-26-lanost-8-enska kiselina, palustriska kiselina F, jedinjenje ranije opisano u literaturi, prethodno izolovano iz gljive *F. palustris*.<sup>44</sup>



Slika 5.  $^1\text{H}$  NMR spektar (500 MHz, metanol- $d_4$ ) jedinjenja 1.



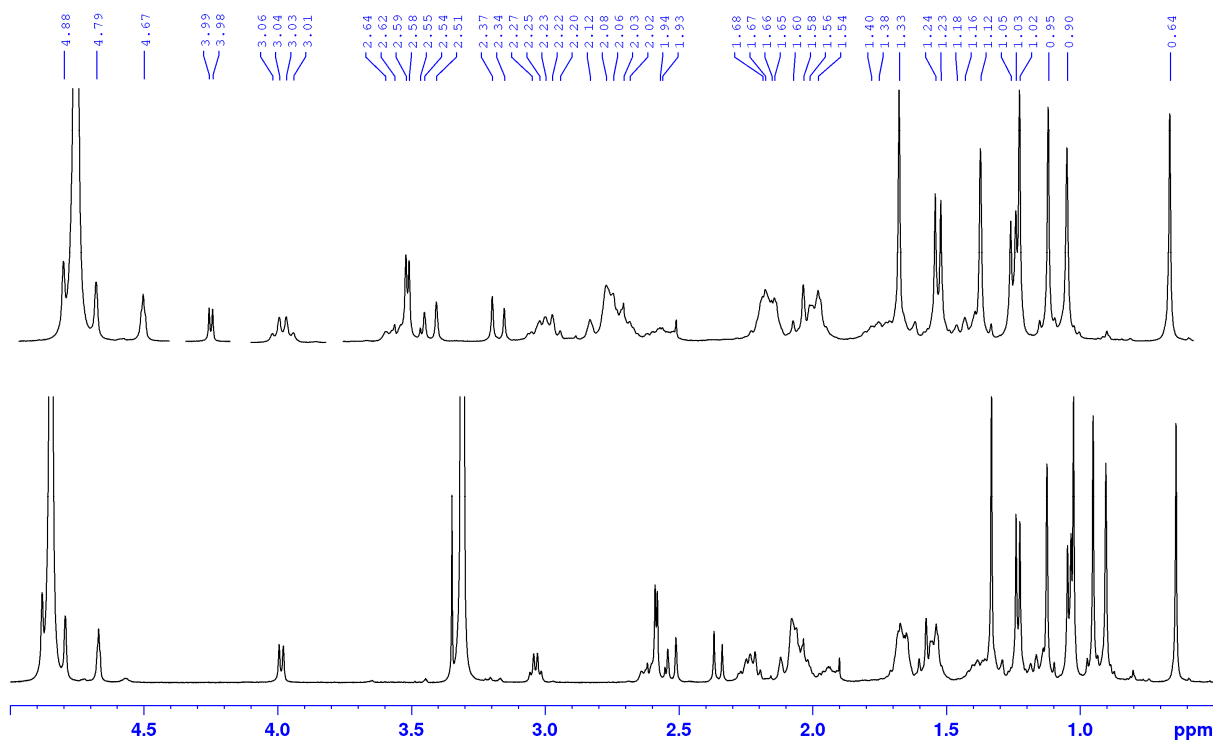
Slika 6.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (125 MHz, metanol- $d_4$ ) i struktura jedinjenja 1.

### 2.3.2. Određivanje strukture 3 $\alpha$ -(4-karboksi-3-hidroksi-3-metil-1-oksobutoksi)-12 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-26-lanost-8-enske kiseline (2)

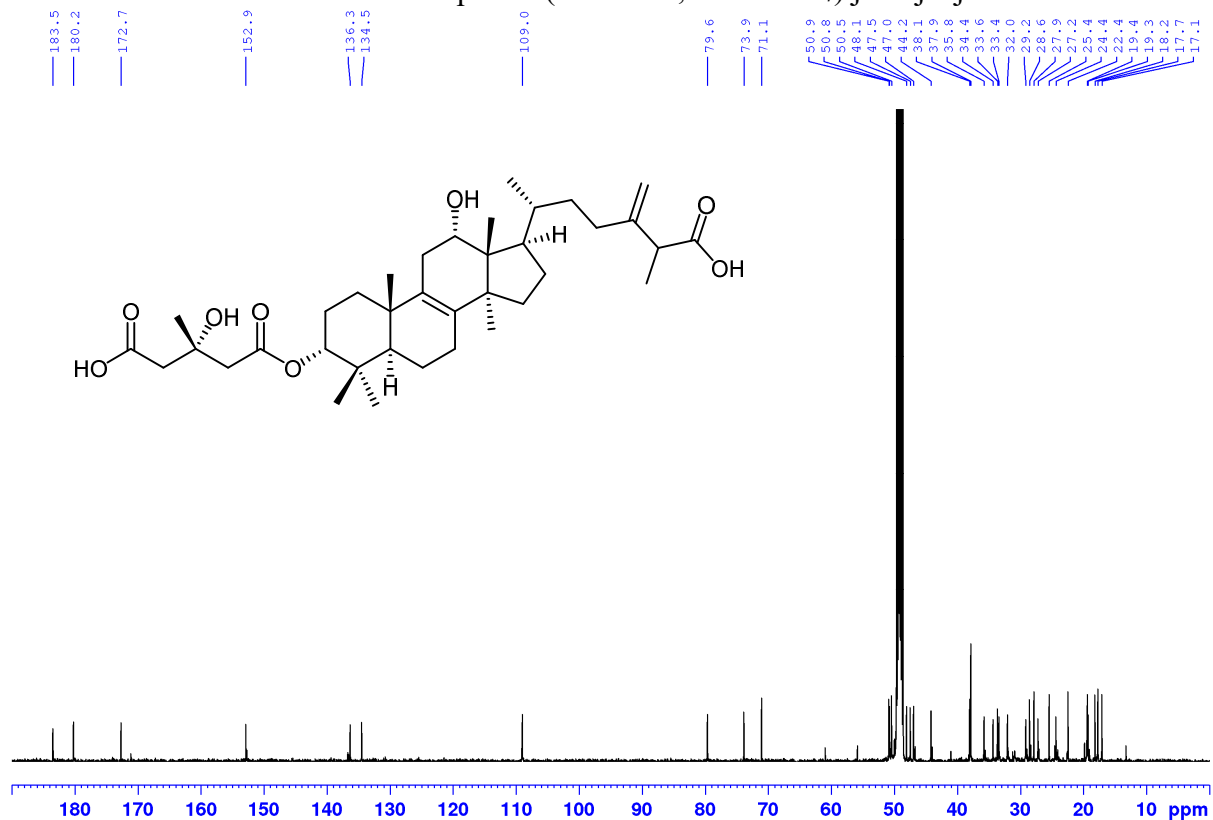
Jedinjenje 2 izolovano je kao bela amorfnu supstancu. Molekulska formula  $\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{O}_8$  određena je na osnovu deprotonovanog molekulskog jona  $[\text{M}-\text{H}]^-$  na  $m/z$  629,4060. U  $^1\text{H}$  NMR spektru (Slika 7) uočava se šest singleta ( $\delta_{\text{H}}$  0,64; 0,90; 0,95; 1,02; 1,12 i 1,33) i dva dubleta na  $\delta_{\text{H}}$  1,04 i 1,23, svi potiču od metil grupa. Signali protona iz oksimetinskih grupa prisutni su na  $\delta_{\text{H}}$  3,99 (d,  $J=7,8$  Hz) i



4,67 (brs), dok se na  $\delta_H$  4,79 i 4,88 ppm uočavaju signali dva olefinska protona egzometilenske dvostruke veze  $\Delta^{24(31)}$ . U  $^{13}C$  NMR spektru (Slika 8, Tabela 11) javljaju se tri signala oksigenovanih ugljenika na  $\delta_C$  71,1, 73,9 i 79,6, kao i signali na  $\delta_C$  172,7, 180,2 i 183,5 ppm, koji potiču od tri karbonylne grupe. Na osnovu njihovih korelacija u HMBC spektru ustanovljeno je da su u molekulu prisutne dve karboksilne i jedna estarska grupa i određen je njihov položaj. Prikazani spektralni podaci ukazuju na strukturu 3 $\alpha$ -(4-karboksi-3-hidroksi-3-metil-1-oksobutoksi)-12 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-26-lanost-8-enske kiselina, jedinjenja prethodno izolovanog iz iste gljive.<sup>54</sup>



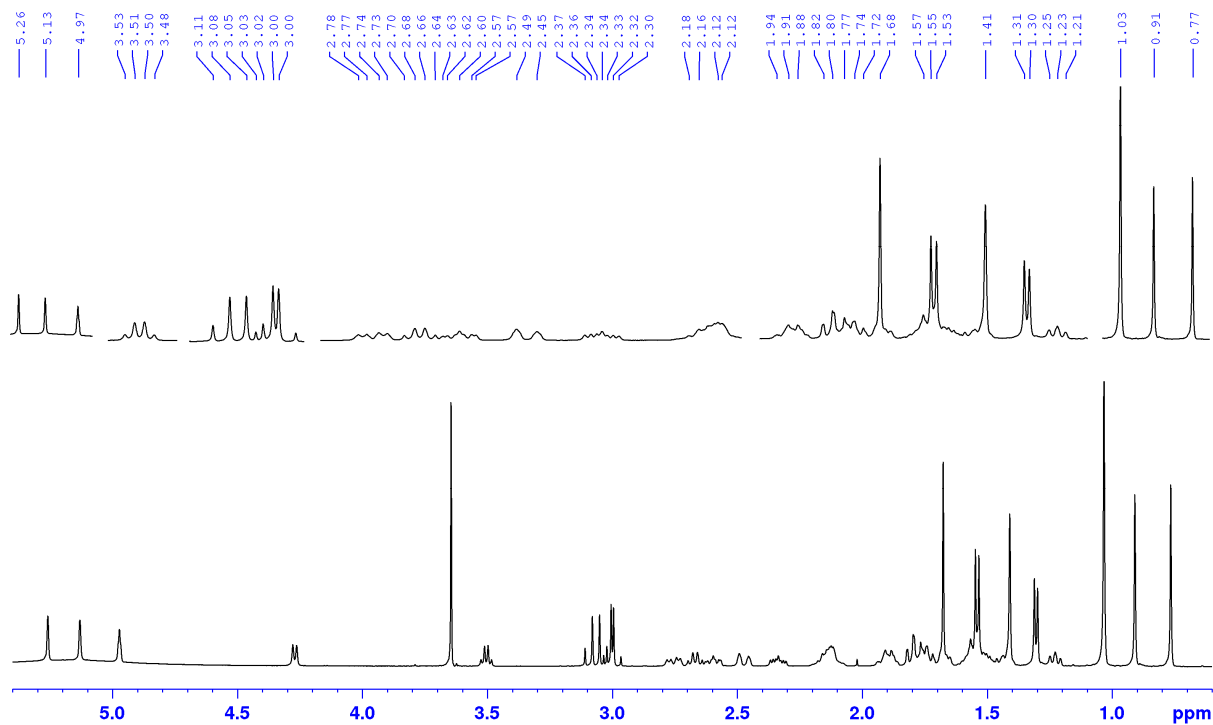
Slika 7.  $^1H$  NMR spektrar (500 MHz, metanol- $d_4$ ) jedinjenja 2.



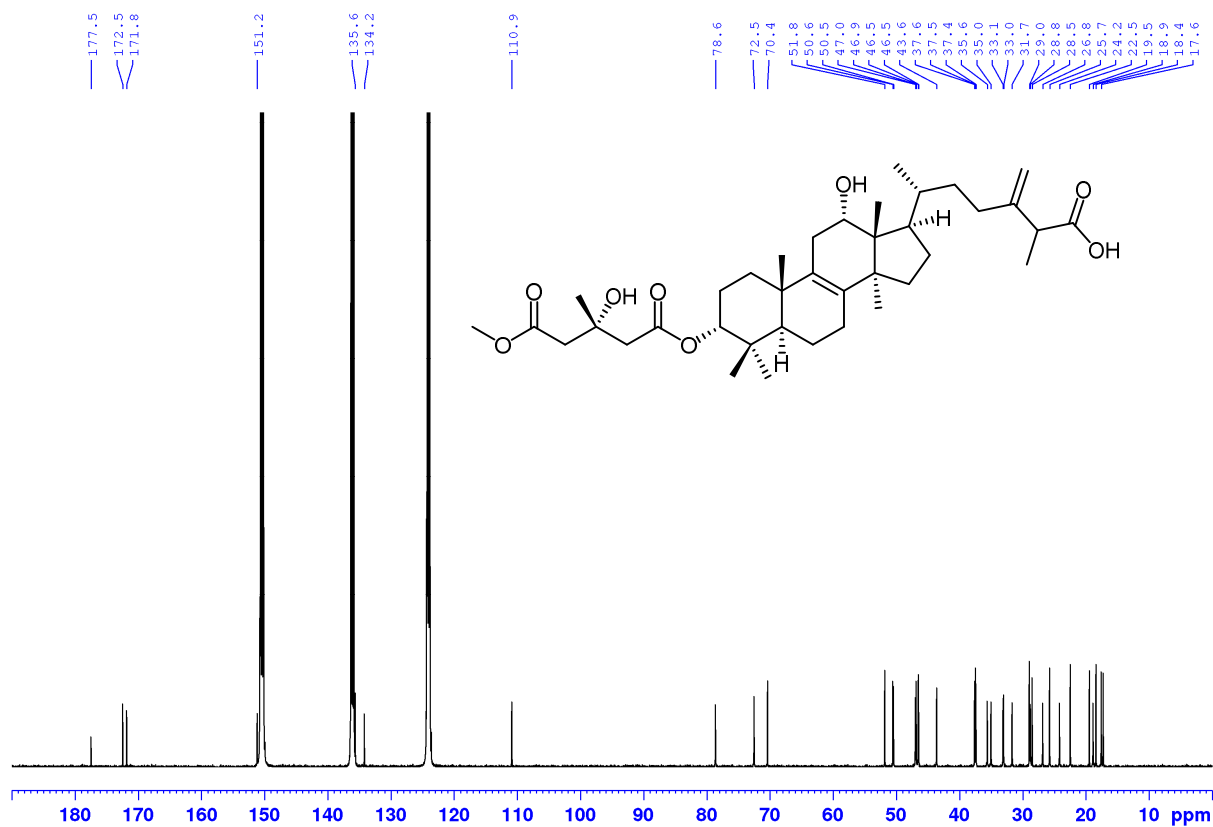
Slika 8.  $^{13}C$  NMR spektrar (125 MHz, metanol- $d_4$ ) i struktura jedinjenja 2.

### 2.3.3. Određivanje strukture 3 $\alpha$ -(3'-hidroksi-4'-metoksikarbonil-3'-metilbutiriloksi)-12 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-26-lanost-8-enske kiseline (3)

Jedinjenje 3 izolovano je kao bela uljasta supstanca. Na osnovu protonovanog molekuskog jona  $[M+H]^+$  na  $m/z$  645,4357 iz HR-ESI-MS spektra, dobijena je molekulska formula  $C_{38}H_{60}O_8$ .  $^1H$  NMR i  $^{13}C$  NMR podaci (Tabela 11) jedinjenja 3 su veoma slični kao za jedinjenje 2.



Slika 9.  $^1H$  NMR spektar (500 MHz, piridin- $d_5$ ) jedinjenja 3.



Slika 10.  $^{13}C$  NMR spektar (125 MHz, piridin- $d_5$ ) i struktura jedinjenja 3.

Poređenjem  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektara (**Slike 7-10**) uočeni su dodatni signali na  $\delta_{\text{H}}$  3,64 s i  $\delta_{\text{C}}$  51,8, koji ukazuju na prisustvo metoksi grupe u strukturi, što je takođe u saglasnosti sa podacima iz masenog spektra jedinjenja **3**. Na osnovu HMBC korelacija pomenutih signala, utvrđeno je prisustvo 4'-metil estra, umesto karboksilne grupe kod jedinjenja **2**. Na osnovu spektralnih podataka, zaključeno je da jedinjenje **3** ima strukturu 3 $\alpha$ -(3'-hidroksi-4'-metoksikarbonil-3'-metilbutiriloksi)-12 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-26-lanost-8-enske kiseline, prethodno izolovane iz ove gljive.<sup>54</sup>

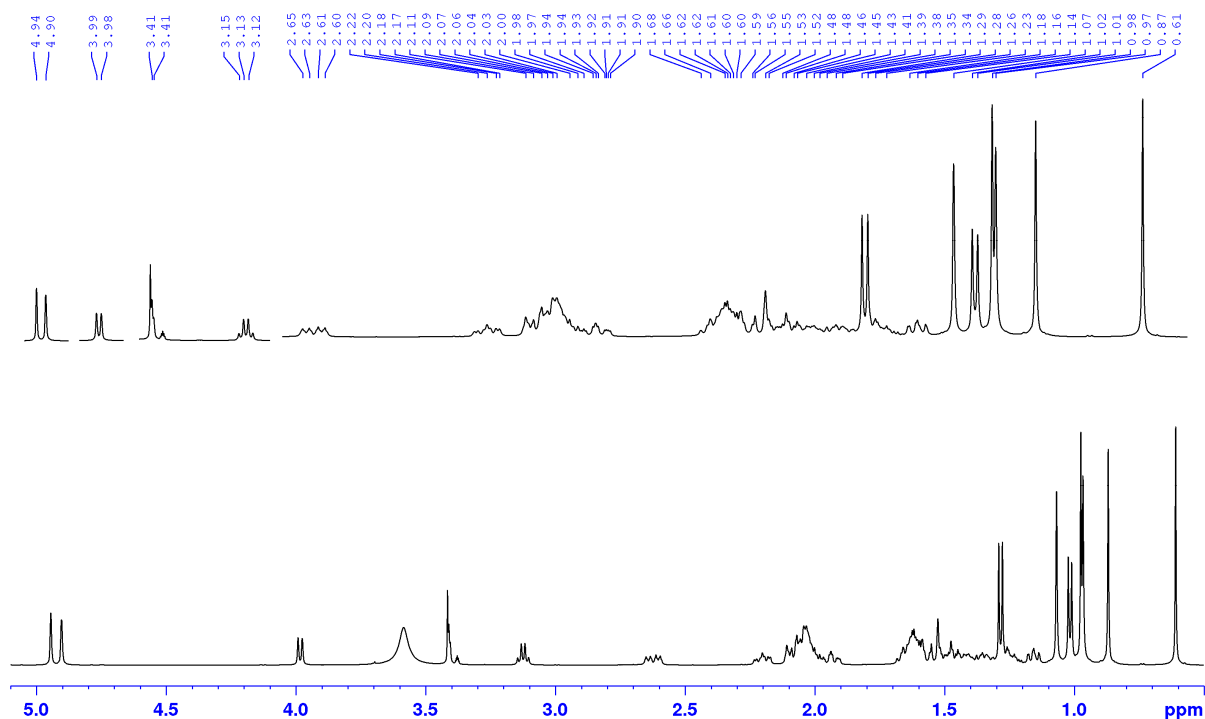
**Tabela 11.**  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) i  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) podaci jedinjenja **1**, **2** i **3**.

| C/H | <b>1<sup>a</sup></b> |                              | <b>2<sup>a</sup></b> |                              | <b>3<sup>b</sup></b> |                              |
|-----|----------------------|------------------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|------------------------------|
|     | $\delta_{\text{C}}$  | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz) | $\delta_{\text{C}}$  | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz) | $\delta_{\text{C}}$  | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz) |
| 1   | 32,1                 | 1,48 m (2H)                  | 32,1                 | 1,54 m                       | 31,7                 | 1,54 m; 1,74 m               |
| 2   | 24,2                 | 1,69 m; 1,98 m               | 24,4                 | 1,60 m; 1,94 m               | 24,2                 | 1,78 m; 1,90 m               |
| 3   | 79,8                 | 4,69 brs                     | 79,6                 | 4,67 brs                     | 78,6                 | 4,96 brs                     |
| 4   | 37,9                 | -                            | 38,1                 | -                            | 37,5                 | -                            |
| 5   | 46,9                 | 1,60 m                       | 47,0                 | 1,57 m                       | 46,5                 | 1,81 m                       |
| 6   | 19,0                 | 1,64 m; 1,74 m               | 19,3                 | 1,54 m; 1,66 m               | 18,9                 | 1,52 m; 1,67 m               |
| 7   | 27,1                 | 2,10 m; 2,21 m               | 27,2                 | 2,07 m                       | 26,8                 | 2,12 (2H) m                  |
| 8   | 136,7                | -                            | 136,3                | -                            | 134,2                | -                            |
| 9   | 136,7                | -                            | 134,5                | -                            | 135,6                | -                            |
| 10  | 38,1                 | -                            | 31,7                 | -                            | 37,6                 | -                            |
| 11  | 41,1                 | 2,67 m; 3,02 d (20,1)        | 34,4                 | 2,10 m; 2,60 m               | 35,1                 | 2,48 m; 2,76 m               |
| 12  | 215,4                | -                            | 73,9                 | 4,0 d (7,8)                  | 72,5                 | 4,26 d (7,6)                 |
| 13  | 61,0                 | -                            | 50,8                 | -                            | 50,5                 | -                            |
| 14  | 55,9                 | -                            | 50,9                 | -                            | 50,6                 | -                            |
| 15  | 31,2                 | 1,38 m; 1,92 m               | 33,4                 | 1,16 m; 1,68 m               | 33,1                 | 1,23 m; 1,75 m               |
| 16  | 28,9                 | 1,44 m; 2,06 m               | 29,1                 | 1,35 m; 2,05 m               | 28,8                 | 1,43 m; 2,14 m               |
| 17  | 43,8                 | 2,19 m                       | 44,2                 | 2,22 m                       | 43,6                 | 2,67 m                       |
| 18  | 13,2                 | 1,11 s                       | 17,1                 | 0,64 s                       | 17,3                 | 0,76 s                       |
| 19  | 19,5                 | 1,15 s                       | 19,4                 | 1,03 s                       | 19,4                 | 1,03 s                       |
| 20  | 37,8                 | 1,34 m                       | 37,9                 | 1,40 m                       | 37,4                 | 1,50 m                       |
| 21  | 19,8                 | 0,88 d (6,4)                 | 18,2                 | 1,04 d (6,4)                 | 18,4                 | 1,30 d (6,4)                 |
| 22  | 35,5                 | 1,27 m; 1,67 m               | 35,8                 | 1,23 m; 1,66 m               | 35,6                 | 1,50 m; 1,89 m               |
| 23  | 33,2                 | 2,05 m; 2,23 m               | 33,6                 | 2,04 m; 2,25 m               | 33,0                 | 2,34 m; 2,60 m               |
| 24  | 150,8                | -                            | 152,9                | -                            | 151,2                | -                            |
| 25  | 47,1                 | 3,12 q (7,0)                 | 50,5                 | 3,03 q (7,0)                 | 47,0                 | 3,50 q (7,0)                 |
| 26  | 179,0                | -                            | 183,5                | -                            | 177,5                | -                            |
| 27  | 17,0                 | 1,26 d (7,0)                 | 17,7                 | 1,24 d (7,0)                 | 17,6                 | 1,54 d (7,0)                 |
| 28  | 28,5                 | 0,98 s                       | 28,6                 | 0,90 s                       | 28,8                 | 1,03 s                       |
| 29  | 22,3                 | 0,91 s                       | 22,4                 | 0,95 s                       | 27,5                 | 0,91 s                       |
| 30  | 24,6                 | 0,81 s                       | 25,4                 | 1,13 s                       | 25,7                 | 1,40 s                       |
| 31  | 111,2                | 4,88 brs; 4,92 brs           | 109,0                | 4,79 brs; 4,88 brs           | 110,9                | 5,12 brs; 5,25 brs           |
| 3-  |                      |                              |                      |                              |                      |                              |
| 1'  | 172,4                | -                            | 172,7                | -                            | 171,8                | -                            |
| 2'  | 46,6                 | 2,67 m                       | 47,5                 | 2,60 m                       | 46,9                 | 2,98 d; 3,02 d (14,8)        |
| 3'  | 70,9                 | -                            | 71,1                 | -                            | 70,4                 | -                            |
| 4'  | 46,1                 | 2,65 m                       | 48,1                 | 2,35 d; 2,52 d (15,3)        | 46,5                 | 3,03 d; 3,08 d (14,8)        |
| 5'  | 173,2                | -                            | 180,2                | -                            | 172,5                | -                            |
| 6'  | 52,1                 | 3,65 s                       | 27,9                 | 1,33 s                       | 51,8                 | 3,64 s                       |
| 7'  | 28,2                 | 1,36 s                       |                      |                              | 28,9                 | 1,67 s                       |

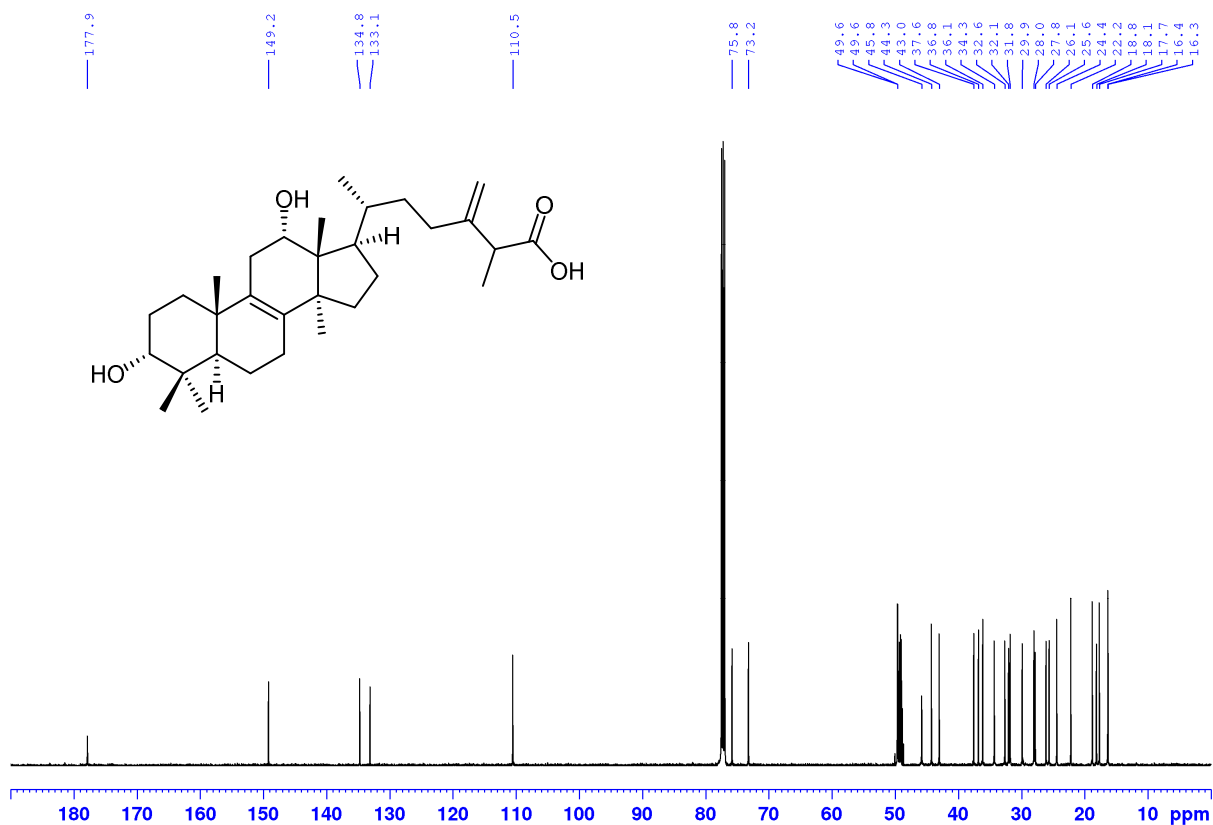
<sup>a</sup> Metanol-*d*<sub>4</sub>, <sup>b</sup> Piridin-*d*<sub>5</sub>

### 2.3.4. Određivanje strukture 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-24-metilen-26-lanost-8-enske kiseline – poliporenske kiseline A (4)

Jedinjenje **4** izolovano je kao bela kristala supstanca. Molekulska formula C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>O<sub>4</sub> dobijena je na osnovu HR-ESI-MS spektra, iz deprotonovanog molekuskog jona [M-H]<sup>-</sup> na *m/z* 485,3651. U <sup>1</sup>H NMR spektru (Slika 11, Tabela 12) uočavaju se signali olefinskih protona na  $\delta_H$  4,90 i 4,94, koji potiču od egzometilenske dvostruke veze  $\Delta^{24(31)}$ , a dva signala od oksigenovanih metinskih grupa nalaze se na  $\delta_H$  3,41 i 3,98 (d, *J*=8,0 Hz). Na  $\delta_H$  0,61; 0,87; 0,97; 0,98 i 1,07 nalazi se pet singleta i dva dubleta na  $\delta_H$  1,01 i 1,29, koji potiču od metil grupa. U <sup>13</sup>C NMR spektru (Slika 12), signali na  $\delta_C$  73,2 i 75,8 potiču od oksigenovanih ugljenikovih atoma, što je u saglasnosti sa podacima iz protonskog spektra. Na osnovu analize NMR podataka zaključeno je da jedinjenje **4** pripada grupi derivata 24-metilen-26-lanost-8-enske kiseline. Korelacije protonskih signala na  $\delta_H$  3,41 i 3,98 u HMBC spektru, ukazuju na to da se u položajima C-3 i C-12 nalaze hidroksilne grupe. Poređenjem sa literaturnim podacima utvrđeno je da je jedinjenje **4** 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroksi-24-metilen-26-lanost-8-enska kiselina, poliporenska kiselina A, ranije izolovana iz ove gljive.<sup>54</sup>



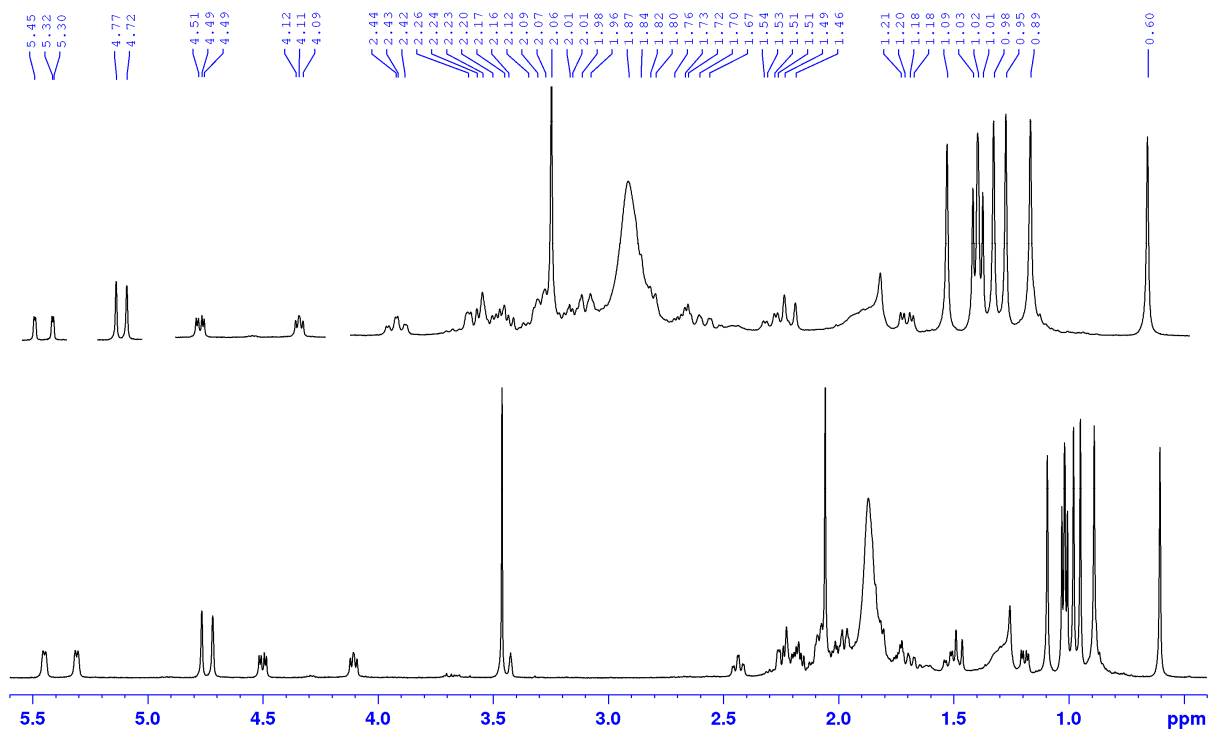
Slika 11. <sup>1</sup>H NMR spektar (500 MHz, smeša metanol-*d*<sub>4</sub> i hlороform-*d*) jedinjenja **4**.



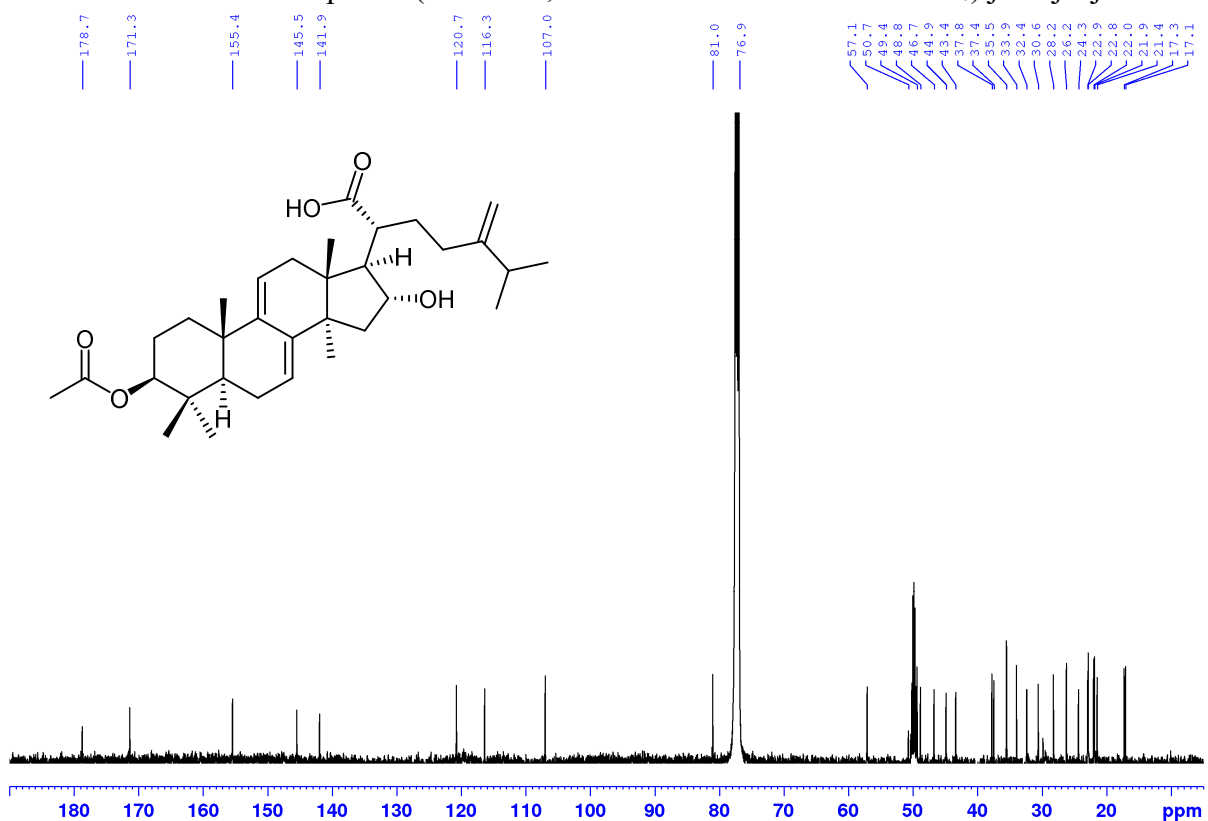
**Slika 12.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (125 MHz, smeša metanol- $d_4$  i hloroform- $d$ ) i struktura jedinjenja 4.

### 2.3.5. Određivanje strukture 3 $\beta$ -(acetiloksi)-16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-24-lanost-7,9(11)-dienske kiseline – dehidropahiminske kiseline (5)

Jedinjenje **5** izolovano je kao bela kristalna supstanca. Molekulska formula  $\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{O}_5$  dobijena je na osnovu HR-ESI-MS spektra, iz deprotonovanog molekulskog jona  $[\text{M}-\text{H}]^-$  na  $m/z$  525,3585. U  $^1\text{H}$  NMR spektru (**Slika 13**, **Tabela 12**) jasno se uočavaju singleti ( $\delta_{\text{H}}$  0,60; 0,88; 0,95; 0,98 i 2,05) i dva dubleta na  $\delta_{\text{H}}$  1,01 i 1,02 (d,  $J=6,4$  Hz, za oba signala) koji potiču od metil grupa, dva signala od oksigenovanih metinskih grupa na  $\delta_{\text{H}}$  4,11 ppm (dd,  $J_1=9,0$ ,  $J_2=6,3$  Hz) i 4,50 (dd,  $J_1=11,6$ ,  $J_2=4,4$  Hz) i četiri signala od olefinskih protona na  $\delta_{\text{H}}$  4,72 (brs), 4,76 (brs), 5,31 (d,  $J=5,9$  Hz) i 5,45 (d,  $J=5,1$  Hz). U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru (**Slika 14**) na  $\delta_{\text{C}}$  81,0 prisutan je signal oksigenovanog ugljenikovog atoma, šest olefinskih ugljenikovih atoma u oblasti  $\delta_{\text{C}}$  107,0-155,4 ukazuju na prisustvo tri dvostruke veze u molekulu. Analizom 2D spektara, utvrđen je njihov položaj u molekulu, tako da jedinjenje **5** ima  $\Delta^{7,9(11)}$  dvostruke veze i predstavlja derivat 24-metilen-21-lanost-7,9(11)-dienske kiseline. Preostali olefinski signali potiču od egzometilenske veze  $\Delta^{24(31)}$ , karakteristične za bočni niz lanostanskog triterpena. Pored prethodno navedenih, u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru (**Slika 14**) prisutni su i signali na  $\delta_{\text{C}}$  171,4, koji potiče od estarskog karbonila, kao i signal kiselinskog karbonilnog ugljenika sa C-21 na  $\delta_{\text{C}}$  178,7. Poređenjem sa literaturim podacim utvrđeno je da jedinjenje **5** predstavlja 3 $\beta$ -(acetiloksi)-16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-21-lanost-7,9(11)-diensku kiselinu, dehidropahiminsku kiselinu, prethodno izolovanu iz gljive *Poria cocos*.<sup>118</sup>



Slika 13.  $^1\text{H}$  NMR spektar (500 MHz, smeša hloroform- $d$  i metanol- $d_4$ ) jedinjenja 5.

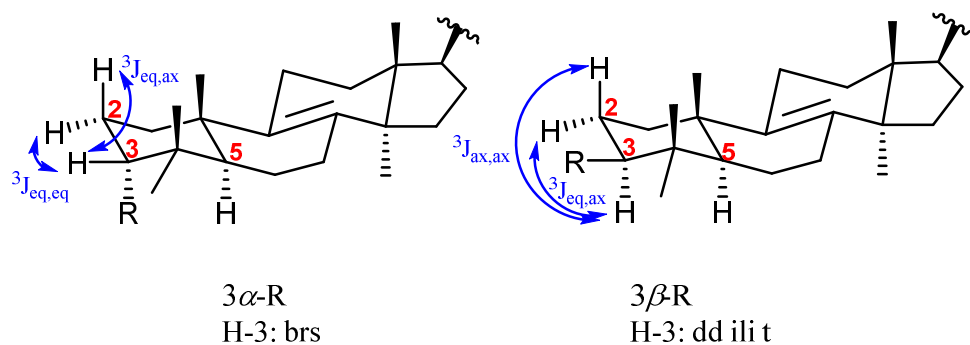


Slika 14.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (125 MHz, smeša hloroform- $d$  i metanol- $d_4$ ) i struktura jedinjenja 5.

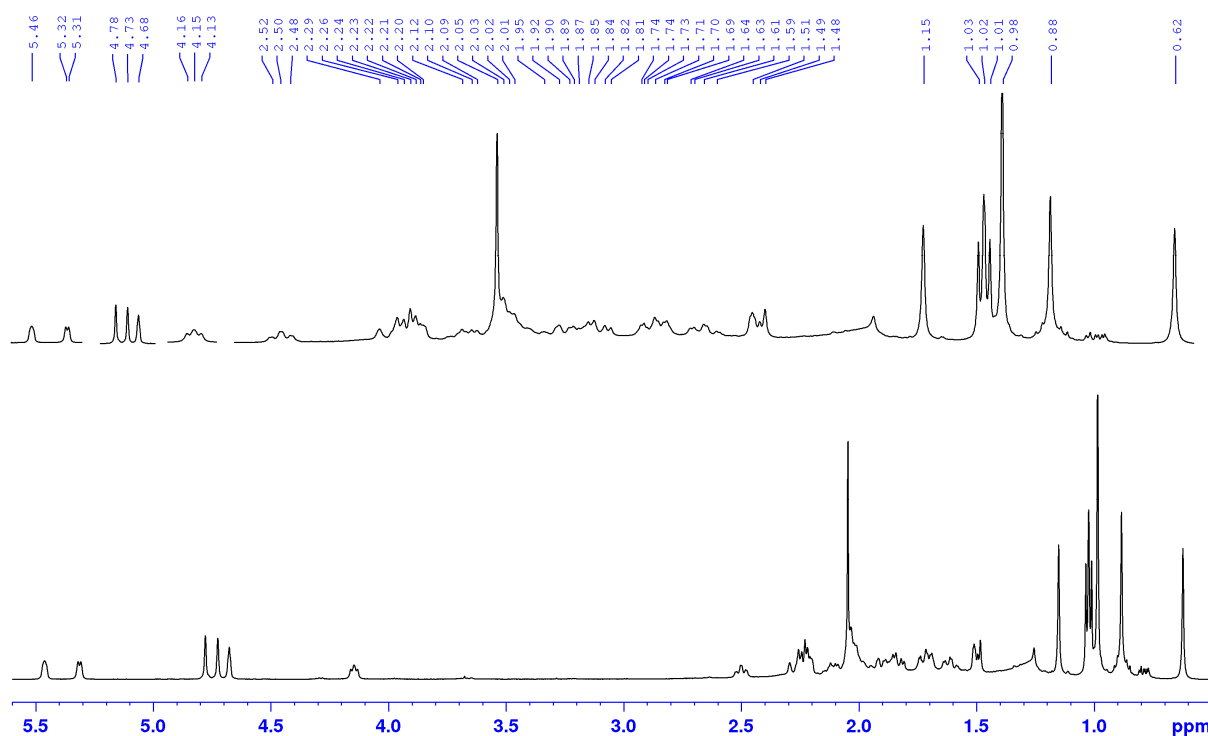
### 2.3.6. Određivanje strukture 3 $\alpha$ -(acetiloksi)-16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-21-lanost-7, 9(11)-dienske kiseline – 3-*epi*-dehidropahiminske kiseline (6)

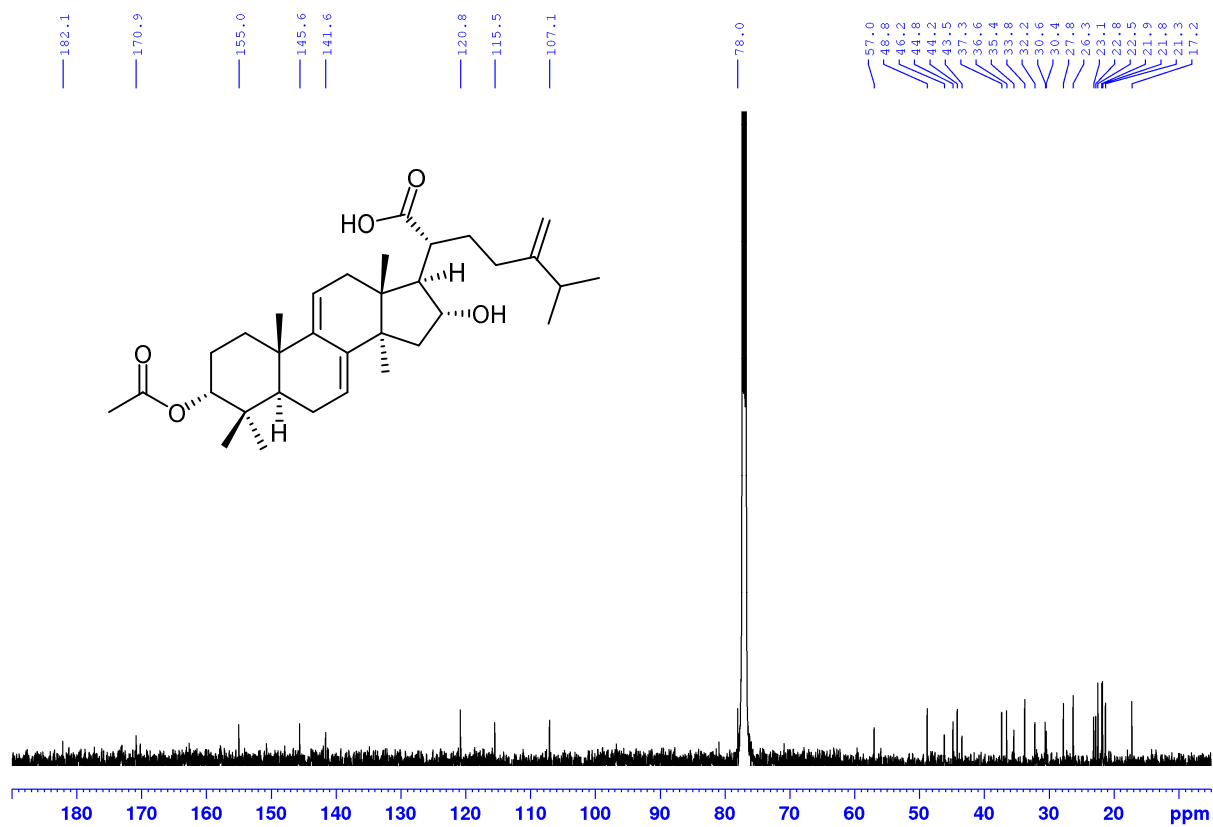
Jedinjenje 6 izolovano je kao bela kristalna supstanca. Molekulska formula  $\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{O}_5$ , dobijena je iz HR-ESI-MS spektra, na osnovu protonovanog molekulskog jona  $[\text{M}+\text{H}]^+$  na  $m/z$  527,3743. Analizom NMR spektara (Slike 16 i 17) ustanovljena je velika sličnost sa jedinjenjem 5

(**Tabela 12**). Jedinjenje **6** je derivat 24-metilen-21-lanost-7,9(11)-dienske kiseline, sa istim susptituentima na lanostanskom skeletu kao kod jedinjenja **5**. Najveća razlika uočava se u izgledu i hemijskom pomeranju signala protona H-3. Kod jedinjenja **6** on se nalazi na višem hemijskom pomeranju sa drugačijim multiplicitetom ( $\delta_H$  4,68, brs) u odnosu na proton sa istog položaja u jedinjenju **5** ( $\delta_H$  4,50, dd). Na osnovu analize 2D NOESY spektra, utvrđena je  $\alpha$ -orijentacija 3-OAc supstituenta. Različitom relativnom konfiguracijom na C-3 objašnjava se razlika u hemijskom pomeranju i multiplicitetu H-3 protona. Kod triterpena lanostanskog tipa postoji jasno definisan model kuplovanja H-3 protona (**Slika 15**) koji je u direktnoj zavisnosti od njegove orijentacije ( $\alpha$  ili  $\beta$ ). Kada je u pitanju H-3 $\alpha$ , kuplovanje sa susednim protonima iz diastereotopne metilenske grupe (H<sub>2</sub>-2) ostvaruje se putem ekvatorijalno-ekvatorijalnom ( $^3J_{eq,eq}$ ) i ekvatorijalno-aksijalnom ( $^3J_{eq,ax}$ ) interakcije. Vrednost pomenutih konstanti je slična,  $^3J_{eq,eq} = 2-5$  Hz i  $^3J_{eq,ax} = 2-6$  Hz, usled sličnih torzionih uglova protona koji se međusobno sprežu. U drugom slučaju, kod H-3 $\beta$  protona, dolazi do aksijalno-aksijalno ( $^3J_{ax,ax}$ ) i ekvatorijalno-aksijalno ( $^3J_{eq,ax}$ ) kuplovanja, sa većom vrednosti  $^3J_{ax,ax} = 8-13$  Hz konstante kuplovanja, što je posledica većeg torzionog ugla od približno 180° (Karplusova kriva) između ovih protona sa susedne metilenske grupe. Usled veće  $^3J_{ax,ax}$  konstante kuplovanje dolazi do pojave jasnog multipliciteta posmatranog signala kod H-3 $\beta$  protona. Ovaj fenomen prisutan je kod jedinjenja **5** i **6**. Na osnovu svega navedenog, zaključeno je da jedinjenje **6** predstavlja 3 $\alpha$ -(acetiloksi)-16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-21-lanost-7,9(11)-diensku kiselinu, poznatu i kao 3-epi-dehidropahiminska kiselina, koja je prethodno izolovana iz *F. betulina*.<sup>59</sup>



**Slika 15.** Model kuplovanja protona H-3 $\alpha$  i H-3 $\beta$  kod lanostanskih triterpena.





Slika 17.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (125 MHz, hloroform-*d*) i struktura jedinjenja 6.



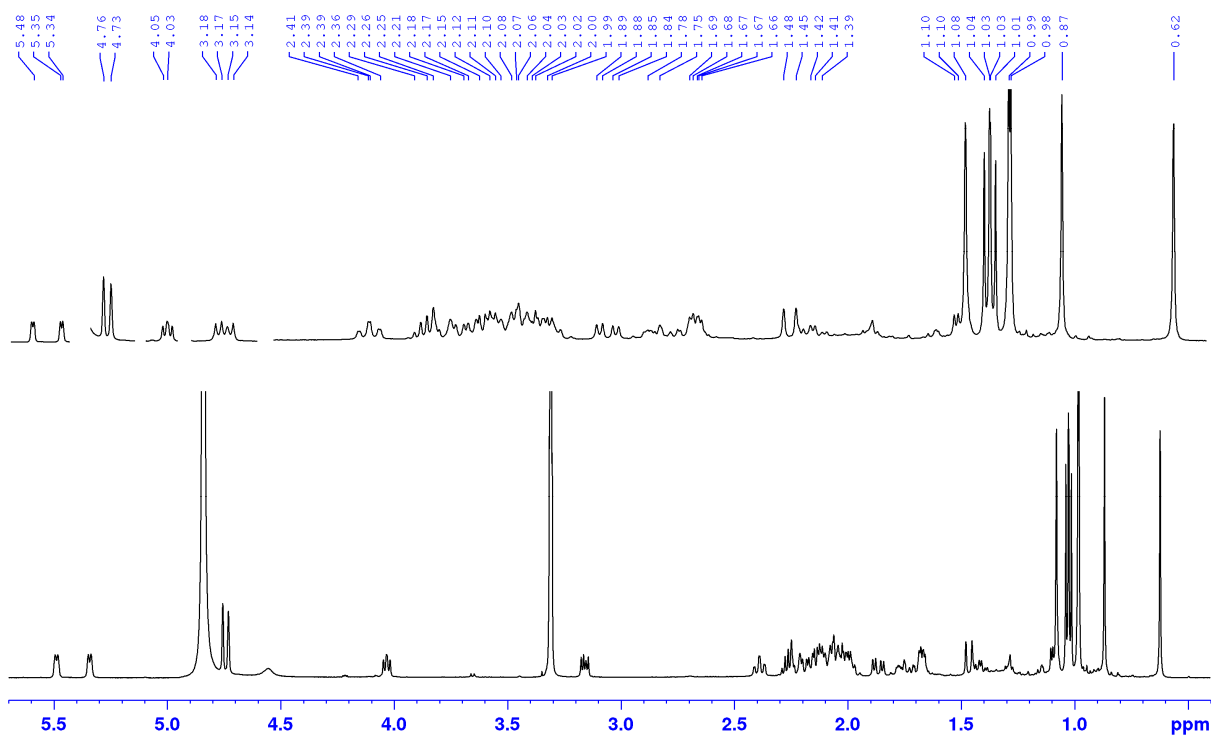
**Tabela 12.**  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) i  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) podaci jedinjenja **4**, **5** i **6**.

| C/H | <b>4<sup>b/a</sup></b> |                              | <b>5<sup>b</sup></b> |                              | <b>6<sup>b</sup></b> |                              |
|-----|------------------------|------------------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|------------------------------|
|     | $\delta_{\text{C}}$    | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz) | $\delta_{\text{C}}$  | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz) | $\delta_{\text{C}}$  | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz) |
| 1   | 29,9                   | 1,46 m; 1,58 m               | 35,5                 | 1,51 m; 1,83 m               | 30,6                 | 1,65 m; 1,78 m               |
| 2   | 25,6                   | 1,61 m; 1,94 m               | 24,3                 | 1,68 m; 1,72 m               | 23,1                 | 1,64 m; 1,98 m               |
| 3   | 75,8                   | 3,41 m                       | 81,0                 | 4,50 dd (11,6; 4,4)          | 78,0                 | 4,68 brs                     |
| 4   | 37,6                   | -                            | 37,8                 | -                            | 36,6                 | -                            |
| 5   | 44,3                   | 1,53 m                       | 49,4                 | 1,20 dd (11,3; 4,2)          | 44,2                 | 1,55 m                       |
| 6   | 18,1                   | 1,51 m; 1,62 m               | 22,9                 | 2,07 (2H) m                  | 23,1                 | 2,02 (2H) m                  |
| 7   | 26,1                   | 2,03 (2H) m                  | 120,7                | 5,45 d (5,9)                 | 120,8                | 5,46 brs                     |
| 8   | 133,1                  | -                            | 141,9                | -                            | 145,6                | -                            |
| 9   | 134,8                  | -                            | 145,5                | -                            | 141,6                | -                            |
| 10  | 37,6                   | -                            | 37,4                 | -                            | 37,3                 | -                            |
| 11  | 32,6                   | 2,09 m; 2,62 dd (18,9; 8,2)  | 116,4                | 5,31 d (5,9)                 | 116,6                | 5,31 d (5,9)                 |
| 12  | 73,2                   | 3,98; d (8,0)                | 35,5                 | 1,98 m; 2,25 m               | 35,4                 | 1,86 m; 2,22 m               |
| 13  | 49,6                   | -                            | 44,8                 | -                            | 44,8                 | -                            |
| 14  | 49,6                   | -                            | 48,8                 | -                            | 48,8                 | -                            |
| 15  | 32,1                   | 1,15; 1,65 m                 | 43,4                 | 1,50 m; 2,20 m               | 43,5                 | 1,45 m; 2,16 m               |
| 16  | 27,8                   | 1,35; 2,02 m                 | 76,9                 | 4,11 dd (8,8; 6,3)           | 77,0                 | 4,15 dd (9,4; 6,2)           |
| 17  | 43,0                   | 2,08 m                       | 57,1                 | 2,17 m                       | 57,0                 | 2,13 m                       |
| 18  | 16,3                   | 0,62 s                       | 17,3                 | 0,60 s                       | 17,2                 | 0,62 s                       |
| 19  | 18,8                   | 0,98 s                       | 22,8                 | 0,98 s                       | 22,5                 | 0,98 s                       |
| 20  | 36,2                   | 1,41 m                       | 46,7                 | 2,44 td (10,8; 3,2)          | 48,6                 | 2,50 td (10,8; 2,0)          |
| 21  | 17,7                   | 1,02 d (6,5)                 | 178,7                | -                            | 182,1                | -                            |
| 22  | 34,3                   | 1,24 m; 1,64 m               | 30,6                 | 1,81 m; 1,96 m               | 30,4                 | 1,84 m; 2,00 m               |
| 23  | 31,8                   | 2,01 m; 2,20 m               | 32,4                 | 2,02 m; 2,08 m               | 32,3                 | 2,04 m; 2,10 m               |
| 24  | 149,2                  | -                            | 155,4                | -                            | 155,0                | -                            |
| 25  | 45,8                   | 3,12 q (7,0)                 | 33,9                 | 2,24 m                       | 33,8                 | 2,24 m                       |
| 26  | 177,9                  | -                            | 21,9                 | 1,02 d (6,4)                 | 21,9                 | 1,02 d (6,0)                 |
| 27  | 16,3                   | 1,28 d (7,0)                 | 22,0                 | 1,01 d (6,4)                 | 21,8                 | 1,03 d (6,0)                 |
| 28  | 28,0                   | 0,97 s                       | 28,2                 | 0,89 s                       | 27,8                 | 0,88 s                       |
| 29  | 22,2                   | 0,87 s                       | 17,1                 | 0,95 s                       | 22,5                 | 0,98 s                       |
| 30  | 24,4                   | 1,07 s                       | 26,2                 | 1,09 s                       | 26,3                 | 1,15 s                       |
| 31  | 110,5                  | 4,90 brs; 4,94 brs           | 107,0                | 4,72 brs; 4,76 brs           | 107,1                | 4,73 brs; 4,78 brs           |
| 3-  |                        |                              |                      |                              |                      |                              |
| 1'  |                        |                              | 171,4                | -                            | 170,9                | -                            |
| 2'  |                        |                              | 21,4                 | 2,06 s                       | 22,8                 | 2,05 s                       |

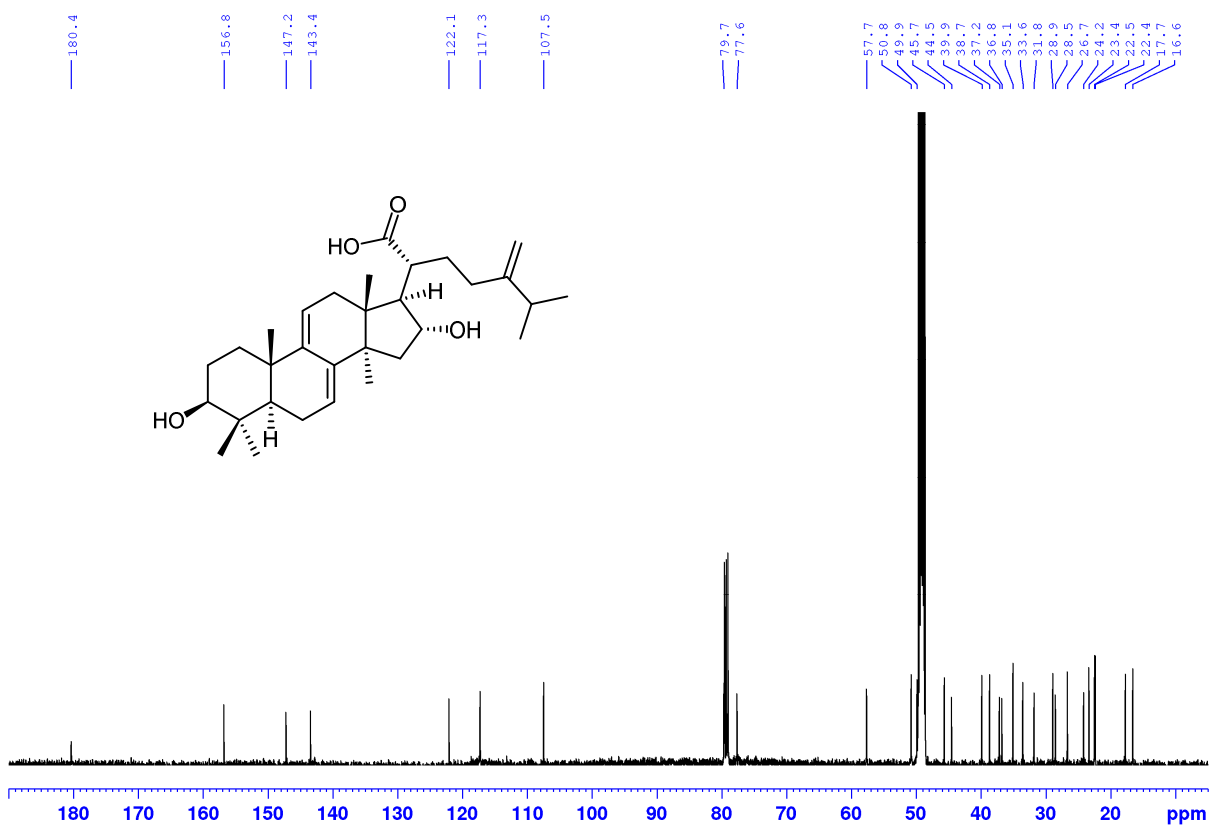
<sup>a</sup> Metanol-*d*<sub>4</sub>, <sup>b</sup> Hloroform-*d*

### 2.3.7. Određivanje strukture **3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroksi-24-metilen-21-lanost-7,9(11)-dienske kiseline – dehidrotumulozinske kiseline (7)**

Jedinjenje **7** izolovano je kao bela kristalna supstanca. Na osnovu deprotonovanog molekulskog jona  $[\text{M-H}]^-$  na  $m/z$  483,3485 iz HR-ESI-MS spektra, određena je molekulska formula  $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_4$ . Analizom signala iz  $^1\text{H}$  NMR spektra (**Slika 18**), koji potiču od olefinskih protona na  $\delta_{\text{H}}$  4,73; 4,76; 5,34 i 5,49, zaključeno je da se u lanostanskom skeletu nalazi dienska struktura, što je u saglasnosti i sa signalima iz  $^{13}\text{C}$  NMR spektra (**Slika 19, Tabela 13**). Lanostanski skelet jedinjenja **7** je istog tipa kao i kod prethodno opisanih jedinjenja **5** i **6**. Međutim, u NMR spektrima jedinjenja **7** izostaju  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  signali acetatne grupe u položaju C-3 koji se javljaju kod jedinjenja **5** i **6**. Pored toga, u  $^1\text{H}$  NMR spektru na  $\delta_{\text{H}}$  3,16 (dd,  $J_1=10,6$ ;  $J_2=5,4$  Hz) nalazi se signal H-3, na znatno nižem hemijskom pomeranju u odnosu na proton u istom položaju kod prethodno opisanih jedinjenja (**5** i **6**). Na osnovu korelacija signala H-3 u 2D NMR spektrima (HMBC i NOESY), kao i poređenjem sa literaturnim podacima, zaključeno je da jedinjenje **7** predstavlja **3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroksi-24-metilen-21-lanost-7,9(11)-diensku kiselinu**, poznatu kao i dehidrotumulozinska kiselina, prethodno izolovanu iz ove vrste.<sup>45</sup>



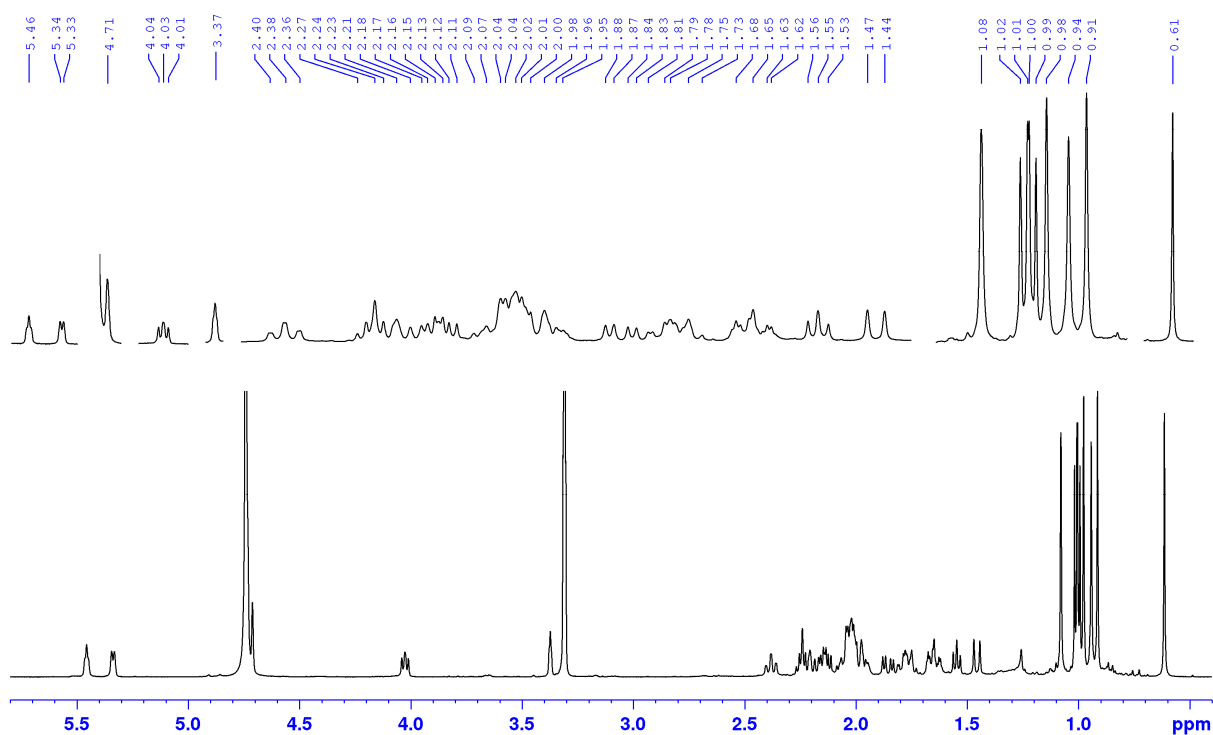
Slika 18.  $^1\text{H}$  NMR spektar (500 MHz, smeša hloroform- $d$  i metanol- $d_4$ ) jedinjenja 7.



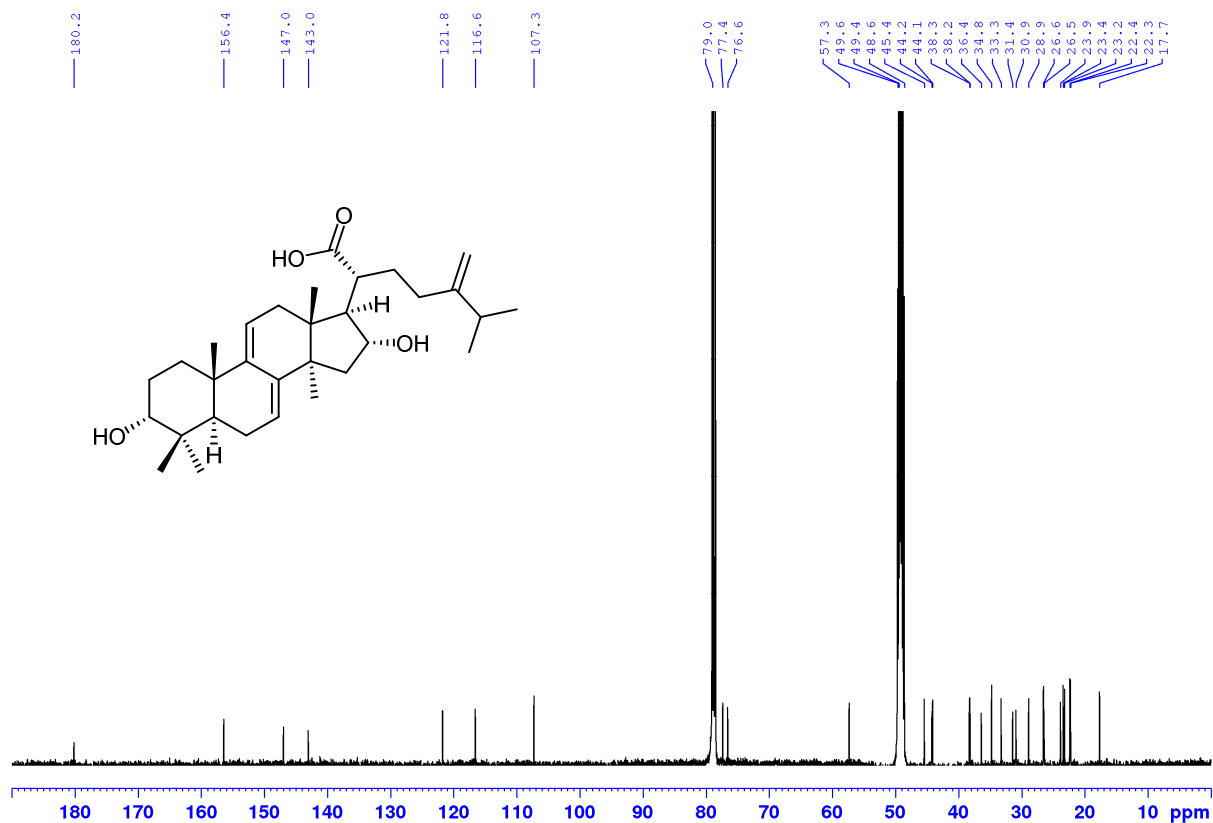
Slika 19.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (125 MHz, smeša hloroform- $d$  i metanol- $d_4$ ) i struktura jedinjenja 7.

### 2.3.8. Određivanje strukture 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -dihidroksi-24-metilen-21-lanost-7,9(11)-dienske kiseline – 3-*epi*-dehidrotumulozinske kiseline (**8**)

Jedinjenje **8** izolovano je kao bela kristalna supstanca. Molekulska formula C<sub>31</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub>, dobijena je na osnovu deprotonovanog molekulskog jona [M-H]<sup>-</sup> na *m/z* 483,3488 iz HR-ESI-MS spektra. Analizom <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektara (**Slika 20** i **21**) zapaža se velika sličnost sa jedinjenjem **7**. Jedina razlika uočava se kod protona i ugljenika u položaju C-3, hemijsko pomeranje i multiplicitet ( $\delta_H$  3,37, brs) se razlikuje u odnosu na proton u istom položaju kod jedinjenja **7** (**Tabela 13**). Ovo se objašnjava, po analogiji sa jedinjenjem **7** (**Slika 18**), 3 $\alpha$ -hidroksi supstitucijom. Dodatna potvrda dobijena je na osnovu korelacija iz 2D NOESY spektra. Na osnovu svih navedenih činjenica, utvrđeno je da jedinjenje **8**, predstavlja 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -dihidroksi-24-metilen-21-lanost-7,9(11)-diensku kiselinu, stereoisomer jedinjenja **7**, poznatu u literaturi kao 3-*epi*-dehidrotumulozinska kiselina.<sup>45</sup>



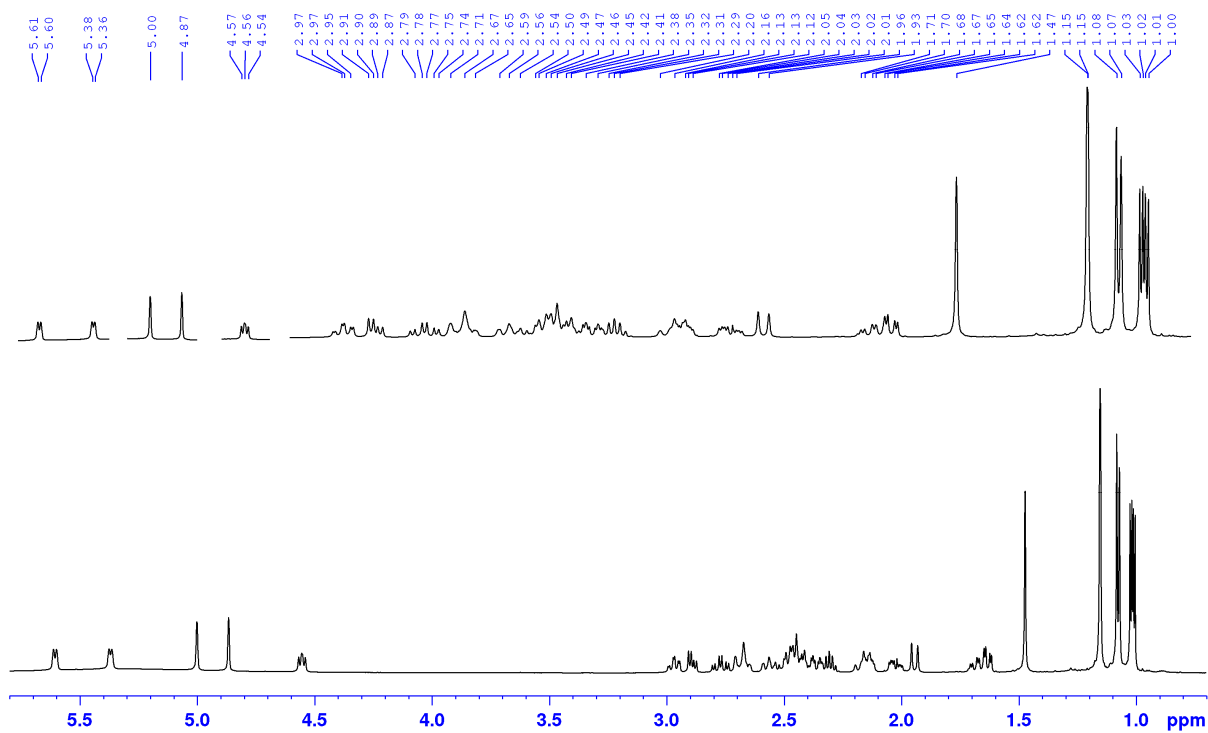
**Slika 20.** <sup>1</sup>H spektar (500 MHz, smeša hloroform-*d* i metanol-*d*<sub>4</sub>) jedinjenja **8**.



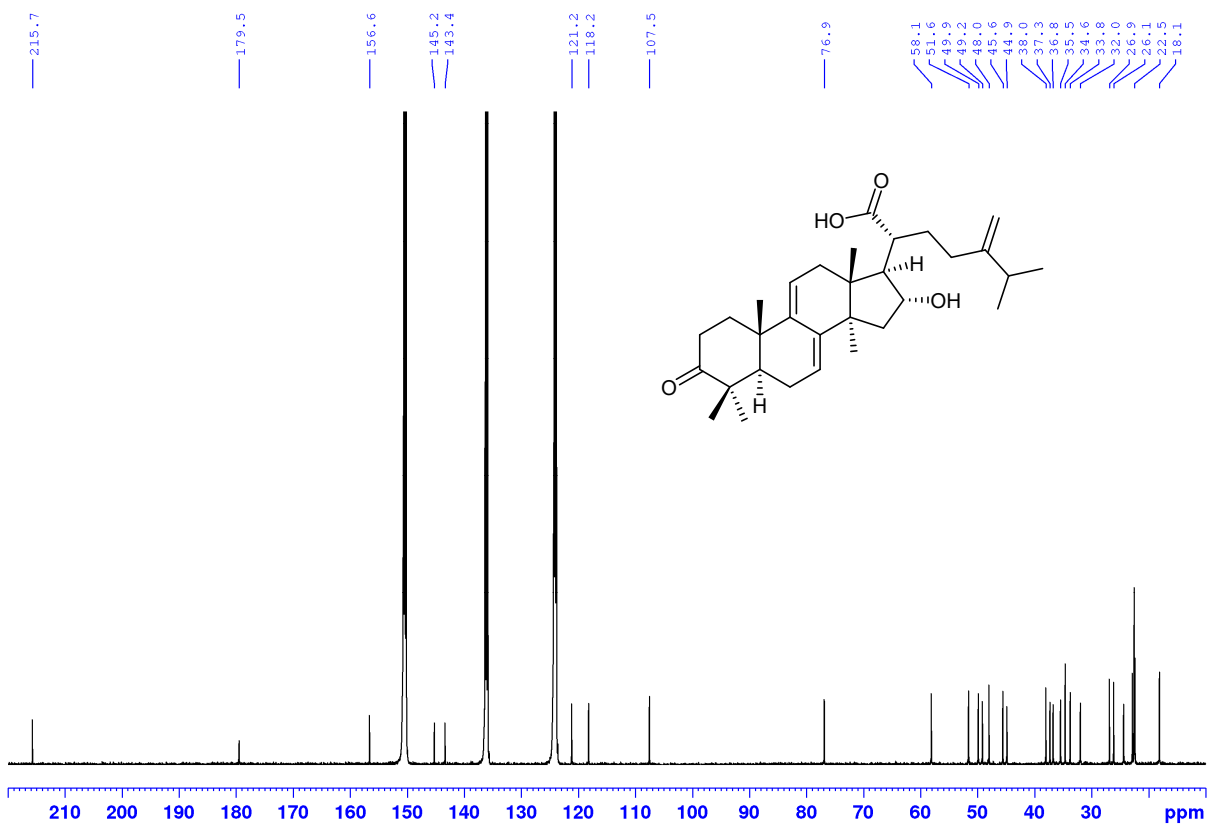
Slika 21. <sup>13</sup>C NMR spektar (125 MHz, smeša hloroform-*d* i metanol-*d*<sub>4</sub>) i struktura jedinjenja 8.

### 2.3.9. Određivanje strukture 16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-7,9(11)-dienske kiseline – poliporenske kiseline C (9)

Jedinjenje 9 izolovano je kao bela kristalna supstanca. Molekulska formula C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>, dobijena je na osnovu molekuskog jona [M]<sup>-</sup> na *m/z* 482,3382 iz HR-ESI-MS spektra. Analizom <sup>1</sup>H NMR spektra (Slika 22, Tabela 13) na osnovu signala olefinskih protona na  $\delta_H$  5,37 (d, *J*=5,5 Hz) i 5,60 (d, *J*=5,5 Hz), utvrđeno je da izolovano jedinjenje u svojoj strukturi sadrži dienski lanostanski skelet, što je bio slučaj sa prethodno opisanim jedinjenjima (5-8). Analizom <sup>13</sup>C NMR spektra (Slika 23) uočavaju se dva signala karbonilnih ugljenika na  $\delta_C$  179,5 i 215,7, koji potiču od karboksilne odnosno keto grupe. Položaji ovih grupa (3-okso-21-karboksi) određeni su na osnovu korelacija u HMBC spektru. Poređenjem dobijenih spektralnih podataka sa literaturnim, zaključeno je da jedinjenje 9 predstavlja 16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-7,9(11)-diensku kiselinu, poznatu kao poliporenska kiselina C, prethodno izolovanu iz iste gljive.<sup>55</sup>



Slika 22.  $^1\text{H}$  NMR spektar (500 MHz,  $\text{pyridin-}d_5$ ) jedinjenja 9.



Slika 23.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (125 MHz,  $\text{pyridin-}d_5$ ) i struktura jedinjenja 9.

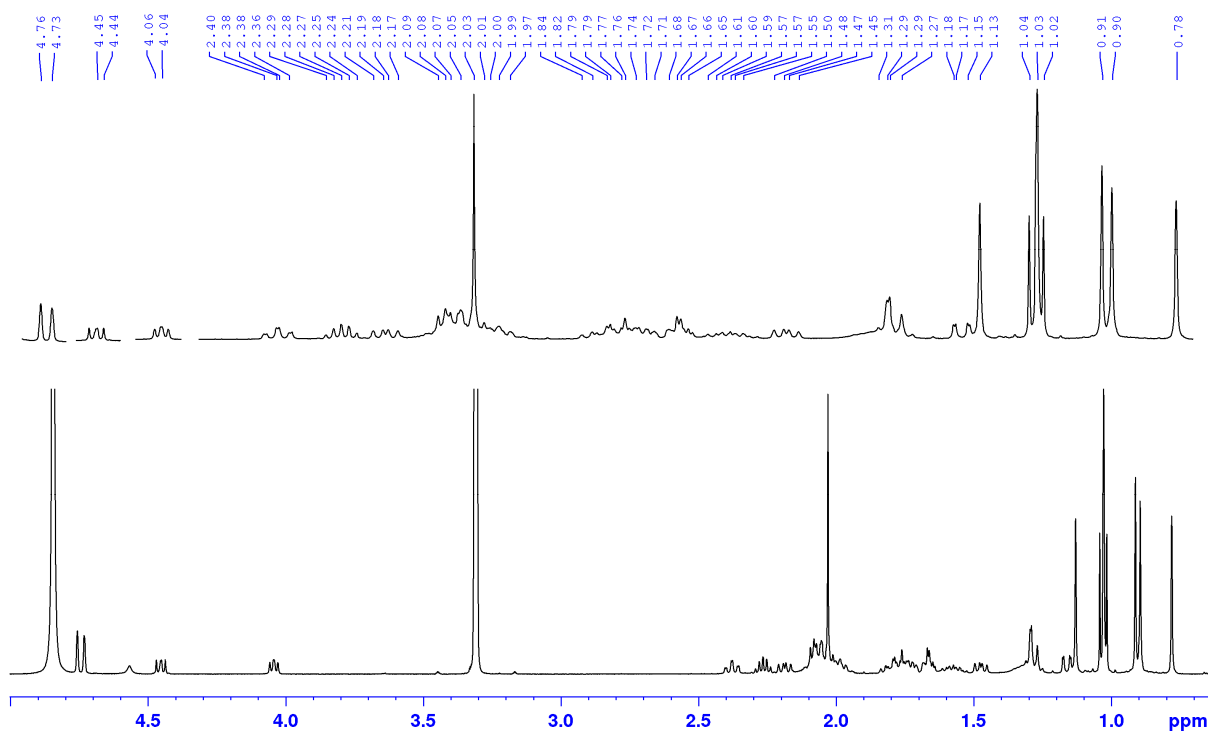
**Tabela 13.**  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) i  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) podaci jedinjenja 7, 8 i 9.

| C/H | $7^{c/a}$  |                     | $8^{c/a}$  |                     | $9^b$      |                     |
|-----|------------|---------------------|------------|---------------------|------------|---------------------|
|     | $\delta_C$ | $\delta_H$ (J u Hz) | $\delta_C$ | $\delta_H$ (J u Hz) | $\delta_C$ | $\delta_H$ (J u Hz) |
| 1   | 37,2       | 1,47 m; 2,01 m      | 30,9       | 1,65 (2H) m         | 37,3       | 1,62 m; 2,08 m      |
| 2   | 28,5       | 1,67 m              | 26,5       | 1,64 m; 1,96 m      | 35,4       | 2,31 m; 2,72 m      |
| 3   | 79,7       | 3,16 dd (10,6; 5,4) | 76,6       | 3,37 d (6,0)        | 215,7      | -                   |
| 4   | 39,9       | -                   | 38,3       | -                   | 48,0       | -                   |
| 5   | 50,8       | 1,10 m              | 44,1       | 1,54 m              | 51,6       | 1,58 m              |
| 6   | 24,2       | 2,07 m; 2,12 m      | 23,9       | 2,02 (2H) m         | 24,4       | 2,03 m; 2,11 m      |
| 7   | 122,1      | 5,48 d (6,0)        | 121,8      | 5,46 brs            | 121,2      | 5,60 d (6,4)        |
| 8   | 147,2      | -                   | 147,0      | -                   | 143,4      | -                   |
| 9   | 143,4      | -                   | 143,0      | -                   | 145,2      | -                   |
| 10  | 38,7       | -                   | 38,2       | -                   | 38,0       | -                   |
| 11  | 117,3      | 5,34 d (6,0)        | 116,6      | 5,34 d (6,0)        | 118,2      | 5,32 d (6,4)        |
| 12  | 36,8       | 1,87 m; 2,23 m      | 36,4       | 1,85 m; 2,22 m      | 36,8       | 2,38 m; 2,63 m      |
| 13  | 45,7       | -                   | 45,4       | -                   | 45,6       | -                   |
| 14  | 49,9       | -                   | 49,6       | -                   | 49,9       | -                   |
| 15  | 44,6       | 1,46 m; 2,17 m      | 44,2       | 1,45 m; 2,16 m      | 44,9       | 1,89 m; 2,41 m      |
| 16  | 77,7       | 4,05 dd (8,7; 6,4)  | 77,4       | 4,03 dd (9,0; 6,7)  | 76,9       | 4,50 dd (8,6; 6,2)  |
| 17  | 57,7       | 2,13 m              | 57,3       | 2,13 m              | 58,1       | 2,84 dd (11,0; 6,2) |
| 18  | 17,7       | 0,62 s              | 17,7       | 0,61 s              | 18,1       | 1,07 s              |
| 19  | 23,4       | 0,98 s              | 23,4       | 0,91                | 22,5       | 1,15 s              |
| 20  | 49,0       | 2,40 m              | 48,6       | 2,38 td (11,1; 1,6) | 49,2       | 2,92 td (11,0; 3,0) |
| 21  | 180,4      | -                   | 180,2      | -                   | 179,5      | -                   |
| 22  | 31,8       | 1,70 m, 2,05 m      | 31,4       | 1,76 m; 2,02 m      | 32,0       | 2,43 m; 2,61 m      |
| 23  | 33,6       | 1,99 m, 2,05 m      | 33,3       | 1,98 m; 2,05 m      | 33,8       | 2,36 m; 2,50 m      |
| 24  | 156,8      | -                   | 156,4      | -                   | 156,6      | -                   |
| 25  | 35,1       | 2,26 m              | 34,8       | 2,24 m              | 34,6       | 2,25 sep (6,8)      |
| 26  | 22,4       | 1,03 d (5,9)        | 22,4       | 1,02 d (5,6)        | 22,5       | 1,01 d (6,8)        |
| 27  | 22,5       | 1,02 d (5,9)        | 22,3       | 1,00 d (5,6)        | 22,5       | 1,02 d (6,8)        |
| 28  | 16,6       | 0,87 s              | 23,2       | 0,98 s              | 26,1       | 1,15 s              |
| 29  | 28,9       | 0,99 s              | 28,9       | 0,94 s              | 22,9       | 1,08 s              |
| 30  | 26,7       | 1,08 s              | 26,6       | 1,08 s              | 26,9       | 1,47 s              |
| 31  | 107,5      | 4,73 brs; 4,76 brs  | 107,3      | 4,71 brs; 4,73 brs  | 107,5      | 4,81 brs; 4,95 brs  |

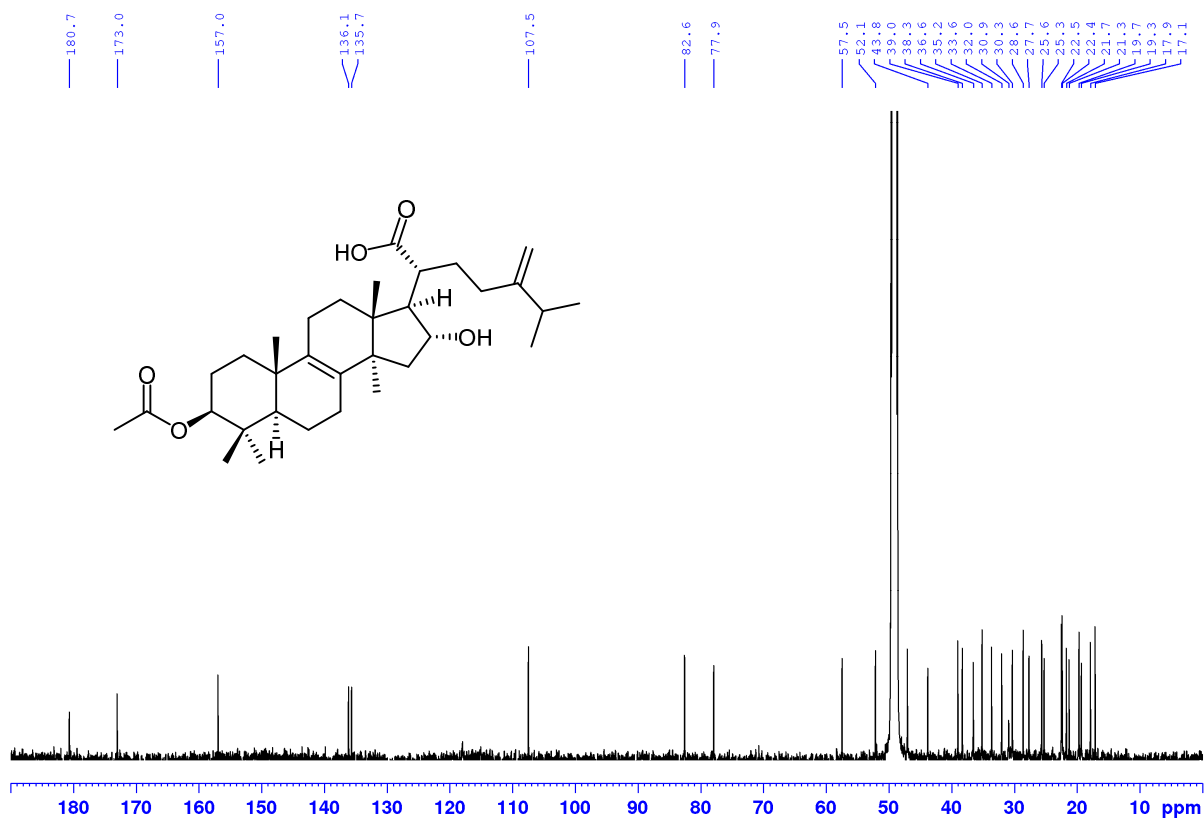
<sup>a</sup> Metanol-*d*<sub>4</sub>, <sup>b</sup> Piridin-*d*<sub>5</sub>, <sup>c</sup> Hloroform-*d*

### 2.3.10. Određivanje strukture 3 $\beta$ -(acetiloksi)-16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-21-lanost-8-enske kiseline – pahiminske kiseline (10)

Jedinjenje **10** je izolovano kao bela kristalna supstanca sa molekulskom formulom  $\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_5$ , dobijenom na osnovu deprotonovanog molekulskog jona  $[\text{M}-\text{H}]^-$  na  $m/z$  527,3755 vrednosti iz HR-ESI-MS spektra. U  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima (Slike 24 i 25, Tabela 14) uočavaju se prošireni singleti na  $\delta_H$  4,74 i 4,76 i signali  $\text{sp}^2$  ugljenikovih atoma ( $\delta_C$  107,4; 135,6; 136,1 i 156,9) koji ukazuju na dve dvostruke veze u molekulu. Na osnovu analize 2D NMR spektara (COSY, HSQC i HMBC) određeni su položaji dvostrukih veza,  $\Delta^{8,9}$  tetrasupstituisana i  $\Delta^{24(31)}$  egzometilenska, karakteristične za derivate 24-metilen-21-lanosta-8-enske kiseline. Na  $\delta_H$  2,03 s, uočava se signal metila iz acetatne grupe, a na  $\delta_C$  173,0 estarski karbonilni ugljenik. Položaj acetatne grupe (3 $\beta$ -OAc) definisan je na osnovu HMBC korelacije protona H-3 na  $\delta_H$  4,45 (dd,  $J_1=9,7$ ;  $J_2=6,9$  Hz) sa estarskim karbonilnim ugljenikom. Poređenjem sa literaturim podacima, utvrđeno je da izolovano jedinjenje **10** predstavlja poznat lanostanski triterpen, 3 $\beta$ -(acetiloksi)-16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-21-lanost-8-ensku kiselinu, prethodno izolovanu iz gljive *Poria cocos* i sada po prvi put izolovanu iz *F. betulina*.<sup>119</sup>



Slika 24.  $^1\text{H}$  NMR spektar (500 MHz,  $\text{metanol-}d_4$ ) jedinjenja 10.

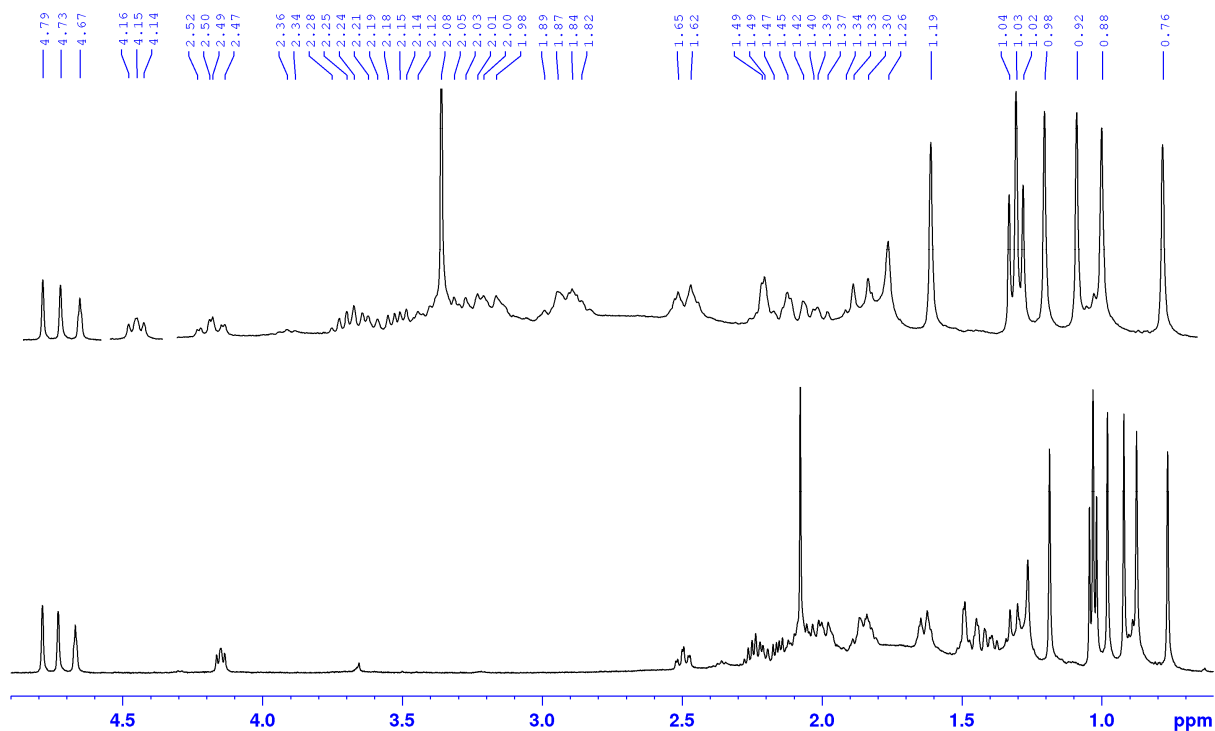


Slika 25.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (125 MHz,  $\text{metanol-}d_4$ ) i struktura jedinjenja 10.

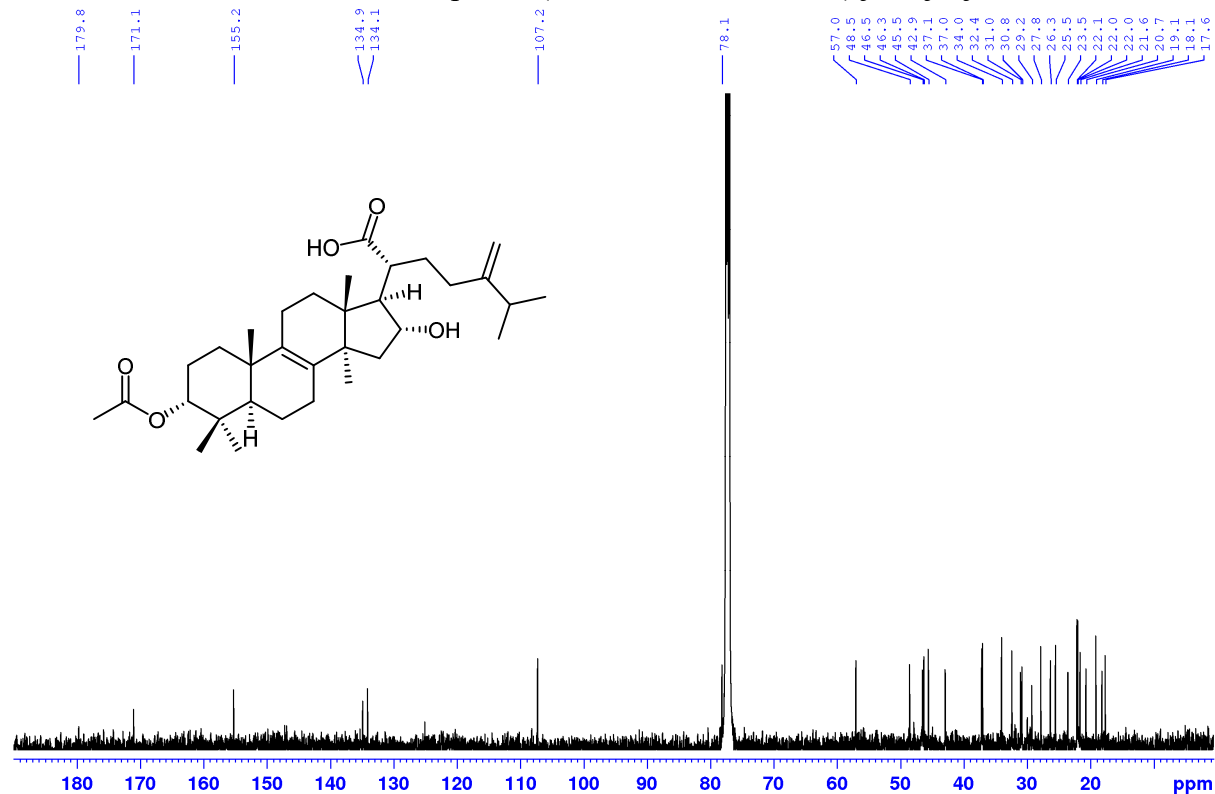
### 2.3.11. Određivanje strukture 3 $\alpha$ -(acetiloksi)-16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-21-lanost-8-enske kiseline – 3-*epi*-pahiminske kiseline (11)

Jedinjenje 11 izolovano je kao bela kristalna supstanca. Molekulska formula,  $\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_5$ , dobijena je iz HR-ESI-MS spektra na osnovu deprotonovanog molekulskog jona  $[\text{M-H}]^-$  na  $m/z$

527,3742. NMR spektri ovog jedinjenja (Slike 26 i 27, Tabela 14) veoma su slični sa spektrima jedinjenja 10, što ukazuje na isti tip supstituenata, broj i položaj dvostrukih veza, kao i karboksilne grupe na lanostanskom skeletu. Na  $\delta_H$  4,66 nalazi se prošireni singlet protona H-3. Razlika između jedinjenja 10 i 11 koja se odnosi na multiplicitete i hemijska pomeranja ovog signala posledica je različite stereochemije na C-3, što je prethodno objašnjeno za jedinjenje 6 (2.3.6.) (Slika 15). Na osnovu spektralnih i literaturnih podataka, utvrđeno je da jedinjenje 11 predstavlja 3 $\alpha$ -(acetiloksi)-16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-21-lanost-8-ensku kiselinu, u literaturi poznatu kao 3-*epi*-pahiminska kiselina, po prvi put izolovanu iz *F. betulina*, a prvenstveno izolovana iz gljive *F. pinicola*.<sup>43</sup>



Slika 26.  $^1\text{H}$  NMR spektar (500 MHz, hlороform-*d*) jedinjenja 11.

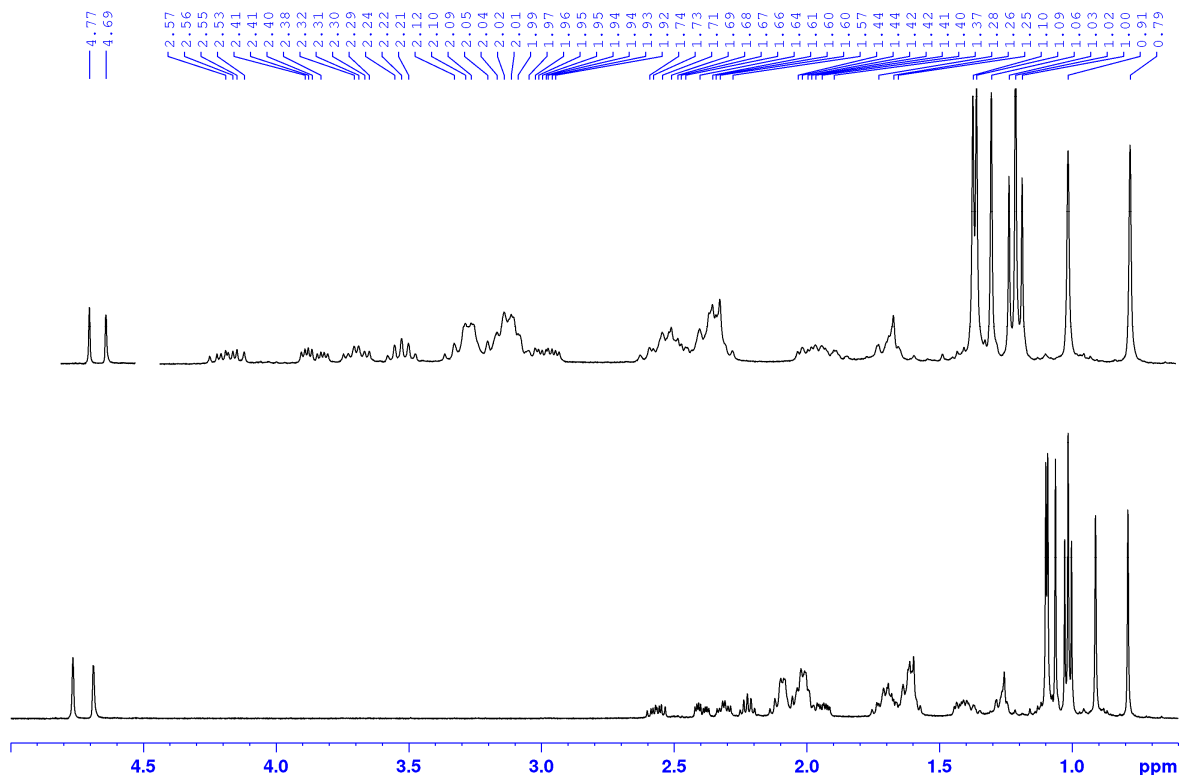


Slika 27.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (125 MHz, hlороform-*d*) i struktura jedinjenja 11.

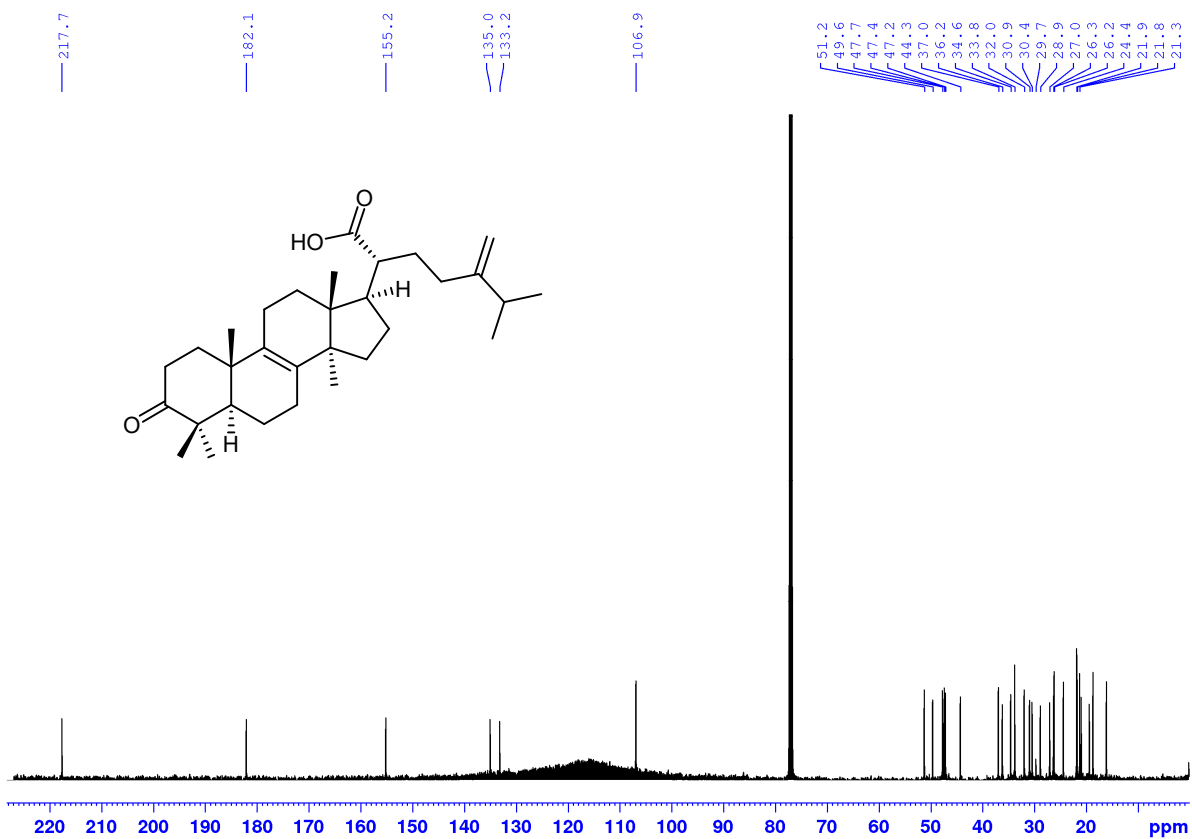


### 2.3.12. Određivanje strukture 12 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-8-enske kiseline – fomeficinske kiseline A (12)

Jedinjenje **12** izolovano je kao bela kristalna supstanca. U  $^1\text{H}$  NMR spektru (**Slika 28**) uočavaju se signali na  $\delta_{\text{H}}$  4,68 i 4,76 (brs oba), koji potiču od olefinskih protona iz egzometilenske dvostruke veze  $\Delta^{24(31)}$ . U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru (**Slika 29, Tabela 14**) na  $\delta_{\text{C}}$  217,7 nalazi se signal keto grupe, a na  $\delta_{\text{C}}$  182,1 karboksilne grupe. Pored toga, u oblasti  $\delta_{\text{C}}$  106,9-155,2 nalaze se četiri signala od  $\text{sp}^2$ -ugljenikovih atoma, na osnovu kojih je utvrđeno da je jedinjenje **12** derivat 24-metilen-21-lanost-8-enske kiseline. Na osnovu svih eksperimentalnih i literaturnih podataka zaključeno je da jedinjenje **12** je 12 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-8-enska kiselina, poznata kao fomeficinska kiselina A, prethodno izolovana iz ove gljive.<sup>50</sup>



**Slika 28.**  $^1\text{H}$  NMR spektar (500 MHz, hloroform-*d*) jedinjenja **12**.



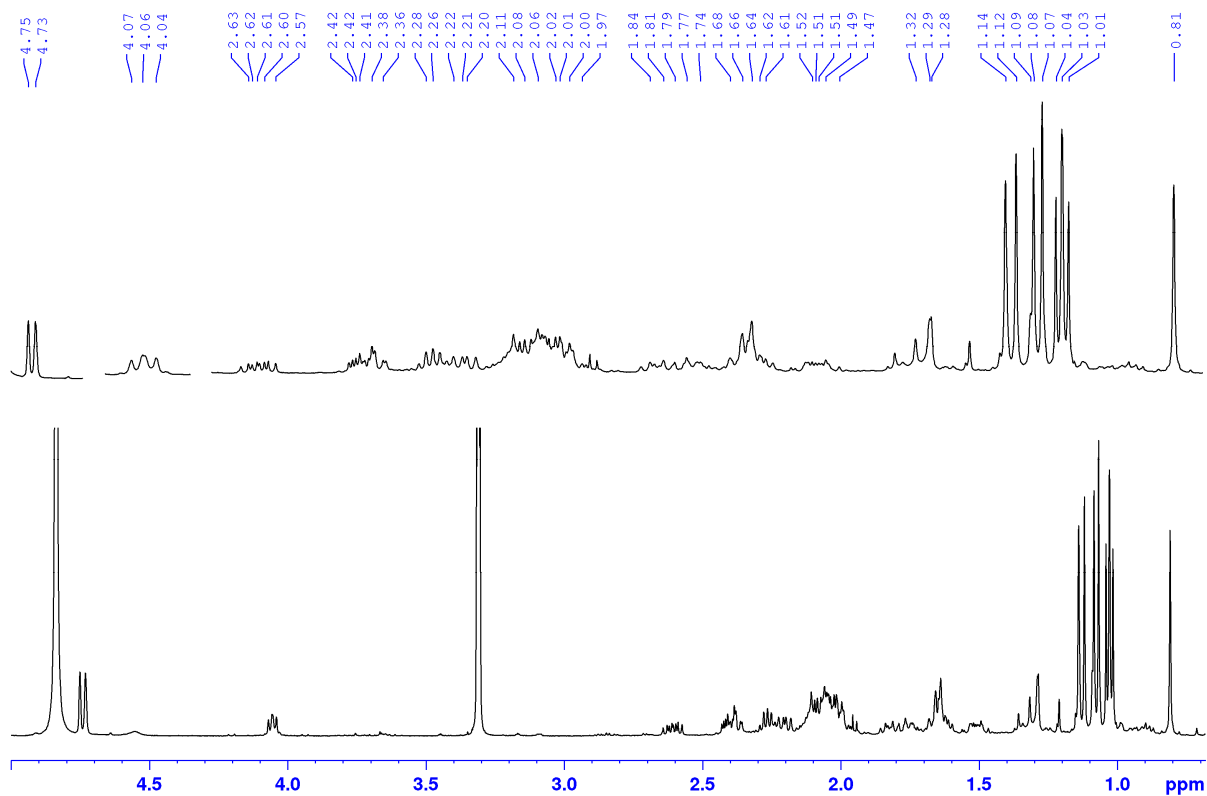
Slika 29.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (125 MHz, hloroform-*d*) i struktura jedinjenja 12.

**Tabela 14.**  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) i  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) podaci za jedinjenja **10**, **11** i **12**.

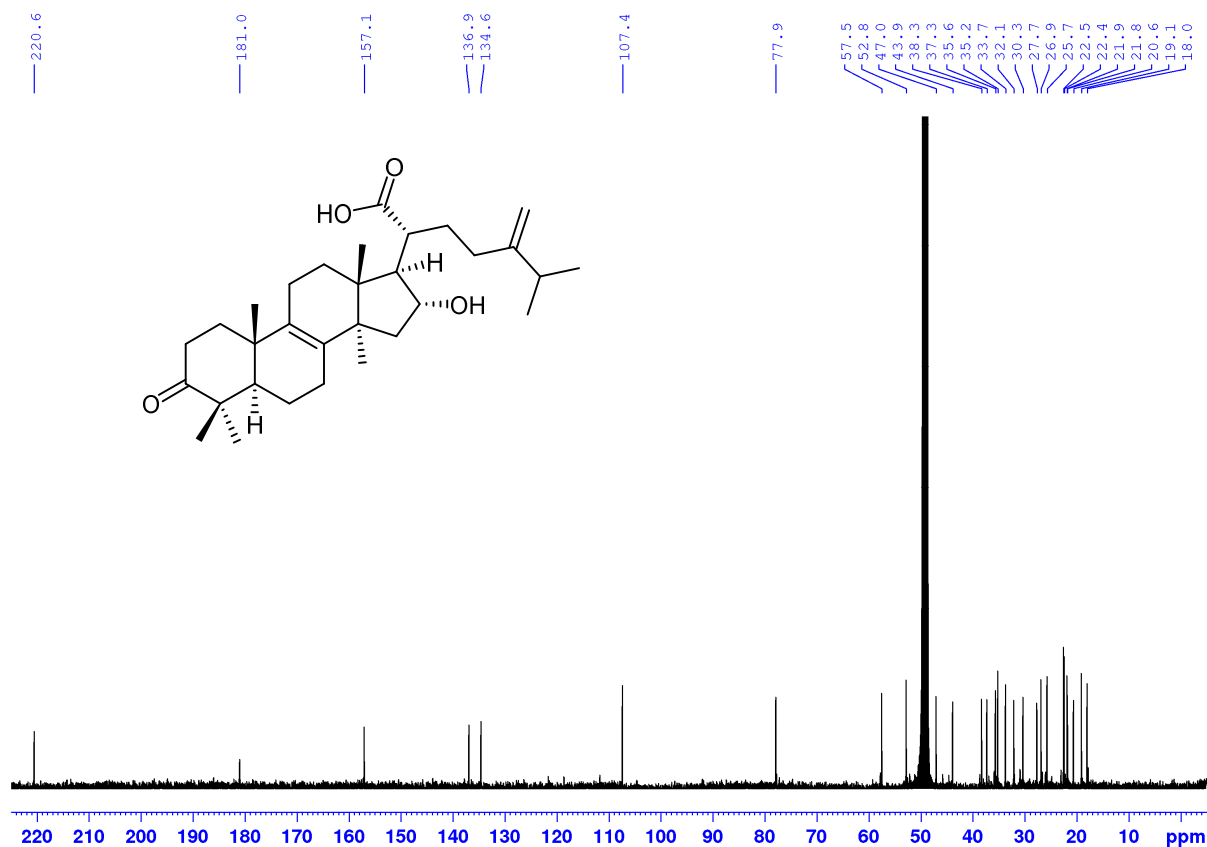
| C/H | <b>10<sup>a</sup></b> |                              | <b>11<sup>b</sup></b> |                              | <b>12<sup>b</sup></b> |                              |
|-----|-----------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------------|
|     | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz) | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz) | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz) |
| 1   | 36,6                  | 1,28 m; 1,78 m               | 31,0                  | 1,41 m; 1,47 m               | 36,2                  | 1,61 m; 1,95 m               |
| 2   | 25,3                  | 1,67 (2H) m                  | 23,5                  | 1,62 m; 1,84 m               | 34,6                  | 2,39 m; 2,56 m               |
| 3   | 82,6                  | 4,45 dd (9,3; 7,1)           | 78,1                  | 4,67 brs                     | 217,7                 | -                            |
| 4   | 39,0                  | -                            | 37,0                  | -                            | 47,9                  | -                            |
| 5   | 52,1                  | 1,16 m                       | 45,5                  | 1,53 m                       | 51,2                  | 1,60 m                       |
| 6   | 19,3                  | 1,57 m; 1,73 m               | 18,1                  | 1,48 m; 1,61 m               | 19,4                  | 1,61 (2H) m                  |
| 7   | 27,7                  | 2,08 m                       | 26,3                  | 1,98 m; 2,08 m               | 26,3                  | 2,09 (2H) m                  |
| 8   | 136,2                 | -                            | 134,1                 | -                            | 135,2                 | -                            |
| 9   | 135,7                 | -                            | 134,9                 | -                            | 133,4                 | -                            |
| 10  | 38,3                  | -                            | 37,1                  | -                            | 37,0                  | -                            |
| 11  | 21,7                  | 1,98 m; 2,05 m               | 20,7                  | 1,97 m; 2,04 m               | 21,0                  | 2,02 (2H) m                  |
| 12  | 30,3                  | 1,47 m; 1,81 m               | 29,2                  | 1,37 m; 1,82 m               | 30,4                  | 1,26 m; 1,64 m               |
| 13  | 47,1                  | -                            | 46,3                  | -                            | 44,3                  | -                            |
| 14  | 49,4                  | -                            | 48,5                  | -                            | 49,6                  | -                            |
| 15  | 43,8                  | 1,28 m; 2,20 m               | 42,9                  | 1,31 m; 2,20 m               | 28,8                  | 1,43 m; 1,72 m               |
| 16  | 77,9                  | 4,04 dd (7,9; 6,6)           | 77,2                  | 4,15 dd (8,7; 6,2)           | 27,1                  | 1,38 m; 2,02 m               |
| 17  | 57,5                  | 2,08 m                       | 57,0                  | 2,15 m                       | 47,2                  | 2,10 m                       |
| 18  | 17,9                  | 0,78 s                       | 17,6                  | 0,76 s                       | 16,1                  | 0,79 s                       |
| 19  | 19,7                  | 1,03 s                       | 19,1                  | 0,98 s                       | 18,7                  | 1,11 s                       |
| 20  | 49,1                  | 2,38 td (11,5; 2,3)          | 46,5                  | 2,49 td (11,0; 2,3)          | 47,4                  | 2,32 m                       |
| 21  | 180,7                 | -                            | 179,8                 | -                            | 182,1                 | -                            |
| 22  | 32,0                  | 1,75 m; 2,04 m               | 30,8                  | 1,84 m; 1,98 m               | 30,9                  | 1,70 (2H) m                  |
| 23  | 33,6                  | 1,99 m; 2,07 m               | 32,4                  | 2,02 m; 2,10 m               | 32,0                  | 2,02 (2H) m                  |
| 24  | 157,0                 | -                            | 155,2                 | -                            | 155,2                 | -                            |
| 25  | 35,2                  | 2,27 sep (6,7)               | 34,0                  | 2,24 sep (6,4)               | 33,8                  | 2,22 sep (6,9)               |
| 26  | 22,4                  | 1,04 d (6,7)                 | 22,0                  | 1,03 d (6,4)                 | 21,9                  | 1,01 d (6,9)                 |
| 27  | 22,5                  | 1,02 d (6,7)                 | 22,1                  | 1,02 d (6,4)                 | 21,8                  | 1,02 d (6,9)                 |
| 28  | 28,6                  | 0,90 s                       | 27,8                  | 0,88 s                       | 26,4                  | 1,09 s                       |
| 29  | 17,1                  | 0,91 s                       | 22,0                  | 0,92 s                       | 21,3                  | 1,06 s                       |
| 30  | 25,6                  | 1,13 s                       | 25,7                  | 1,19 s                       | 24,4                  | 0,91 s                       |
| 31  | 107,5                 | 4,73 brs; 4,76 brs           | 107,2                 | 4,73 brs; 4,79 brs           | 106,9                 | 4,69 brs; 4,77 brs           |
| 3-  |                       |                              |                       |                              |                       |                              |
| 1'  | 173,0                 | -                            | 171,1                 | -                            |                       |                              |
| 2'  | 21,3                  | 2,03 s                       | 21,6                  | 2,05 s                       |                       |                              |

<sup>a</sup> Metanol-*d*<sub>4</sub>, <sup>b</sup> Hloroform-*d***2.3.13. Određivanje strukture 16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-8-enske kiseline – 16 $\alpha$ -hidroksieburikonske kiseline (13)**

Jedinjenje **13** izolovano je kao bela kristalna supstanca. Molekulska formula  $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_4$  utvrđena je na osnovu spektralnih podataka (**Tabela 15**). U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru (**Slika 31**) uočava se signal keto grupe na  $\delta_{\text{C}}$  220,6, a na osnovu korelacija u HMBC spektru, određen je C-3 položaj. Pored toga, javljaju se signali u oblasti  $\delta_{\text{C}}$  107,4-157,1, koji odgovaraju  $\text{sp}^2$ -ugljenikovim atomima, kao i signal na  $\delta_{\text{C}}$  181,0, koji potiče od karboksilne grupe. Na osnovu pomenutih signala i njihovih korelacija u 2D NMR spektrima, zaključeno je da jedinjenje **13** predstavlja derivat 24-metilen-21-lanost-8-enske kiseline, kao i prethodno opisana jedinjenja (**10-12**). Na osnovu eksperimentalnih i literaturnih podataka, zaključeno je da je jedinjenje **13** 16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-8-enska kiselina, poznata pod nazivom 16 $\alpha$ -hidroksi-eburikonska kiselina, ranije izolovana iz iste gljive.<sup>45</sup>



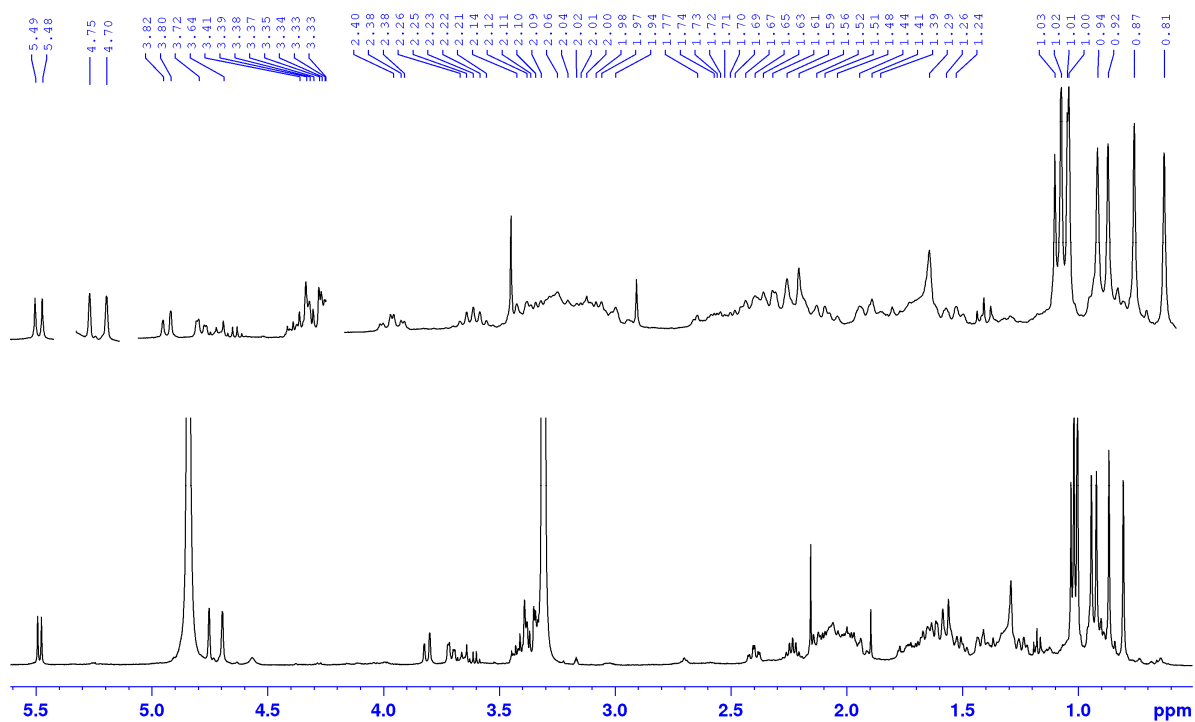
Slika 30.  $^1\text{H}$  NMR spektar (500 MHz, metanol- $d_4$ ) jedinjenja 13.



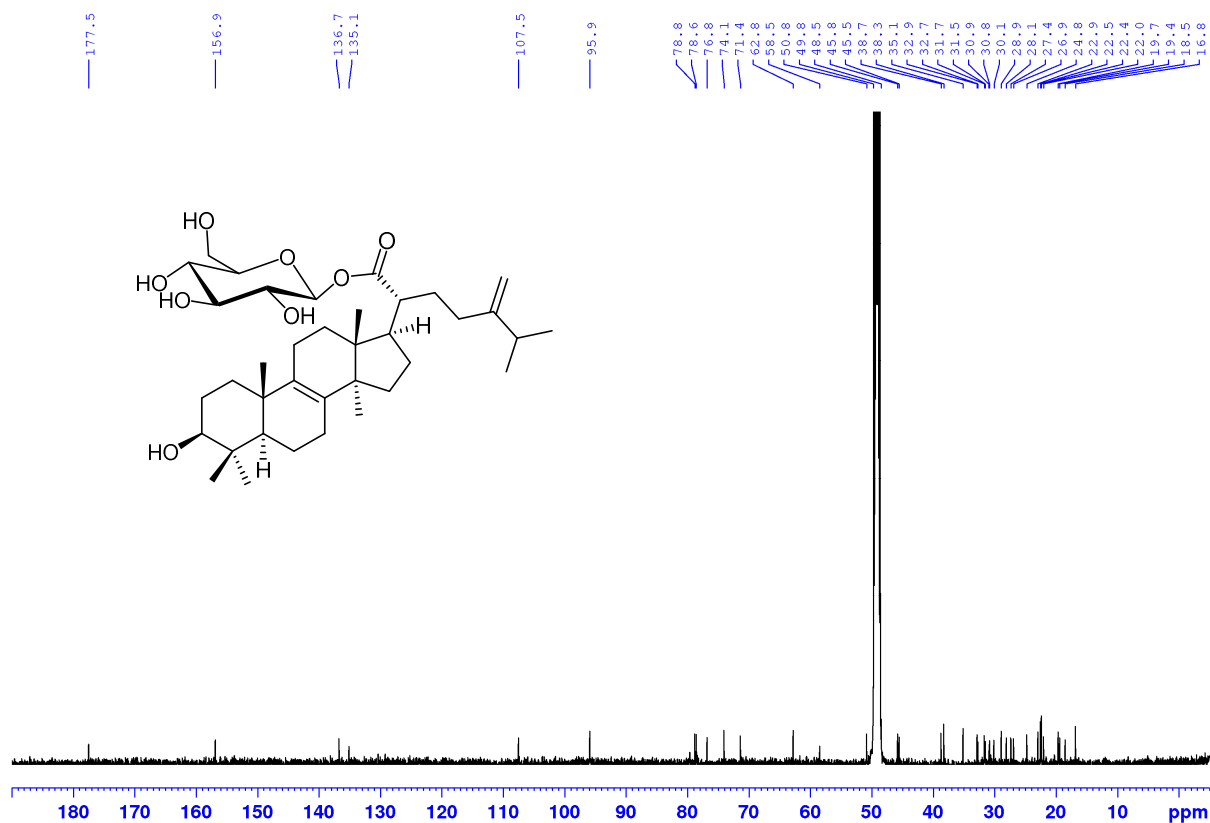
Slika 31.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (125 MHz, metanol- $d_4$ ) i struktura jedinjenja 13.

### 2.3.14. Određivanje strukture $\beta$ -D-glukopiranozil estra 3 $\beta$ -hidroksi-24-metilen-21-lanost-8-enske kiseline – fomitozida J (14)

Jedinjenje **14** izolovano je kao bela kristalna supstanca. Molekulska formula  $C_{37}H_{60}O_8$  dobijena je iz HR-ESI-MS spektra, na osnovu deprotonovanog molekulskog jona  $[M-H]^-$  na  $m/z$  631,4218 vrednosti. U  $^1H$  NMR spektru (**Slika 32**) na  $\delta_H$  5,48 (d,  $J=8,0$  Hz) nalazi se signal anomernog protona glukopiranoze, a u oblasti  $\delta_H$  3,30-3,80 uočava se više signala, koji takođe potiču od šećerne komponente ovog molekula.  $^{13}C$  NMR spektar (**Slika 33**) potvrdio je prisustvo šećerne jedinice na osnovu signala u oblasti  $\delta_C$  62,8-95,9 ppm. Pored toga, na  $\delta_C$  177,5 ppm uočava se signal estarskog karbonila, dok su u oblasti  $\delta_C$  107,5-156,9 (**Tabela 15**) prisutna četiri signala  $sp^2$ -ugljenikovih atoma, lanostanskog skeleta sa  $\Delta^{8,9}$  i  $\Delta^{24(31)}$  dvostrukim vezama. Na osnovu HMBC korelacije anomernog protona H-1' sa karbonilnim ugljenikom C-21, potvrđeno je da se radi o glukopiranozil estru 24-metilen-21-lanost-8-enske kiseline. Na osnovu svega navedenog, utvrđeno je da jedinjenje **14** predstavlja  $\beta$ -D-glukopiranozil estar 3 $\beta$ -hidroksi-24-metilen-21-lanost-8-enske kiseline, poznat kao fomitozid J, po prvi put izolovan iz *F. betulina* i ranije opisan kao sekundarni metabolit gljive *F. pinicola*.<sup>60</sup>



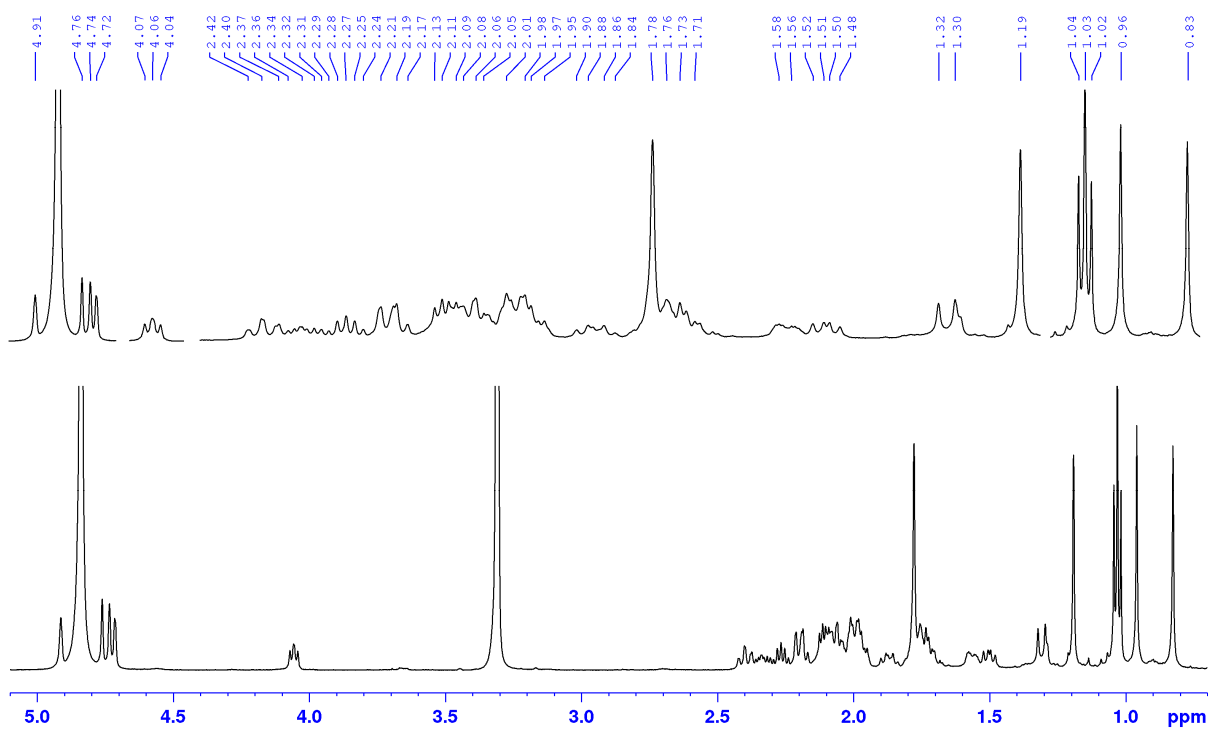
Slika 32.  $^1H$  NMR spektar (500 MHz, metanol- $d_4$ ) jedinjenja **14**.



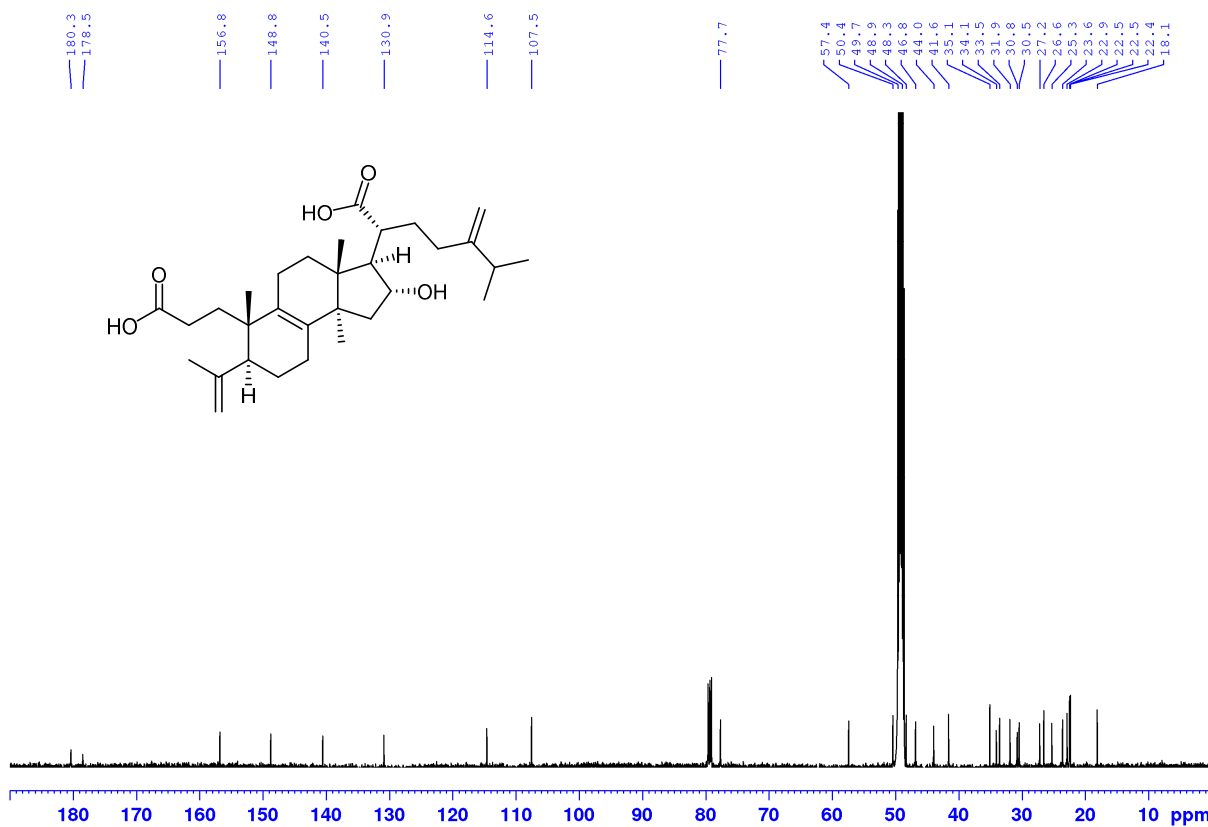
Slika 33. <sup>13</sup>C NMR spektar (125 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>) i struktura jedinjenja 14.

### 2.3.15. Određivanje strukture 3,4-*seco*-16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-3,21-lanost-8-enske dikiseline – porikoinske kiseline H (15)

Jedinjenje **15** izolovano je kao bela kristalna supstanca. Molekulska formula C<sub>31</sub>H<sub>48</sub>O<sub>5</sub> dobijena je na osnovu deprotonovanog molekulskog jona [M-H]<sup>-</sup> na *m/z* 499,3427 vrednosti, iz HR-ESI-MS spektra. U <sup>1</sup>H NMR spektru (Slika 34) uočavaju se signali na  $\delta_H$  4,72; 4,74; 4,76 i 4,91 (brs), koji potiču od olefinskih protona (Tabela 15). Na osnovu njihovog oblika i korelacija u HSQC spektru, utvrđeno je da se u molekulu nalaze dve egzometilenske  $\Delta^{4(28)}$  i  $\Delta^{24(31)}$  dvostruke veze. Pored toga, uočava se signal protona iz oksigenovane metinske grupe na  $\delta_H$  4,06 (dd,  $J_1=8,9$ ;  $J_2=6,3$  Hz), koji se nalazi u susjedstvu hidroksilne grupe u C-16 položaju. Karakterističan je i signal alilnog metila na  $\delta_H$  1,78 s (H-29), koji se nalazi na dvoguboj vezi  $\Delta^{4(28)}$ . <sup>13</sup>C NMR (Slika 35) signali na  $\delta_C$  178,5 i 180,3 odgovaraju dvema karboksilnim grupama, a njihov položaj (C-3 i C-21) određen je na osnovu 2D NMR spektara (COSY, TOCSY, HSQC i HMBC). Usled prisustva karboksilne grupe u položaju C-3, kao i na osnovu položaja egzometilenskih dvostrukih veza, zaključuje se da jedinjenje **15** predstavlja derivat 3,4-*seco*-lanostana. Na osnovu svega navedenog utvrđeno je da se ovde radi o 3,4-*seco*-16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-3,21-lanost-8-enskoj dikiselini, poznatoj kao porikoinska kiselina H, prethodno izolovanoj iz gljive *P. cocos*.<sup>120</sup>



Slika 34.  $^1\text{H}$  NMR spektar (500 MHz, smeša hloroform- $d$  i metanol- $d_4$ ) jedinjenja 15.



Slika 35.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (125 MHz, smeša hloroform- $d$  i metanol- $d_4$ ) i struktura jedinjenja 15.

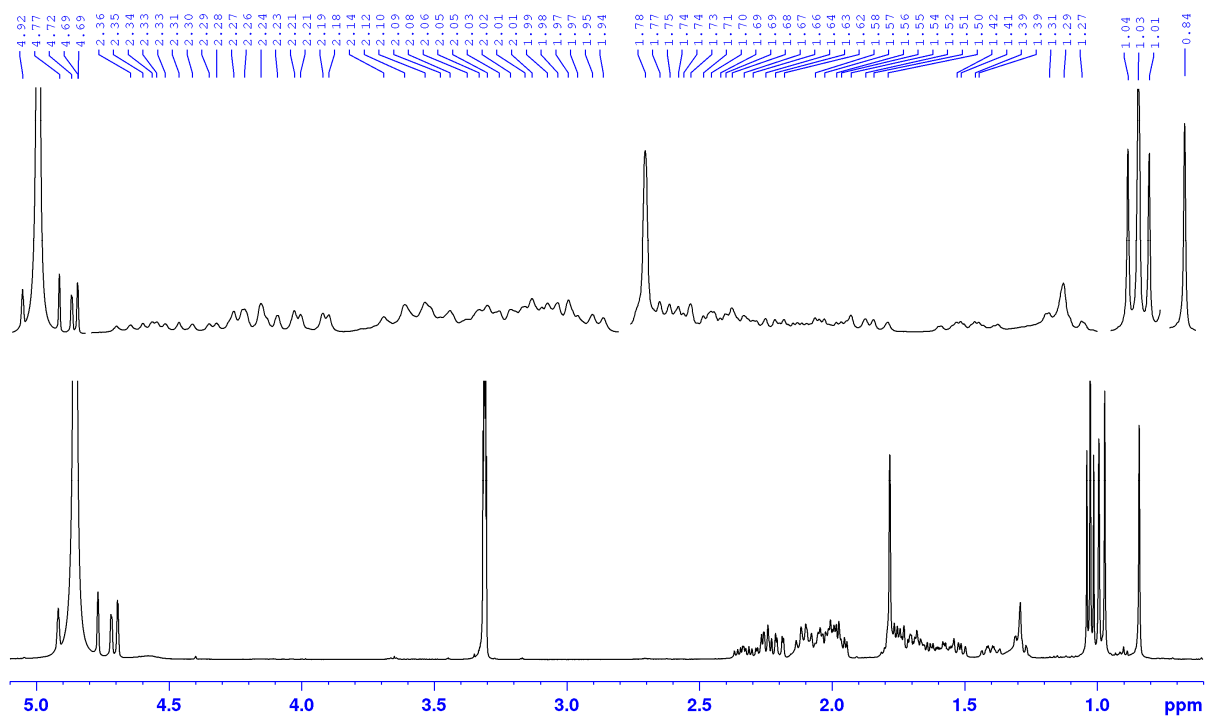
**Tabela 15.**  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) i  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) podaci za jedinjenja **13**, **14** i **15**.

| C/H | <b>13<sup>a</sup></b> |                                       | <b>14<sup>a</sup></b> |                              | <b>15<sup>a</sup></b> |                              |
|-----|-----------------------|---------------------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------------|
|     | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz)          | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz) | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz) |
| 1   | 37,3                  | 1,63 m; 2,02 m                        | 31,5                  | 1,42 m; 1,60 m               | 34,1                  | 1,73 m (2H)                  |
| 2   | 35,6                  | 2,42 m; 2,60 ddd<br>(15,8; 10,7; 7,3) | 26,9                  | 1,56 m; 1,94 m               | 30,8                  | 1,99 m; 2,34 m               |
| 3   | 220,6                 | -                                     | 76,8                  | 3,34 m                       | 178,5                 | -                            |
| 4   | 48,8                  | -                                     | 38,7                  | -                            | 148,8                 | -                            |
| 5   | 52,8                  | 1,64 m                                | 45,5                  | 1,57 m                       | 48,3                  | 2,21 m                       |
| 6   | 20,7                  | 1,66 m                                | 19,4                  | 1,57 m; 1,63 m               | 25,3                  | 1,57 m; 1,77 m               |
| 7   | 27,7                  | 2,07 m; 2,12 m                        | 22,0                  | 2,03 m                       | 27,2                  | 2,00 m; 2,11 m               |
| 8   | 134,6                 | -                                     | 135,1                 | -                            | 140,5                 | -                            |
| 9   | 136,9                 | -                                     | 136,7                 | -                            | 130,9                 | -                            |
| 10  | 38,3                  | -                                     | 38,3                  | -                            | 41,6                  | -                            |
| 11  | 21,8                  | 2,05 m                                | 27,4                  | 2,06 m                       | 22,4                  | 1,99 m; 2,10 m               |
| 12  | 30,3                  | 1,52 m; 1,83 m                        | 28,1                  | 1,38 m; 2,00 m               | 30,5                  | 1,50 m; 1,87 m               |
| 13  | 48,8                  | -                                     | 45,8                  | -                            | 46,8                  | -                            |
| 14  | 49,4                  | -                                     | 50,8                  | -                            | 50,4                  | -                            |
| 15  | 43,9                  | 1,30 m; 2,20 m                        | 32,7                  | 1,68 m                       | 44,0                  | 1,31 m; 2,20 m               |
| 16  | 77,9                  | 4,05 dd (8,6; 6,2)                    | 30,1                  | 1,50 m; 1,60 m               | 77,7                  | 4,06 dd (8,9; 6,3)           |
| 17  | 57,2                  | 2,09 m                                | 48,4                  | 2,12 m                       | 57,4                  | 2,12 m                       |
| 18  | 18,0                  | 0,80 s                                | 16,8                  | 0,81 s                       | 18,1                  | 0,83 s                       |
| 19  | 19,1                  | 1,10 s                                | 19,7                  | 1,01 s                       | 22,9                  | 0,96 s                       |
| 20  | 49,4                  | 2,38 m                                | 49,7                  | 2,40 td (11,0; 3,0)          | 48,9                  | 2,41 m                       |
| 21  | 181,0                 | -                                     | 177,5                 | -                            | 180,3                 | -                            |
| 22  | 32,1                  | 1,74 m; 2,03 m                        | 28,1                  | 1,25 m; 1,63 m               | 31,9                  | 1,77 m; 2,06 m               |
| 23  | 33,7                  | 2,00 m; 2,09 m                        | 32,9                  | 1,97 m; 2,11 m               | 33,5                  | 2,00 m; 2,07 m               |
| 24  | 157,1                 | -                                     | 156,9                 | -                            | 156,8                 | -                            |
| 25  | 35,2                  | 2,26 m                                | 35,2                  | 2,23 sep (6,8)               | 35,1                  | 2,28 sep (6,4)               |
| 26  | 22,4                  | 1,03 d (6,0)                          | 22,4                  | 1,03 d (6,8)                 | 22,5                  | 1,03 d (6,4)                 |
| 27  | 22,5                  | 1,02 d (6,0)                          | 22,5                  | 1,02 d (6,8)                 | 22,5                  | 1,04 d (6,4)                 |
| 28  | 21,9                  | 1,07 s                                | 23,0                  | 0,88 s                       | 114,5                 | 4,72 brs; 4,91 brs           |
| 29  | 26,9                  | 1,08 s                                | 28,9                  | 0,95 s                       | 23,6                  | 1,78 s                       |
| 30  | 25,7                  | 1,13 s                                | 24,8                  | 0,93 s                       | 26,6                  | 1,19 s                       |
| 31  | 107,4                 | 4,72 brs; 4,74 brs                    | 107,5                 | 4,70 brs; 4,76 brs           | 107,5                 | 4,74 brs; 4,76 brs           |
| 21- |                       |                                       |                       |                              |                       |                              |
| 1'  |                       |                                       | 95,9                  | 5,49 d (8,1)                 |                       |                              |
| 2'  |                       |                                       | 74,1                  | 3,34 m                       |                       |                              |
| 3'  |                       |                                       | 78,6                  | 3,41 m                       |                       |                              |
| 4'  |                       |                                       | 71,4                  | 3,40 m                       |                       |                              |
| 5'  |                       |                                       | 78,8                  | 3,37 m                       |                       |                              |
| 6'  |                       |                                       | 62,8                  | 3,71 m; 3,81 m               |                       |                              |

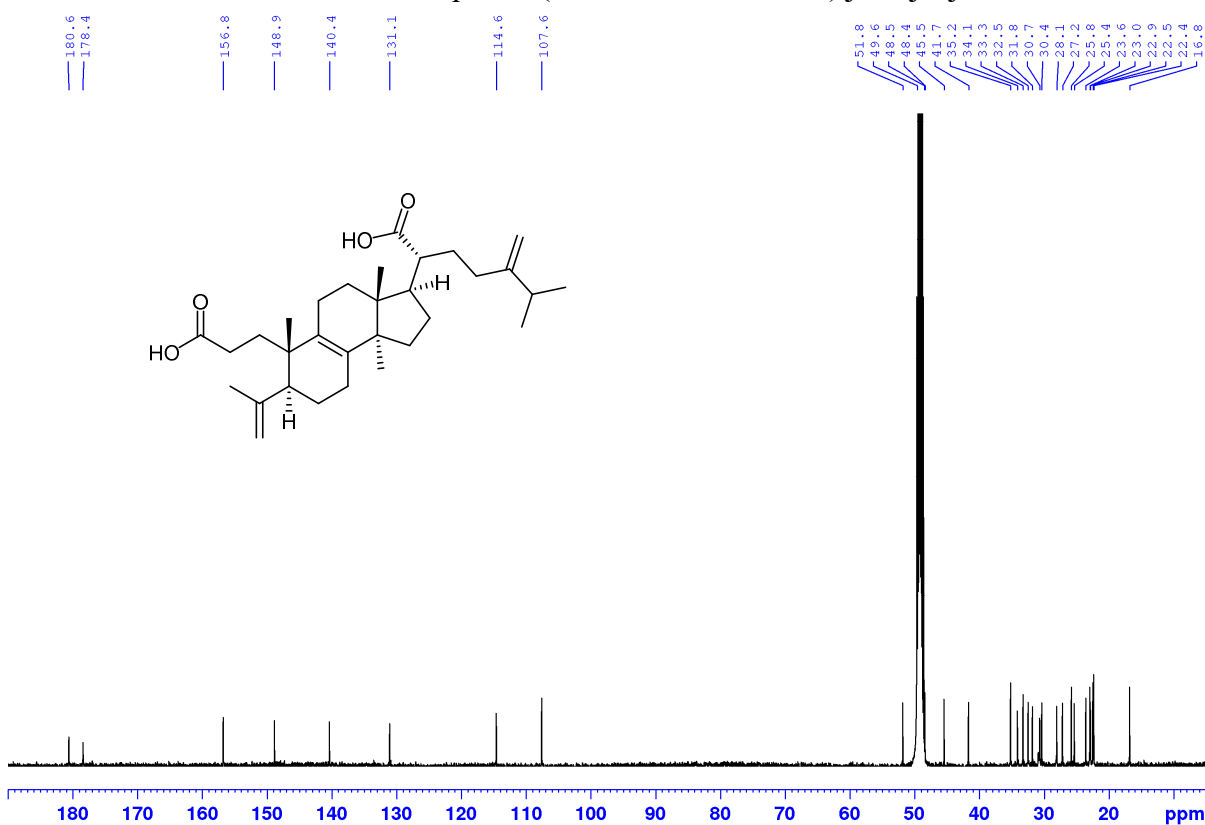
<sup>a</sup> Metanol-*d*<sub>4</sub>**2.3.16. Određivanje strukture 3,4-*seco*-24-metilen-3,21-lanost-8-enske dikiseline – piptolinske kiseline B (16)**

Jedinjenje **16** izolovano je kao bela kristalna supstanca. Molekulska formula  $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_4$  dobijena je na osnovu deprotonovanog molekuskog jona [M-H]<sup>-</sup> na *m/z* 483,3491 vrednosti, iz HR-ESI-MS spektra. Na osnovu analize  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektralnih podataka (**Tabela 16**, **Slike 36** i **37**), uočava se velika sličnost sa jedinjenjem **15**. Jedina razlika je u odsustvu signala koji potiče od oksigenovane metinske grupe u položaju C-16 ( $\delta_{\text{H}}$  4,06 i  $\delta_{\text{C}}$  77,7, kod jedinjenja **15**), na osnovu čega je utvrđeno da u 3,4-*seco*-lanostanskom skeletu izostaje hidroksilna grupa, što je u saglasnosti sa dobijenom molekulkom formulom jedinjenja. Poređenjem eksperimentalnih i literaturnih podataka zaključeno je da jedinjenje **16** predstavlja 3,4-*seco*-24-metilen-3,21-lanost-8-ensku dikiselinu, poznatu kao piptolinska kiselina B, prethodno izolovanu iz ove gljive.<sup>59</sup>





Slika 36.  $^1\text{H}$  NMR spektar (500 MHz, metanol- $d_4$ ) jedinjenja 16.

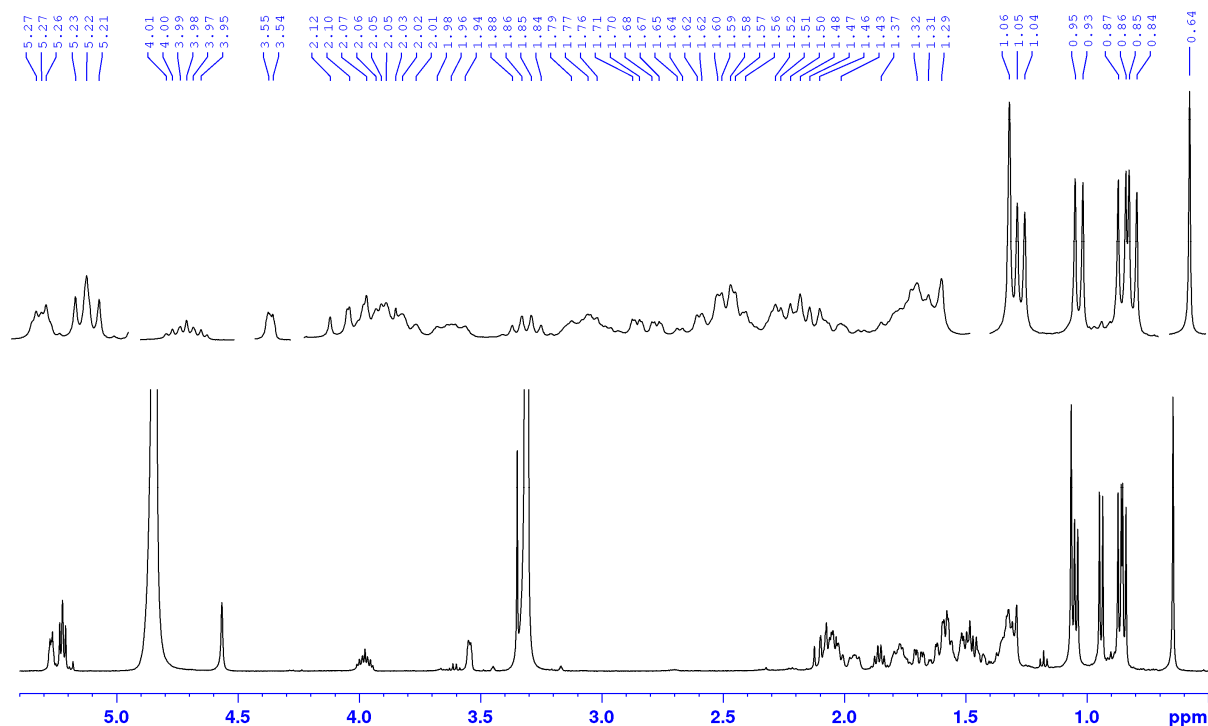


Slika 37.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (125 MHz, metanol- $d_4$ ) i struktura jedinjenja 16.

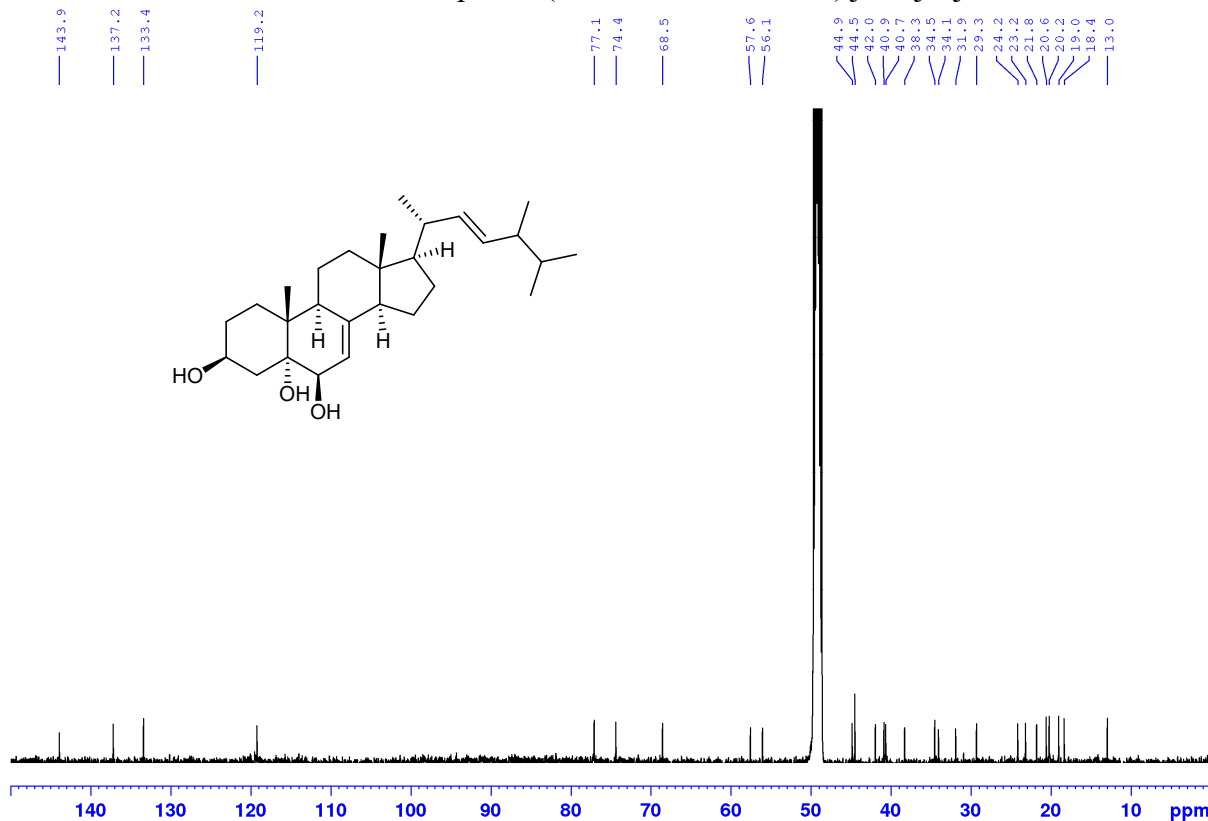
### 2.3.17. Određivanje strukture ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triola – cerevisterola (17)

Jedinjenje 17 izolovano je kao bela kristalna supstanca. Molekulska formula  $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_3$  dobijena je na osnovu tumačenja NMR spektara. U  $^1\text{H}$  NMR spektru (Slika 38) na  $\delta_{\text{H}}$  5,23; 5,22 i 5,27 uočavaju se signali olefinskih protona, nedefinisanog multipliciteta usled međusobnog preklapanja, kao i signali oksigenovanih metinskih grupa na  $\delta_{\text{H}}$  3,55 (brs) i 3,98 (m). U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru (Slika 39) vidi se 28 signala (Tabela 16), što je dovelo do zaključka da jedinjenje 17 nema

lanostanski skelet. U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru izostaju signali karbonilnih ugljenikovih atoma, tipičnih za karboksilne grupe, ali se u oblasti  $\delta_{\text{C}}$  119,2-149,9 uočavaju četiri signala  $\text{sp}^2$ -ugljenikovih atoma. Na  $\delta_{\text{C}}$  68,6; 74,4 i 77,1 javljaju se signali oksigenovanih ugljenikovih atoma. Daljom analizom 2D NMR spektara (COSY, HSQC, HMBC i NOESY) zaključeno je da jedinjenje pripada klasi steroidinih alkohola. Na osnovu poređenja eksperimentalnih i literaturnih podataka (prvi put izolovan iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*<sup>121</sup>) potvrđeno je da jedinjenje **17** predstavlja ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol, poznat kao cerevisterol, prvi put izolovan iz *F. betulina*.



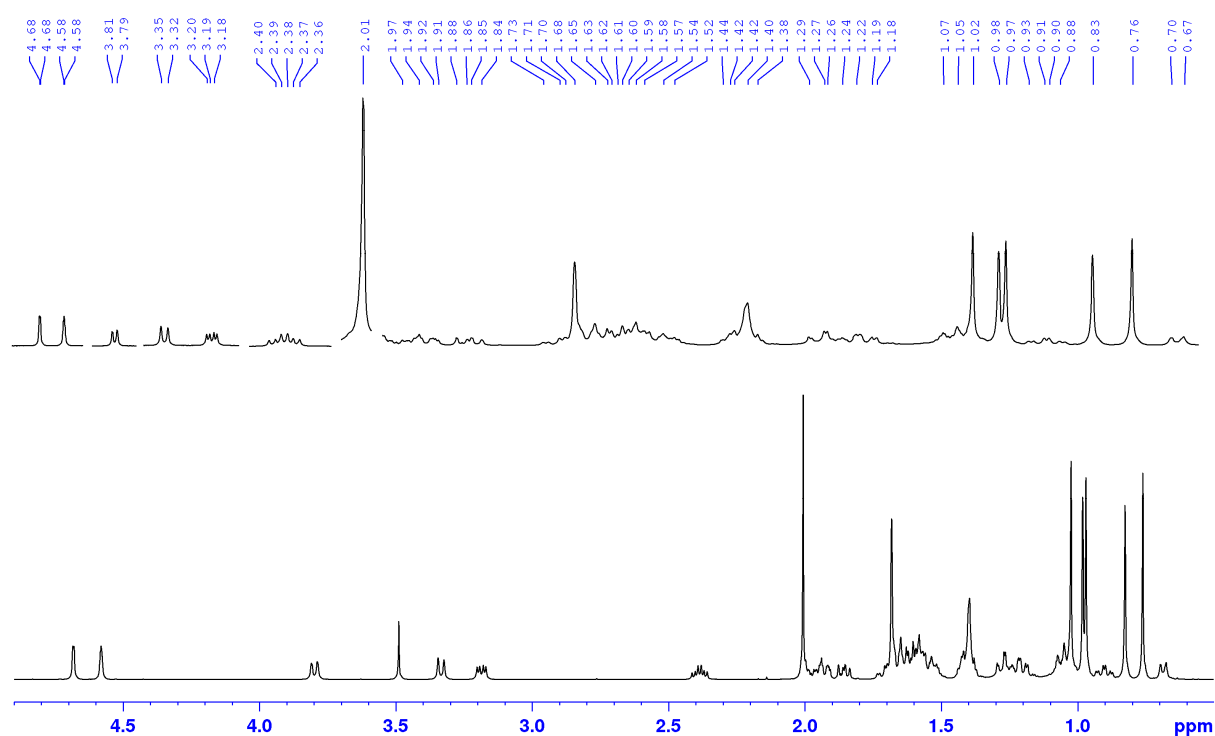
Slika 38.  $^1\text{H}$  NMR spektar (500 MHz,  $\text{metanol-}d_4$ ) jedinjenja **17**.



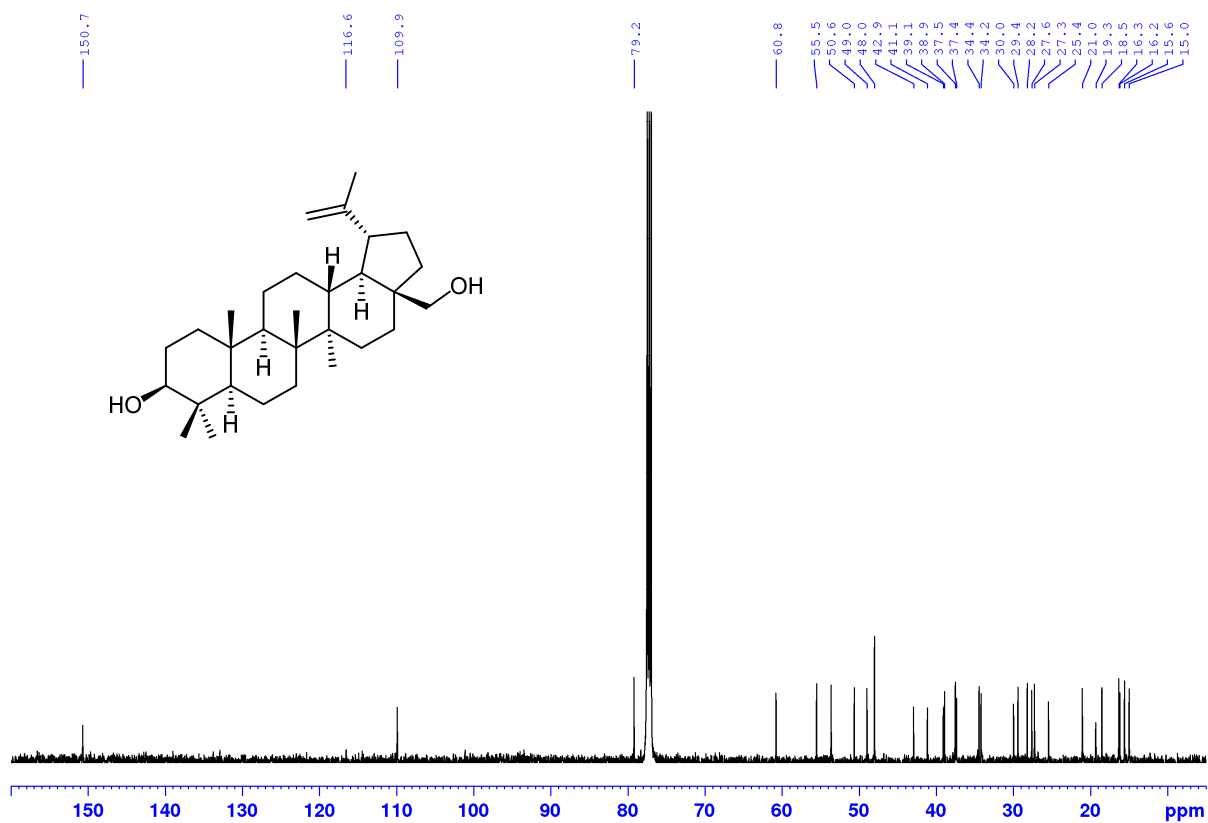
Slika 39.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (125 MHz,  $\text{metanol-}d_4$ ) i struktura jedinjenja **17**.

### 2.3.18. Određivanje strukture lup-20(29)-en-3 $\beta$ ,28-diola – betulina (18)

Jedinjenje **18** izolovano je kao bela kristalna supstanca. Molekulska formula C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub> dobijena je na osnovu analize NMR podataka (**Tabela 16**). U <sup>1</sup>H NMR spektru (**Slika 40**) uočavaju se signali na  $\delta_H$  4,68 i 4,58 (oba d,  $J=1,8$  Hz), koji potiču od egzometilenske  $\Delta^{20(29)}$  dvostruke veze, zatim signal oksigenovane metinske grupe na  $\delta_H$  3,19 (dd,  $J_1=11,5$ ,  $J_2=4,8$  Hz) i signali oksigenovane metilenske grupe (H<sub>2</sub>-28) na  $\delta_H$  3,34 i 3,80 (oba d,  $J=10,8$  Hz). U <sup>13</sup>C NMR spektru (**Slika 41**) javlja se ukupno 30 signala. Na  $\delta_C$  109,9 i 150,7 nalaze se signali sp<sup>2</sup>-ugljenikovih atoma, na osnovu kojih je potvrđena jedna dvostruka veza u molekulu. Pored toga, na  $\delta_C$  60,8 i 79,2 su signali oksigenovanih ugljenikovih atoma, što je u saglasnosti sa prethodno opisanim signalima iz <sup>1</sup>H NMR spektra. Na osnovu poređenja priloženih spektralnih i literaturnih podataka, utvrđeno je da jedinjenje **18** predstavlja lup-20(29)-en-3 $\beta$ ,28-diol, poznato kao betulin, pentaciklični triterpen, ranije izolovan iz ove gljive.<sup>50</sup> Pretpostavka je da je betulin usvojen iz samog domaćina ove gljive, breze (*Betula alba*), pošto je on dominantno jedinjenje u kori breze.



Slika 40. <sup>1</sup>H NMR spektar (500 MHz, hloroform-*d*) jedinjenja **18**.



Slika 41.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (125 MHz, hloroform-*d*) i struktura jedinjenja 18.

**Tabela 16.**  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) i  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) podaci za jedinjenja **16**, **17** i **18**.

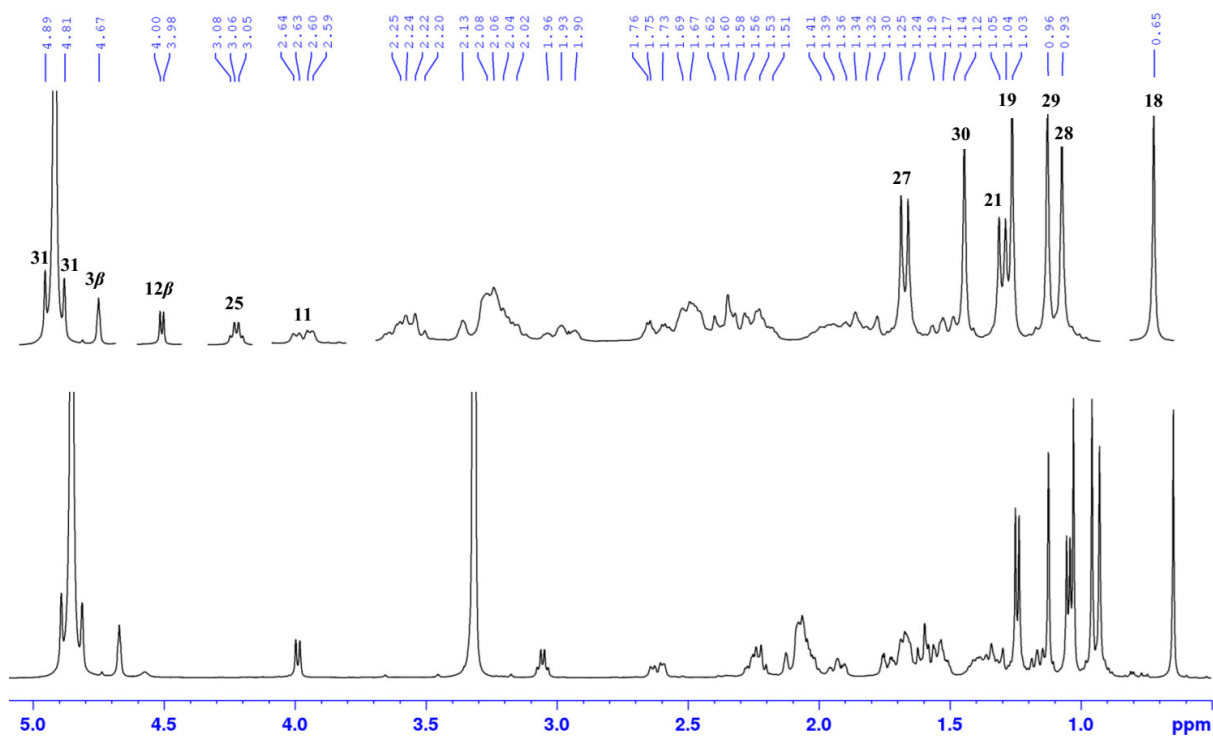
| C/H | <b>16<sup>a</sup></b> |                              | <b>17<sup>a</sup></b> |                              | <b>18<sup>b</sup></b> |                              |
|-----|-----------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------------|
|     | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz) | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz) | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz) |
| 1   | 34,1                  | 1,74 (2H) m                  | 23,2                  | 1,58 (2H) m                  | 39,1                  | 0,91 m; 1,66 m               |
| 2   | 30,7                  | 1,97 m; 2,33 m               | 40,7                  | 1,70 m; 2,09 m               | 27,6                  | 1,58 (2H) m                  |
| 3   | 178,4                 | -                            | 68,6                  | 3,98 m                       | 79,2                  | 3,19 dd (11,5; 4,7)          |
| 4   | 147,6                 | -                            | 31,9                  | 1,45 m; 1,79 m               | 38,9                  | -                            |
| 5   | 48,4                  | 2,20 m                       | 77,1                  | -                            | 55,5                  | 0,69 d (9,6)                 |
| 6   | 25,4                  | 1,57 m; 1,77 m               | 74,4                  | 3,55 brs                     | 18,5                  | 1,40 m; 1,53 m               |
| 7   | 28,1                  | 1,40 m; 2,00 m               | 119,2                 | 5,27 m                       | 34,4                  | 1,40 m                       |
| 8   | 140,4                 | -                            | 143,9                 | -                            | 41,1                  | -                            |
| 9   | 131,1                 | -                            | 44,5                  | 2,03 m                       | 50,6                  | 1,23 m; 1,27 m               |
| 10  | 41,7                  | -                            | 38,3                  | -                            | 37,5                  | -                            |
| 11  | 22,9                  | 1,98 m; 2,11 m               | 34,1                  | 1,51 m; 1,62 m               | 21,0                  | 1,21 m; 1,41 m               |
| 12  | 30,4                  | 1,52 m; 1,75 m               | 40,9                  | 1,35 m; 2,07 m               | 25,4                  | 1,04 m; 1,64 m               |
| 13  | 45,4                  | -                            | 44,9                  | -                            | 37,4                  | 1,65 m                       |
| 14  | 51,8                  | -                            | 56,0                  | 1,96 m                       | 42,9                  | -                            |
| 15  | 31,8                  | 1,29 m; 1,67 m               | 24,2                  | 1,52 m; 1,59 m               | 27,3                  | -                            |
| 16  | 27,2                  | 2,05 m; 2,10 m               | 29,3                  | 1,33 m; 1,76 m               | 29,4                  | 1,21 m; 1,93 m               |
| 17  | 48,5                  | 2,10 m                       | 57,6                  | 1,32 m                       | 48,0                  | -                            |
| 18  | 16,8                  | 0,84 s                       | 12,9                  | 0,64 s                       | 48,0                  | 2,39 m                       |
| 19  | 23,0                  | 0,97 s                       | 19,0                  | 1,06 s                       | 49,0                  | 1,58 m; 1,64 m               |
| 20  | 49,6                  | 2,26 m                       | 42,0                  | 2,06 m                       | 150,7                 | -                            |
| 21  | 180,6                 | -                            | 21,8                  | 1,05 d (6,7)                 | 30,0                  | -                            |
| 22  | 32,5                  | 1,62 m; 1,68 m               | 137,2                 | 5,23 m                       | 34,2                  | 1,04 m; 1,86 m               |
| 23  | 33,3                  | 2,00 (2H) m                  | 133,4                 | 5,22 m                       | 28,2                  | 0,97 s                       |
| 24  | 156,8                 | -                            | 44,9                  | 1,86 m                       | 15,6                  | 0,76 s                       |
| 25  | 35,2                  | 2,24 m                       | 34,5                  | 1,49 m                       | 16,3                  | 0,83 s                       |
| 26  | 22,5                  | 1,02 d (6,6)                 | 20,6                  | 0,86 d (6,8)                 | 16,2                  | 0,98 s                       |
| 27  | 22,4                  | 1,03 d (6,6)                 | 20,2                  | 0,85 d (6,8)                 | 15,0                  | 1,05 s                       |
| 28  | 114,6                 | 4,69 brs; 4,92 brs           | 18,4                  | 0,94 d (6,8)                 | 60,8                  | 3,33 d (10,8); 3,80 d (10,8) |
| 29  | 23,6                  | 1,78 s                       |                       |                              | 109,9                 | 4,58 d (2,0); 4,68 d (2,0)   |
| 30  | 25,8                  | 0,99 s                       |                       |                              | 19,3                  | 1,68 s                       |
| 31  | 107,6                 | 4,72 brs; 4,77, brs          |                       |                              |                       |                              |

<sup>a</sup> Metanol-*d*<sub>4</sub>, <sup>b</sup> Hloroform-*d*

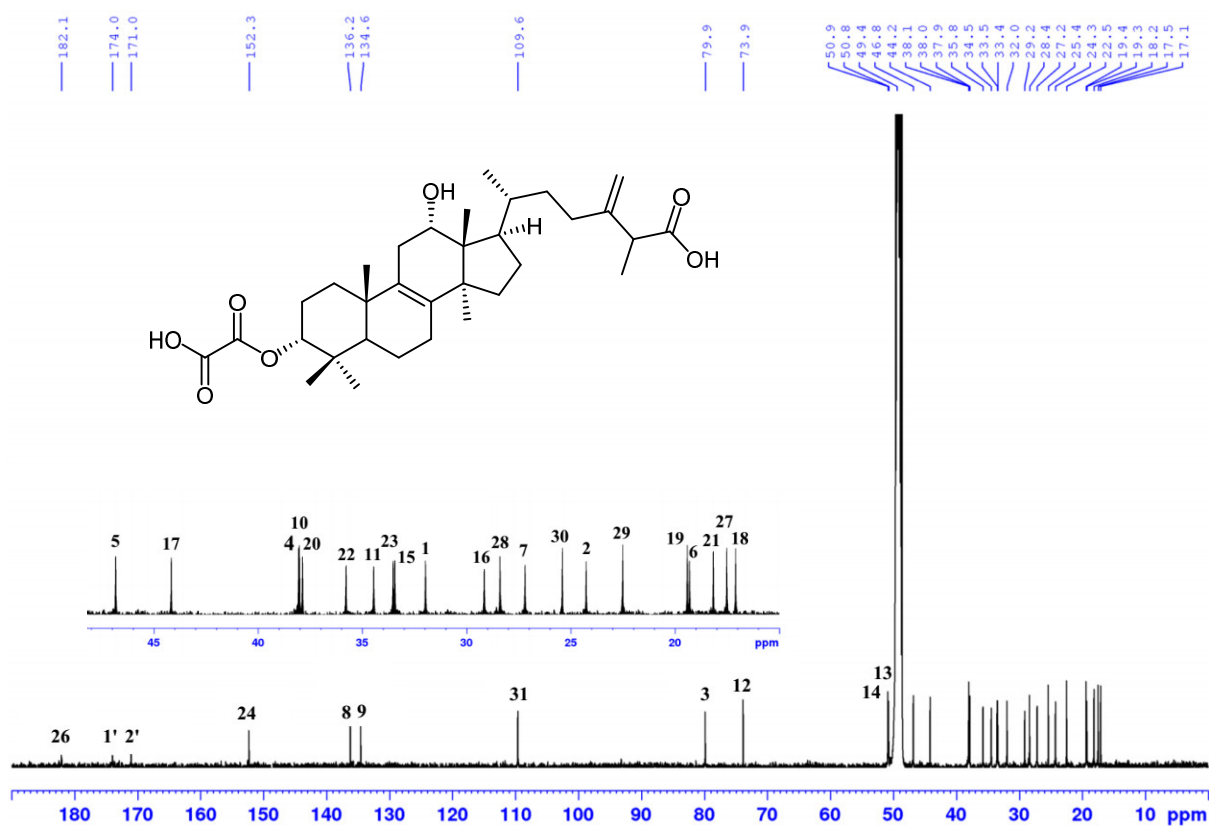
### 2.3.19. Određivanje strukture 12 $\alpha$ -hidroksi-3 $\alpha$ -oksaliloksi-24-metilen-26-lanost-8-enske kiseline – poliporenske kiseline E (19)

Jedinjenje **19** izolovano je kao bela čvrsta supstanca. Molekulska formula,  $\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{O}_7$ , određena je iz HR-ESI-MS spektra na osnovu deprotonovanog molekulskog jona  $[\text{M}-\text{H}]^-$  na  $m/z$  557,3471 vrednosti. Na osnovu  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podataka (**Tabela 17**) uočava se velika sličnost sa derivatima 24-metilen-26-lanost-8-enskih kiselina izolovanih iz ove i drugih gljiva opisanih u literaturi. U  $^1\text{H}$  NMR spektru (**Slika 42**) uočava se pet singleta na  $\delta_{\text{H}}$  0,65, 0,93, 0,96, 1,03, 1,12 i dva dubleta na  $\delta_{\text{H}}$  1,05 ( $J=6,6$  Hz) i 1,24 ( $J=7,1$  Hz) metil grupa, dublet na  $\delta_{\text{H}}$  4,00 ( $J=8,0$  Hz) i prošireni singlet na  $\delta_{\text{H}}$  4,67 koji potiču od oksigenovanih metinskih grupa. Hemijsko pomeranje i multiplicitet H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  4,67, brs) određeni su na osnovu korelacije H-3/H<sub>2</sub>-2 iz COSY spektra (**Slika 44**) i NOESY korelacija H-3/H<sub>2</sub>-2, H<sub>3</sub>-28, H<sub>3</sub>-29 (**Slika 47**). Signal protona na  $\delta_{\text{H}}$  4,00 (d,  $J=8,0$  Hz) definisan je kao H-12 $\beta$  na osnovu korelacija H-12 $\beta$ /H<sub>3</sub>-18, H<sub>3</sub>-19 korelacija u NOESY spektru, a uz pomoć COSY korelacije H-12/H-11. U  $^{13}\text{C}$  i HSQC NMR spektrima (**Slike 43 i 45**) uočavaju se 33 signala, od kojih 31 odgovaraju ugljenicima iz lanostanskog skeleta. Preostala dva signala na  $\delta_{\text{C}}$  171,0 (C-1') i 174,0 (C-2') pripadaju 3 $\alpha$ -O-acil supstituentu. Na osnovu ovoga, kao i masenog spektra, zaključeno je da supstituent oksaliloksi grupa. Na osnovu korelacije H-3/C-1' u HMBC spektru (**Slika 46**) potvrđen je položaj ove estarske grupe na C-3 atomu. Analizom NOESY spektra, na osnovu korelacija H-20/H<sub>3</sub>-18, H-12 $\beta$ , H-12 $\beta$ /H<sub>3</sub>-21 i H-17/H<sub>3</sub>-30 potvrđene su  $\alpha$ -orijentacija H-17 i  $\beta$ -orijentacija H-20. Konfiguracija na C-25 nije određena. Oksaliloksi grupa je jedinstven tip supstituenta na triterpenskom

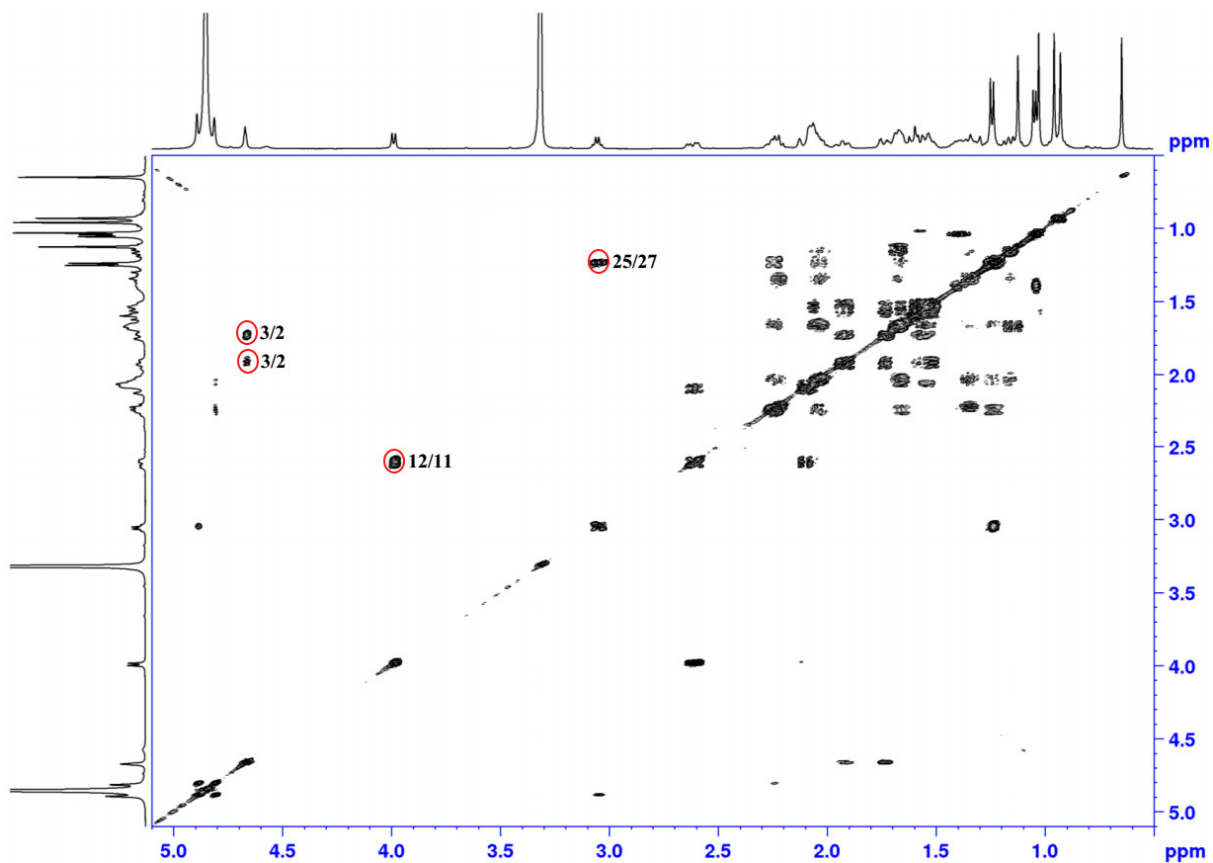
skeletu, po prvi put opisan u literaturi. Na osnovu svega navedenog zaključeno je da jedinjenje **19** predstavlja 12 $\alpha$ -hidroksi-3 $\alpha$ -oksaliloksi-24-metilen-26-lanost-8-ensku kiselinu, novi prirodni proizvod nazvan poliporenska kiselina E.



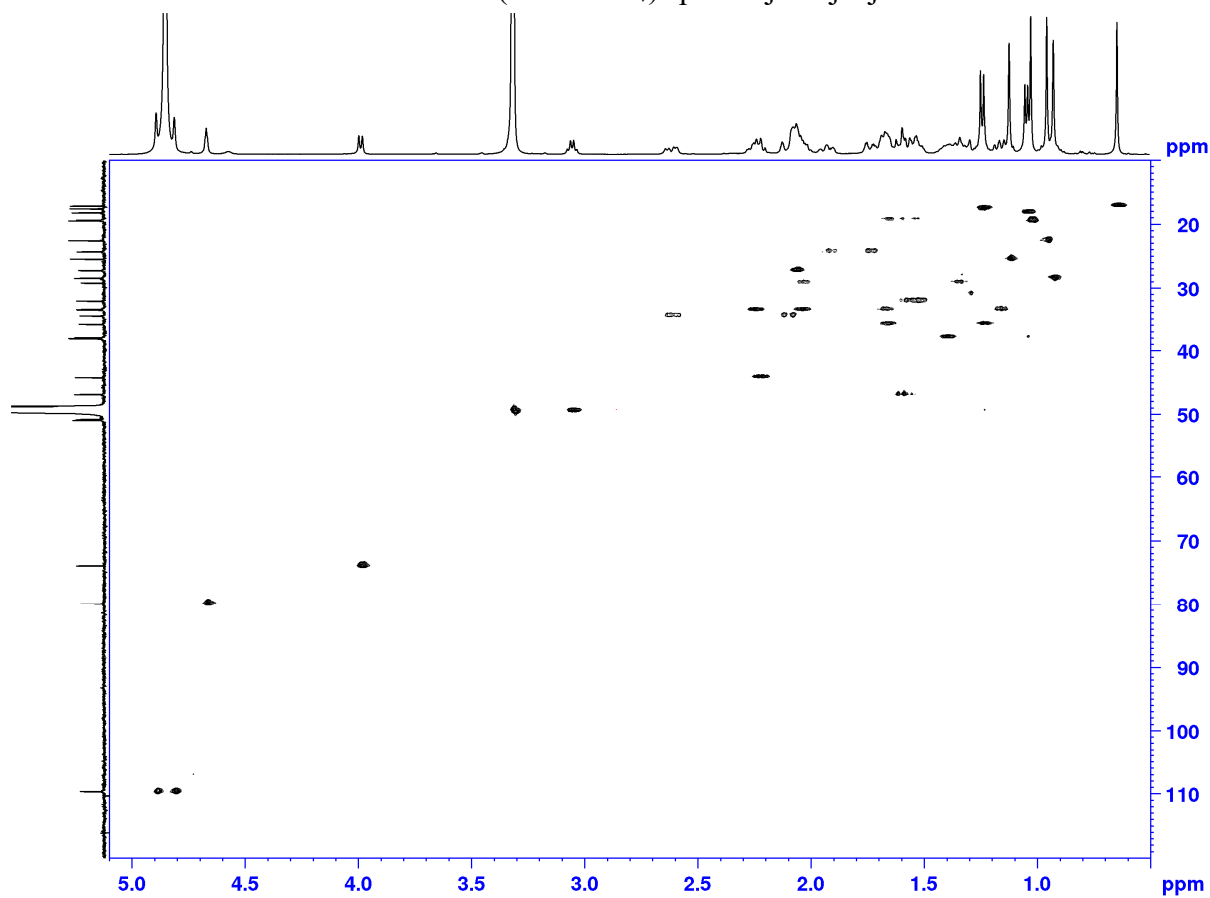
Slika 42.  $^1\text{H}$  NMR spektar (500 MHz, metanol- $d_4$ ) jedinjenja **19**.



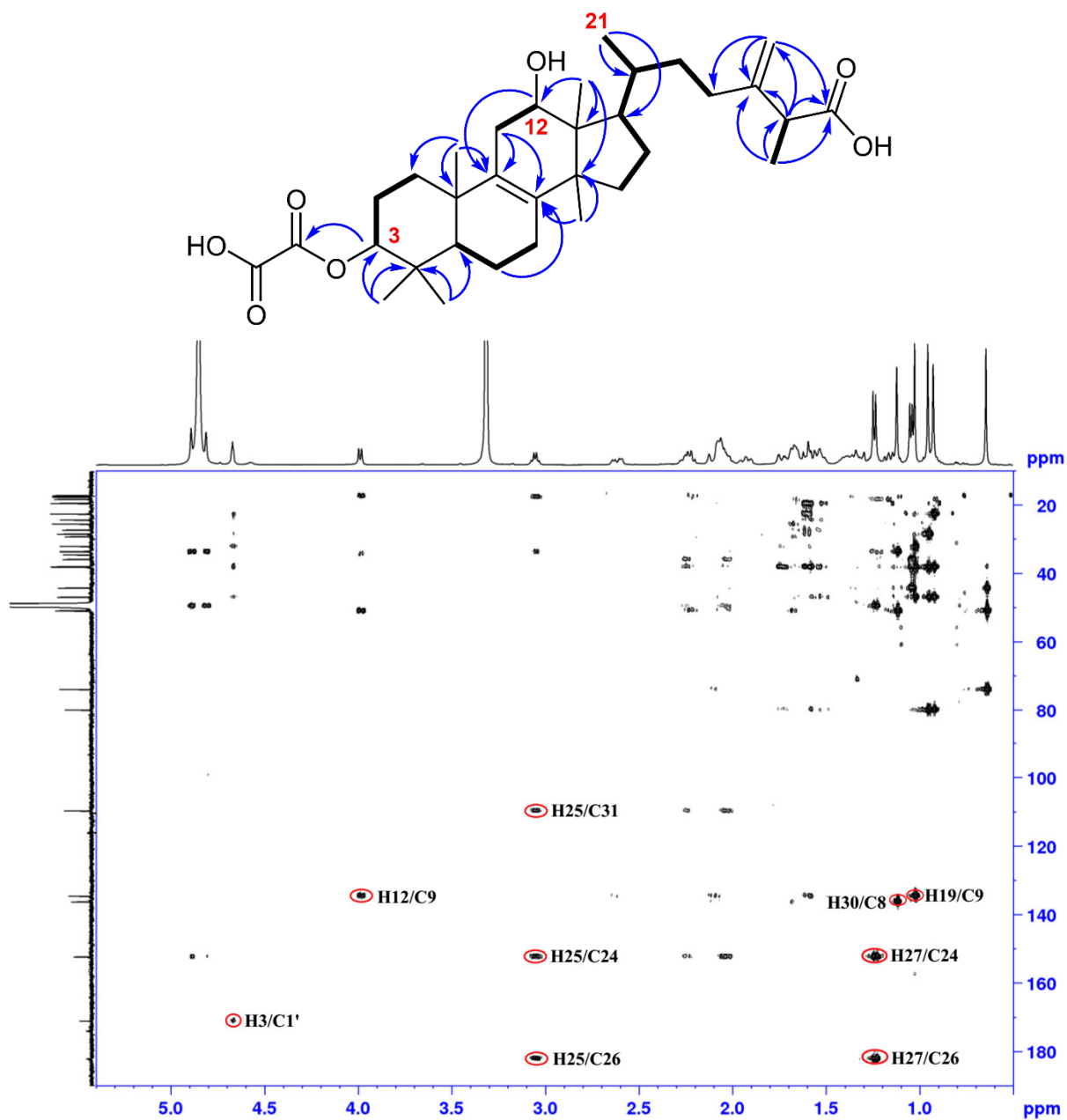
Slika 43.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (125 MHz, metanol- $d_4$ ) i struktura jedinjenja **19**.



Slika 44. COSY (metanol- $d_4$ ) spektar jedinjenja 19.

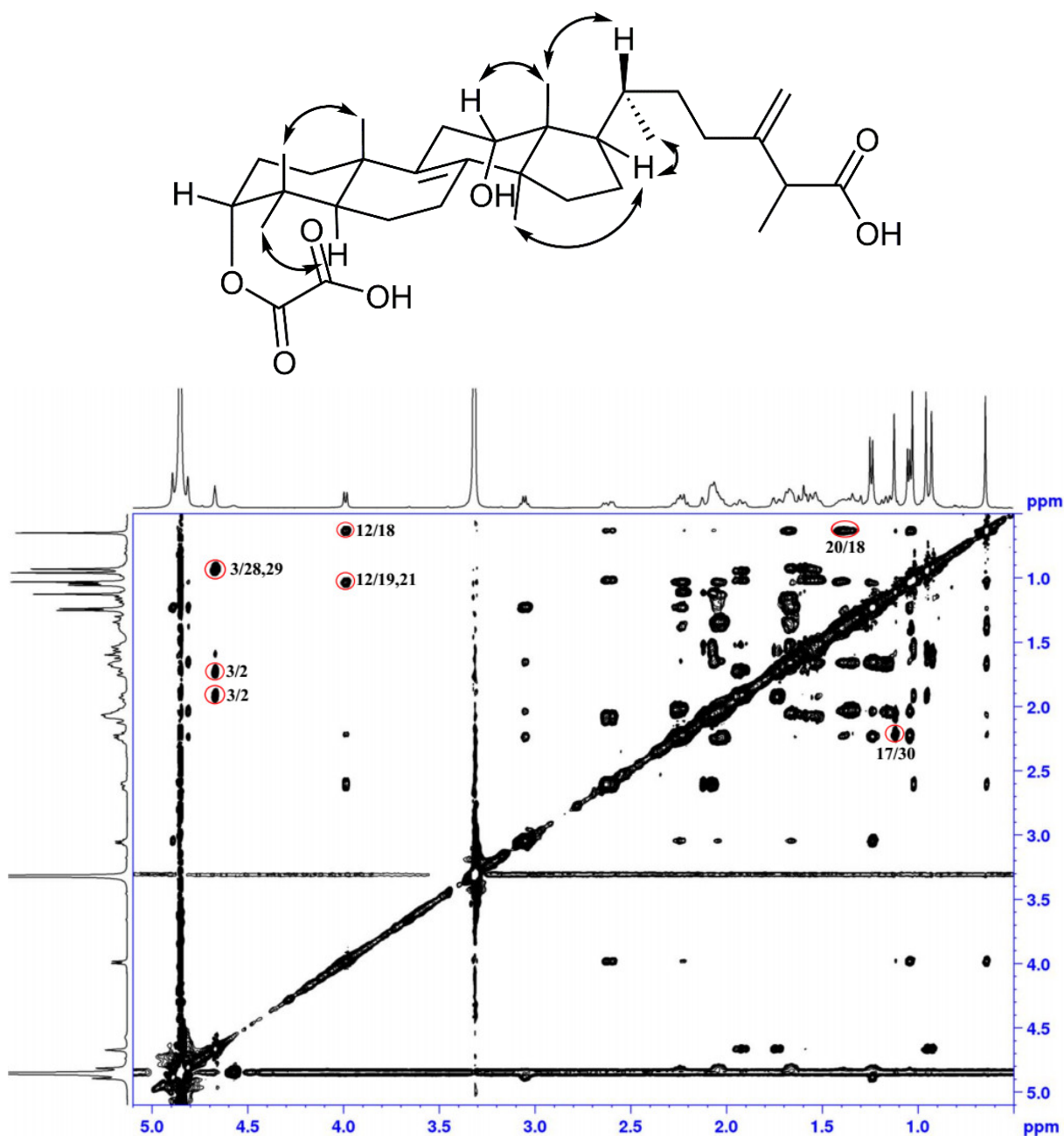


Slika 45. HSQC (metanol- $d_4$ ) spektar jedinjenja 19.



Slika 46. HMBC korelacije i spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 19.



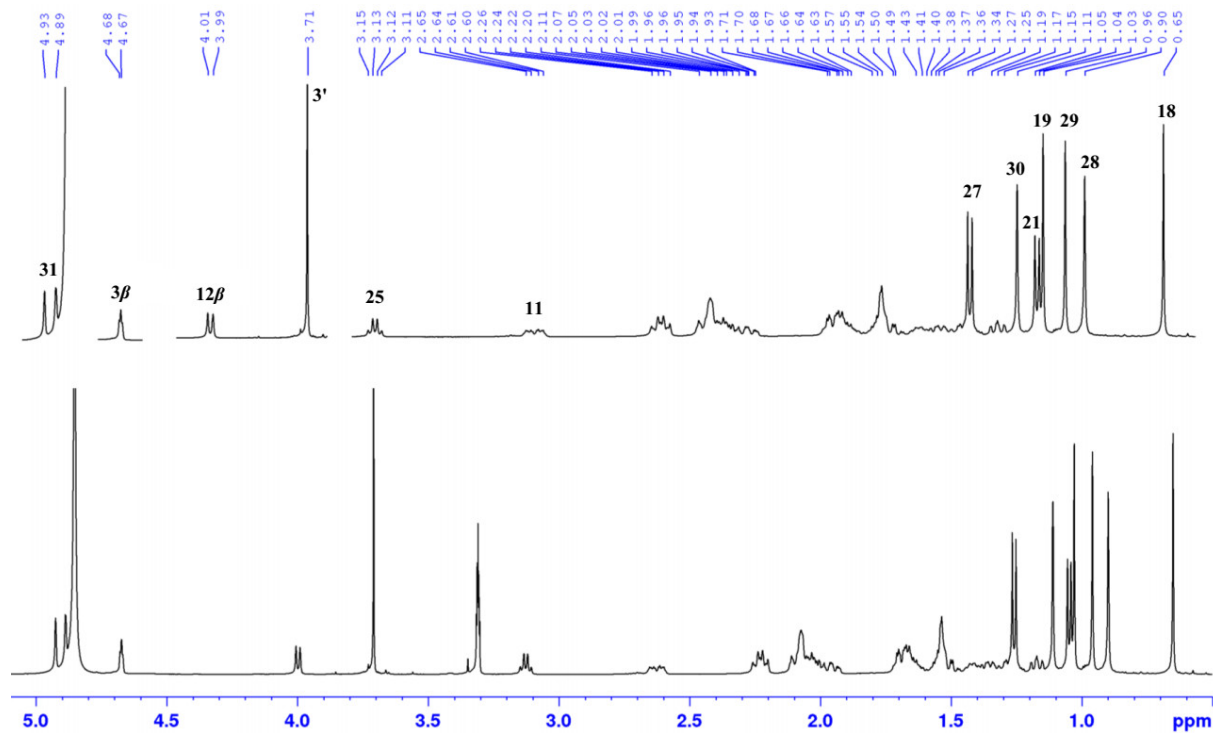


Slika 47. NOESY korelacije i spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 19.

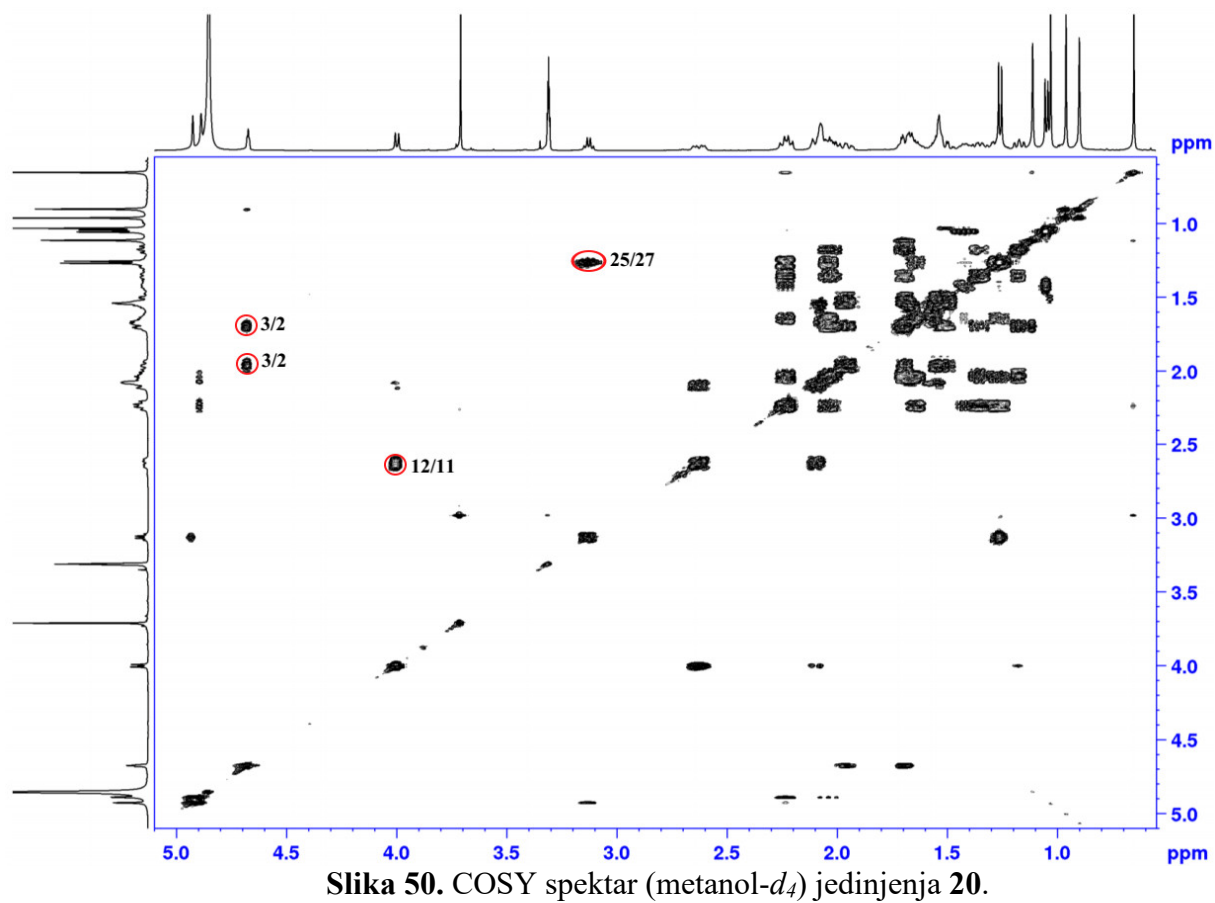
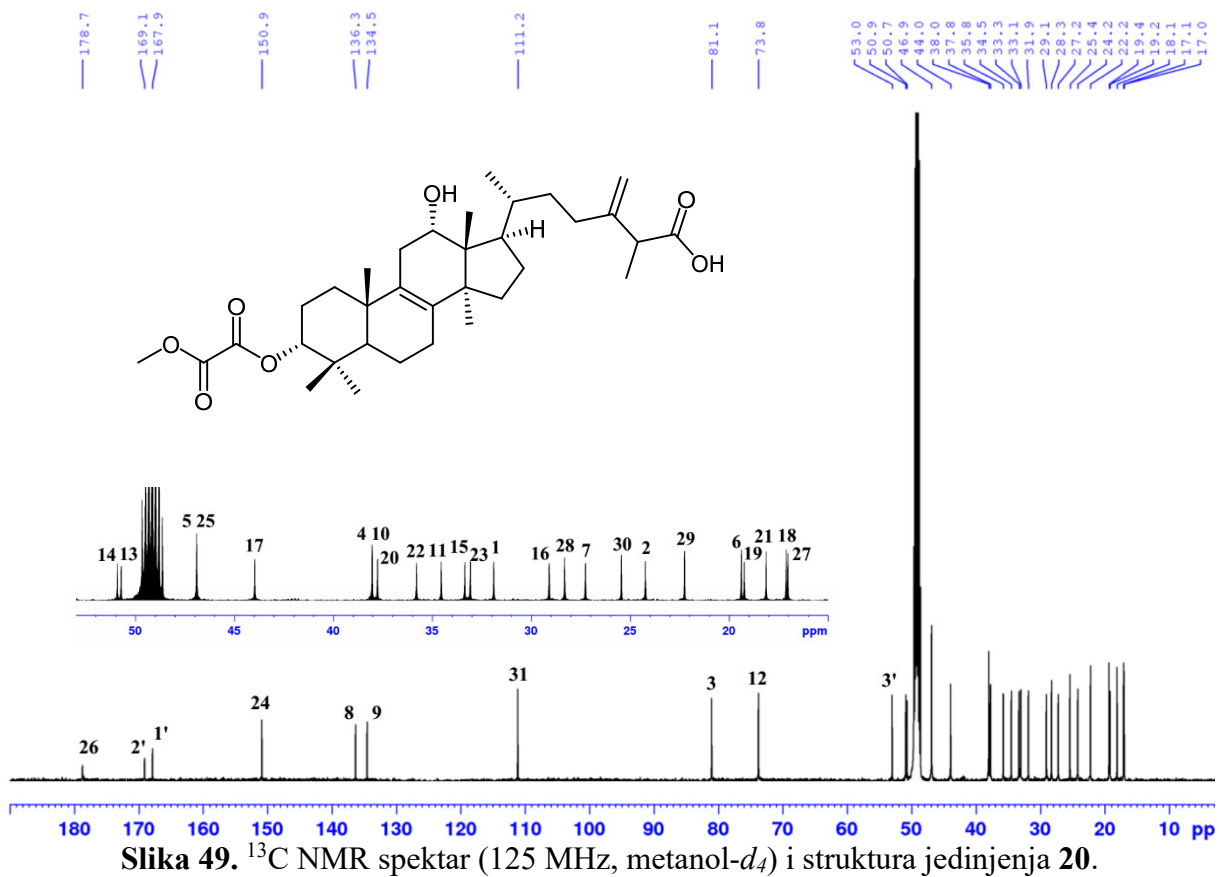
### 2.3.20. Određivanje strukture 12 $\alpha$ -hidroksi-3 $\alpha$ -(2'-O-metil-oksaliloksi)-24-metilen-26-lanost-8-enske kiseline – poliporenske kiseline F (20)

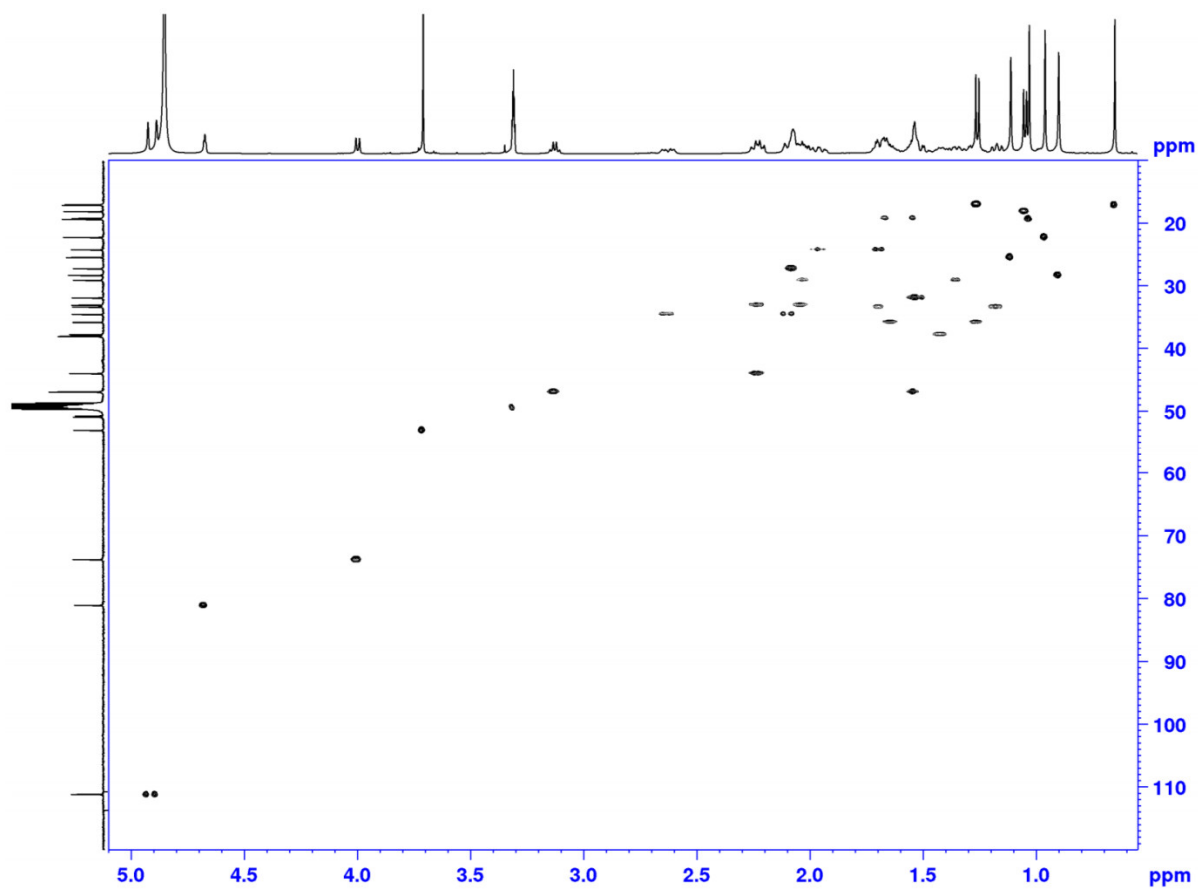
Jedinjenje **20** izolovano je kao bela kristalna supstanca. Na osnovu molekulskog jona  $[M+HCOO]^-$  na  $m/z$  617,3689 vrednosti određena je molekulska formula  $C_{34}H_{52}O_7$ . Molekulska formula je potvrđena i na osnovu deprotonovanog molekulskog jona dobijenog primenom APCI tehnike jonizacije,  $[M-H]^-$  na  $m/z$  571,3640. Analizom  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR podataka (Tabela 17) uočava se velika sličnost sa jedinjenjem **19**. Za razliku od jedinjenja **19**, u NMR spektrima jedinjenja **20** (Slike 48-53) nalazi se dodatni signal na  $\delta_H$  3,71 i  $\delta_C$  53,0, koji potiču od metoksi grupe  $H_3-3'$ . U HMBC spektru (Slika 52) uočava se korelacija  $H_3-3'/C-2'$ , na osnovu čega je utvrđeno da je supstituent 2'-O-metil-oksaliloksi grupa, koji se nalazi u C-3 položaju. Nakon dekonvolucije IR spektra (Slika 54) jedinjenja **20** uočavaju se tri trake koje potiču od C=O valencionih vibracija na 1751, 1732  $cm^{-1}$  (oksalatni estar) i 1708  $cm^{-1}$  (karboksilna kiselina), što je u saglasnosti sa prethodnom pretpostavkom. Korelacije navedene za jedinjenje **19**, prisutne su i u spektrima jedinjenja **20**, na osnovu čega je

određana struktura i stereohemija molekula. Korelacija H<sub>3</sub>-3'/H-30 iz NOESY spektra (Slika 53) i oblik signala H-3 (prošireni singlet) jasno ukazuju na  $\alpha$ -orijentacija supstituenta. Na osnovu svega navedenog, zaključuje se da jedinjenja **20** predstavlja 12 $\alpha$ -hidroksi-3 $\alpha$ -(2'-*O*-metil-oksaliloksi)-24-metilen-26-lanost-8-ensku kiselinu, novi prirodni proizvod nazvan poliporenska kiselina F. Važno je istaći, da je ovo drugi primer prirodnog triterpena sa 2'-*O*-metil-oksaliloksi supstituentom. Prvi primer je jedinjenje izolovano iz gljive *Perenniporia maackiae*.<sup>122</sup>

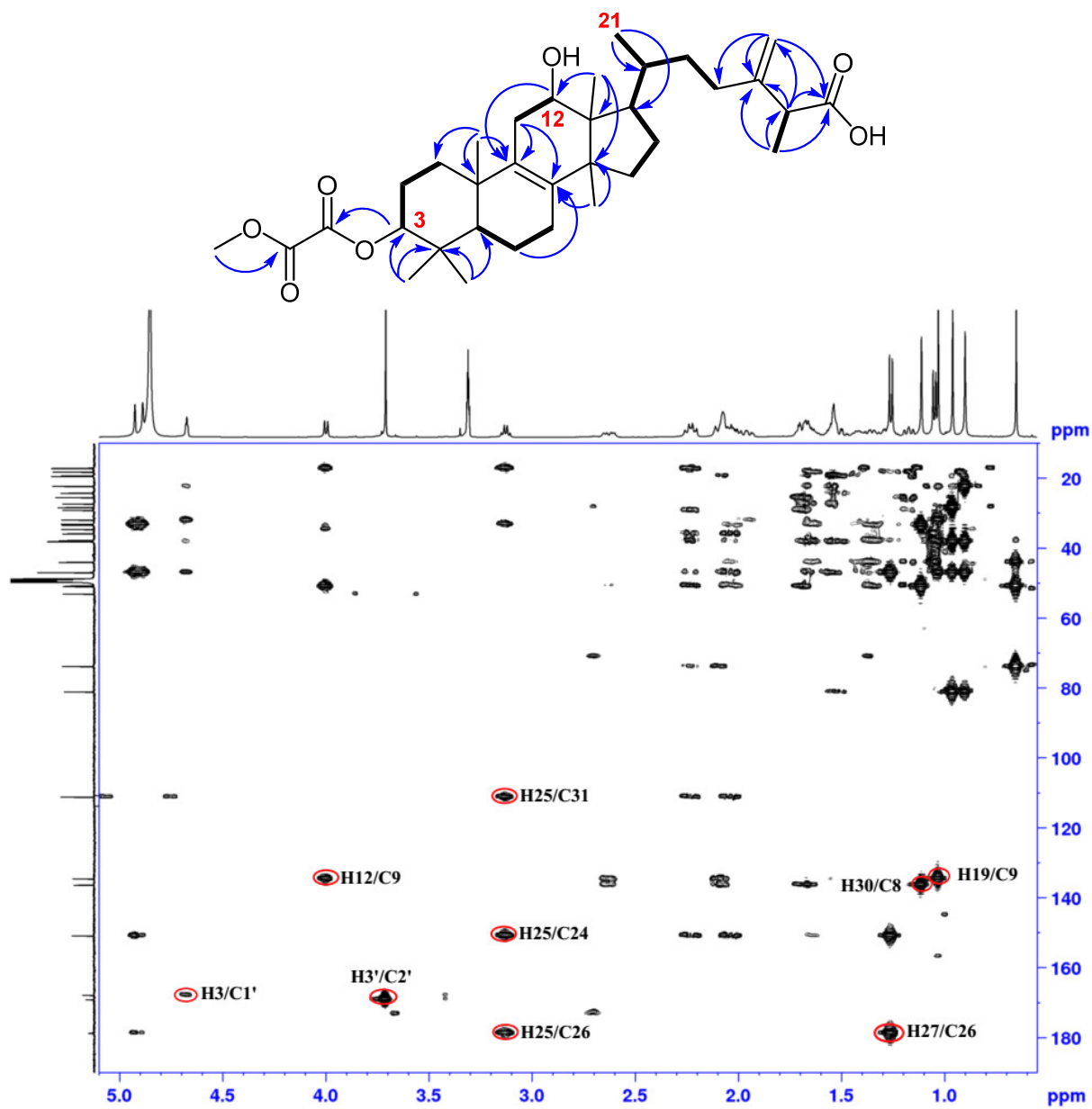


Slika 48. <sup>1</sup>H NMR spektar (500 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>) jedinjenja **20**.

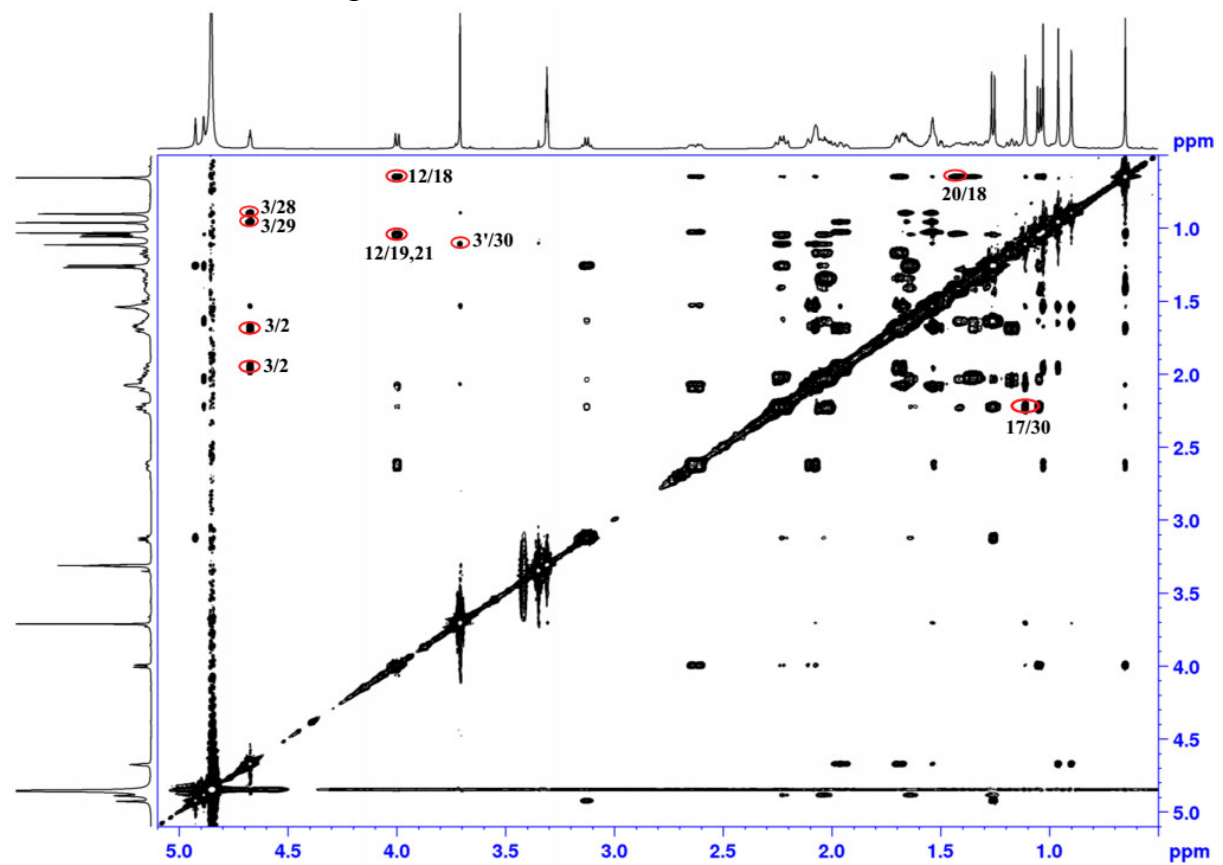
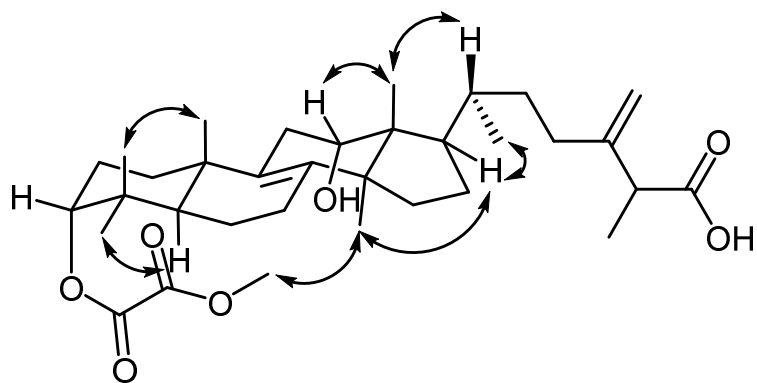




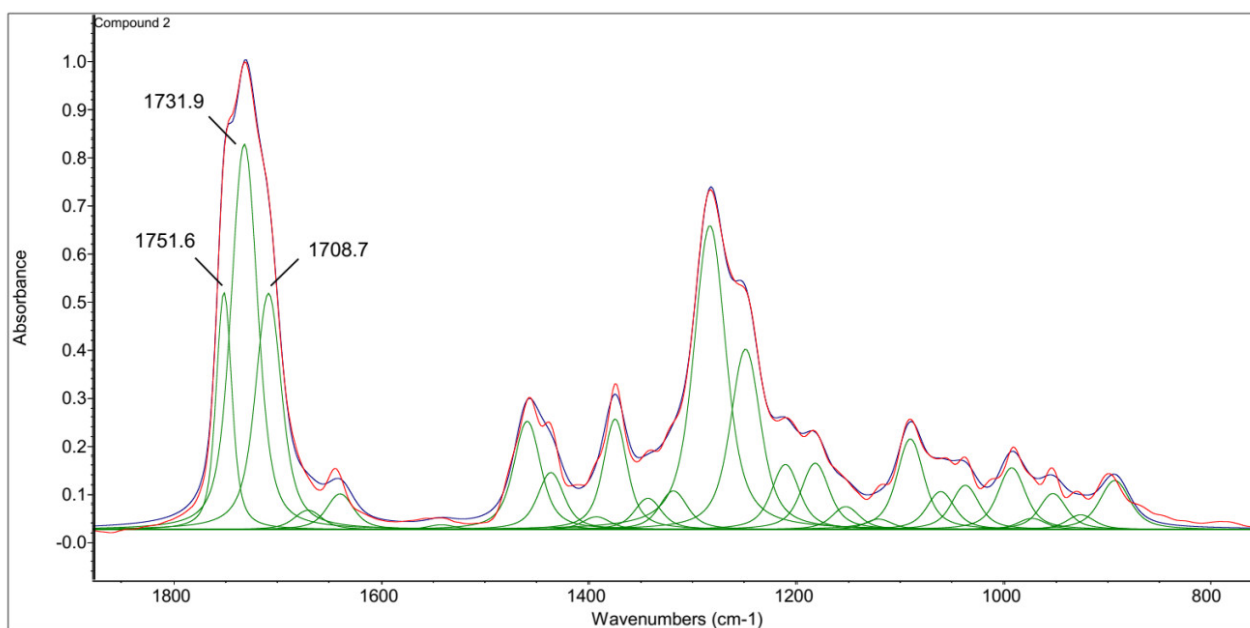
Slika 51. HSQC spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 20.



Slika 52. HMBC korelacije i spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 20.



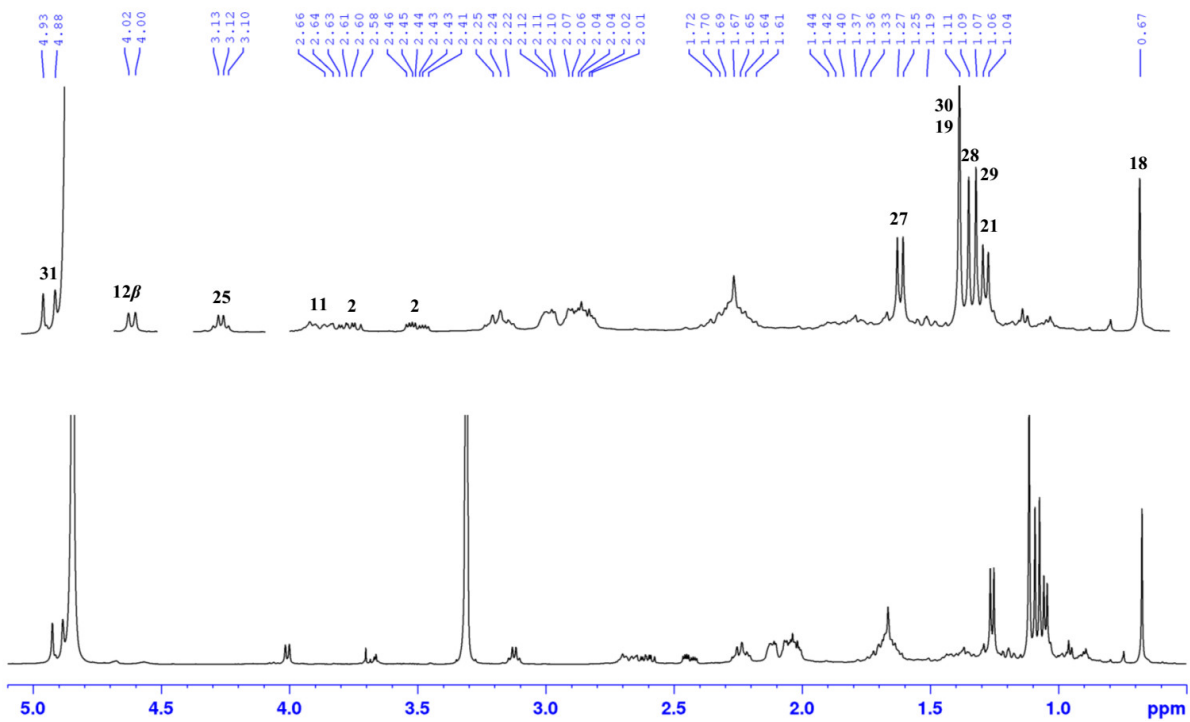
Slika 53. NOESY korelacije i spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 20.



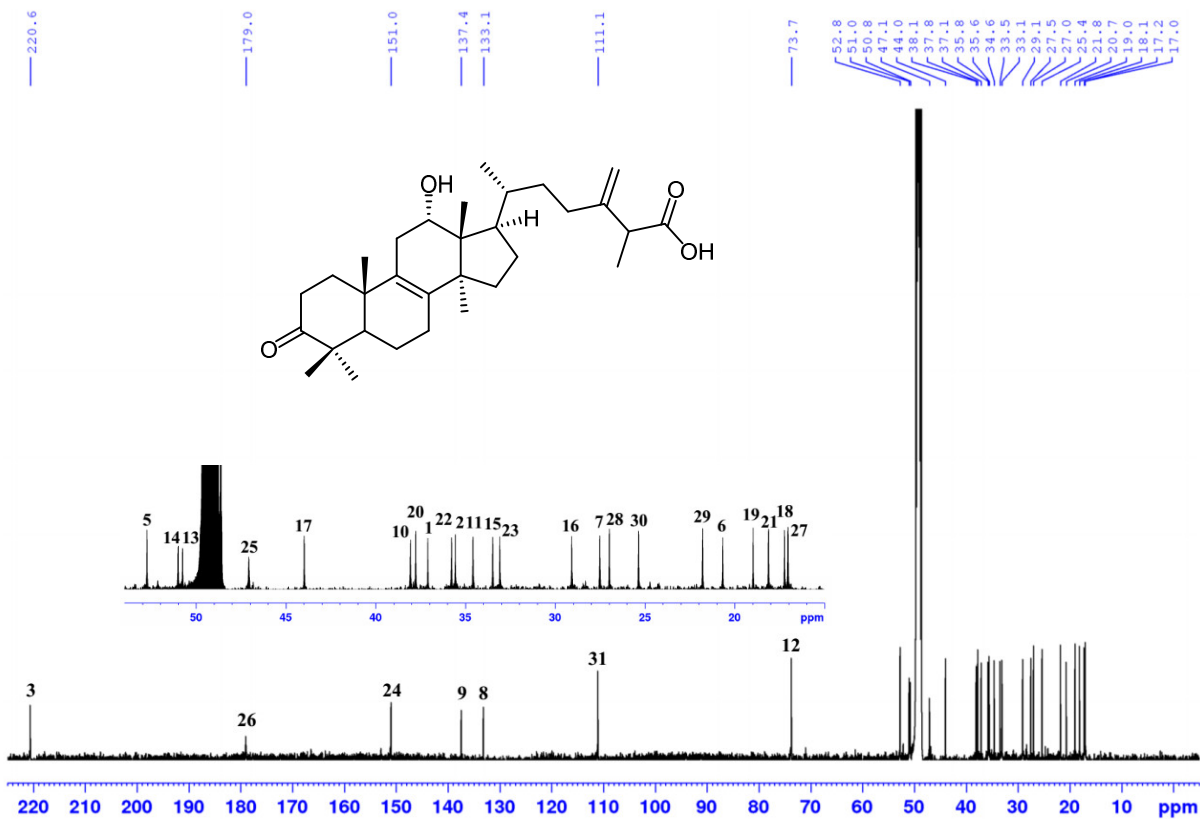
**Slika 54.** Proizvod dekonvolucije FTIR spektra jedinjenja **20** (plavom bojom prikazan je originalni spektar, crvenom rezultujući spektar proizvoda dekonvolucije i zelenom pojedinačni signali nakon dekonvolucije).

### 2.3.21. Određivanje strukture 12 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-3-okso-26-lanost-8-enske kiseline – poliporenske kiseline **G** (**21**)

Jedinjenje **21**, bela kristalna supstanca, ima molekulska formulu  $C_{31}H_{48}O_4$ , dobijenu na osnovu deprotonovanog molekulskog jona  $[M-H]^-$  na  $m/z$  485,3479 vrednosti, iz HR-ESI-MS spektra. Na osnovu analize  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR spektara (**Tabela 16**, **Slike 55** i **56**) uočava se sličan oblik i raspored signala kao kod jedinjenja **19** i **20**, pa je zaključeno da i jedinjenje **21** pripada grupi 24-metilen-26-lanost-8-enskih kiselina, što je u saglasnosti sa korelacijama iz 2D NMR spektara (**Slike 57-60**). Za razliku od jedinjenja **19** i **20**, u  $^{13}C$  spektru prisutan je signal na  $\delta_C$  220,6 tipičan za keto grupu, a izostaju signali estarskih karbonilnih ugljenika iz 3 $\alpha$ -O-acil grupe, kao i signal H-3 koji se javlja kod ovih derivata. Korelacije H<sub>2</sub>-2, H<sub>2</sub>-1, H<sub>3</sub>-28, H<sub>3</sub>-29/C-3 u HMBC spektru (**Slika 59**) ukazuju na 3-keto grupu. Hemijsko pomeranje oksimetinskog protona na  $\delta_C$  4,01 (d,  $J=7,8$  Hz), korelacije H-12/C-9, C-13, C-14, C-18 u HMBC spektru, kao i korelacije H-12 $\beta$ /H-11, H<sub>3</sub>-18 i H<sub>3</sub>-21 u NOESY spektru (**Slika 60**) dovode do zaključka o 12 $\alpha$ -hidroksi supstituciji. Na osnovu svega navedenog zaključeno je da jedinjenje **21** predstavlja 12 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-3-okso-26-lanost-8-ensku kiselinu, novi prirodni proizvod nazvan poliporenska kiselina G.

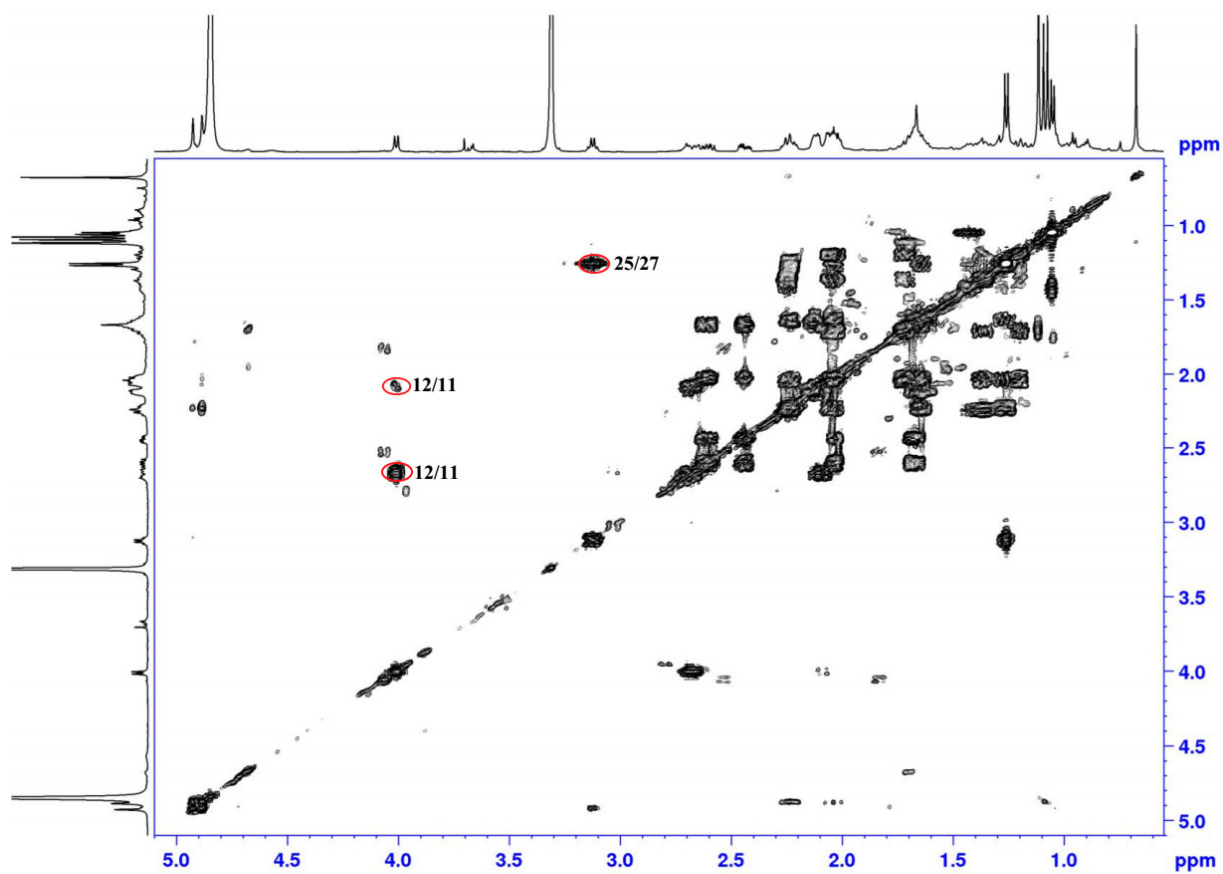


Slika 55.  $^1\text{H}$  NMR spektar (500 MHz, metanol- $d_4$ ) jedinjenja 21.

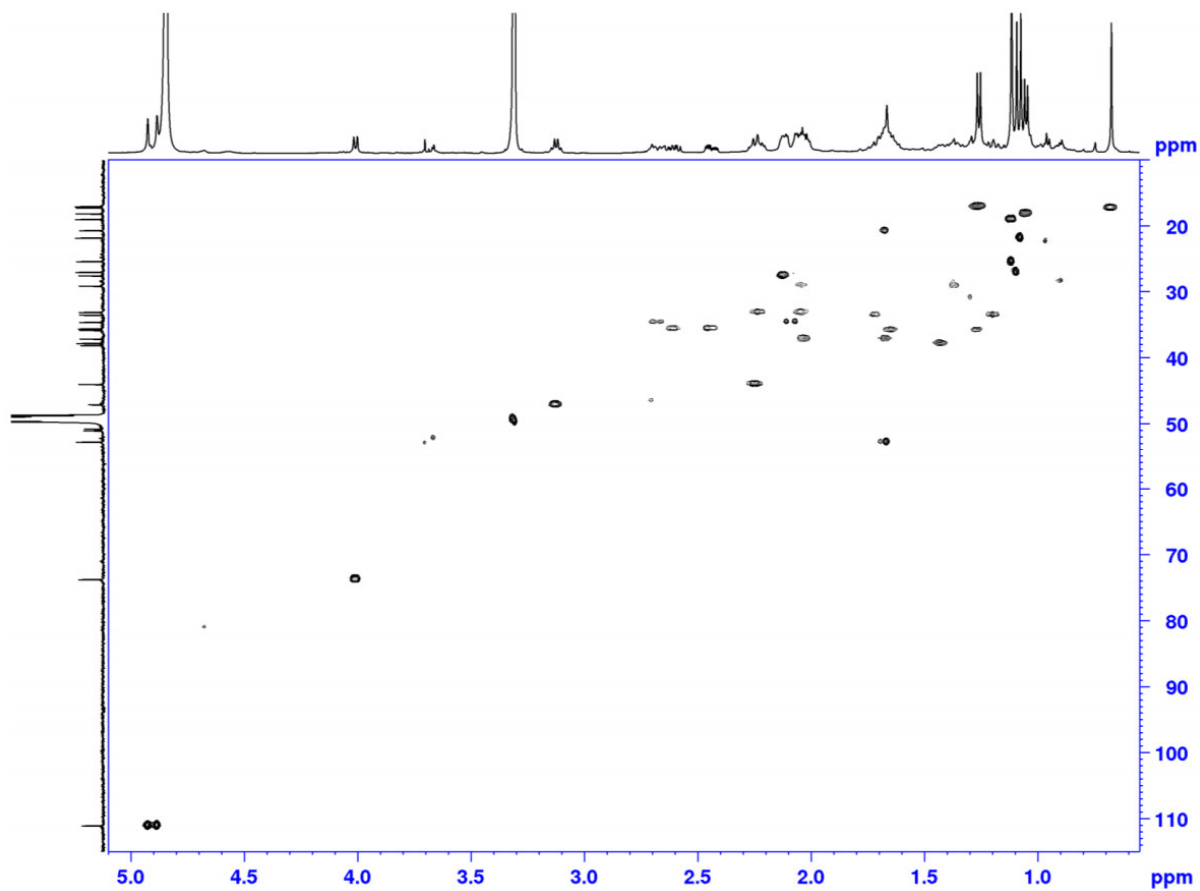


Slika 56.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (125 MHz, metanol- $d_4$ ) i struktura jedinjenja 21.

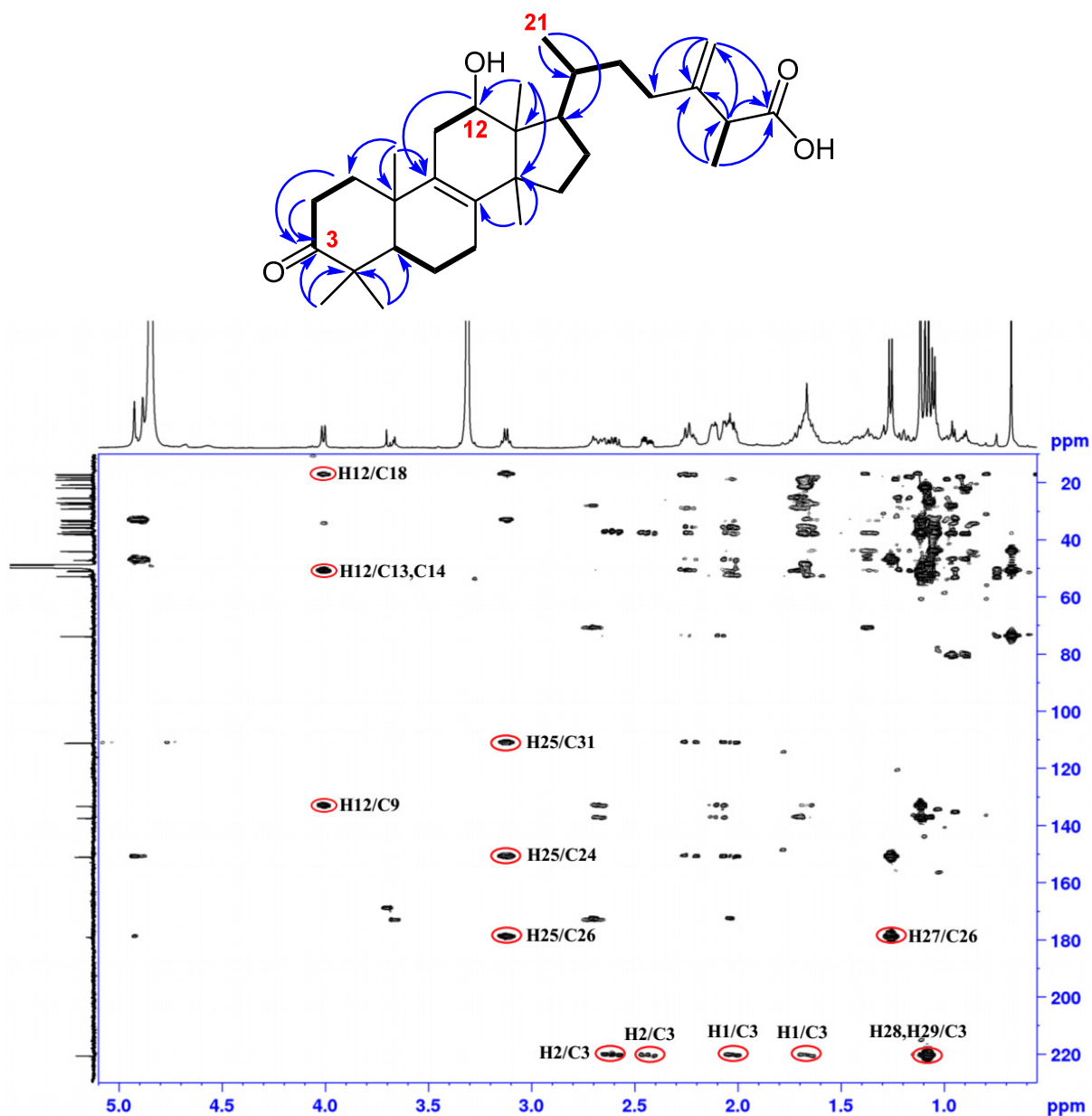




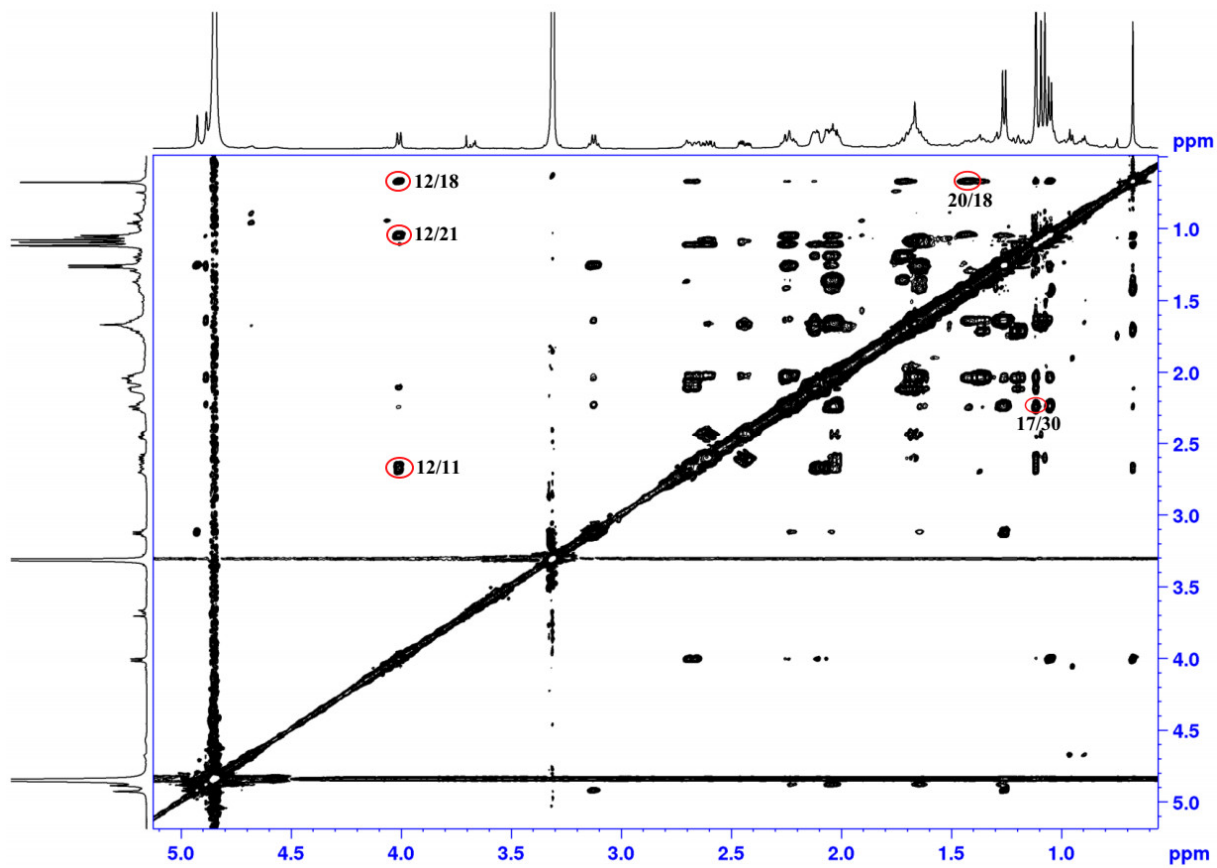
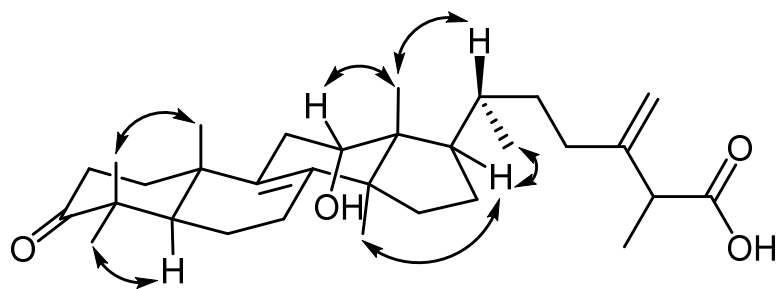
Slika 57. COSY spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 21.



Slika 58. HSQC spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 21.



Slika 59. HMBC korelacije i spektar (metanol-*d*<sub>4</sub>) jedinjenja 21.



Slika 60. NOESY korelacije i spektar (metanol-*d*<sub>4</sub>) jedinjenja 21.

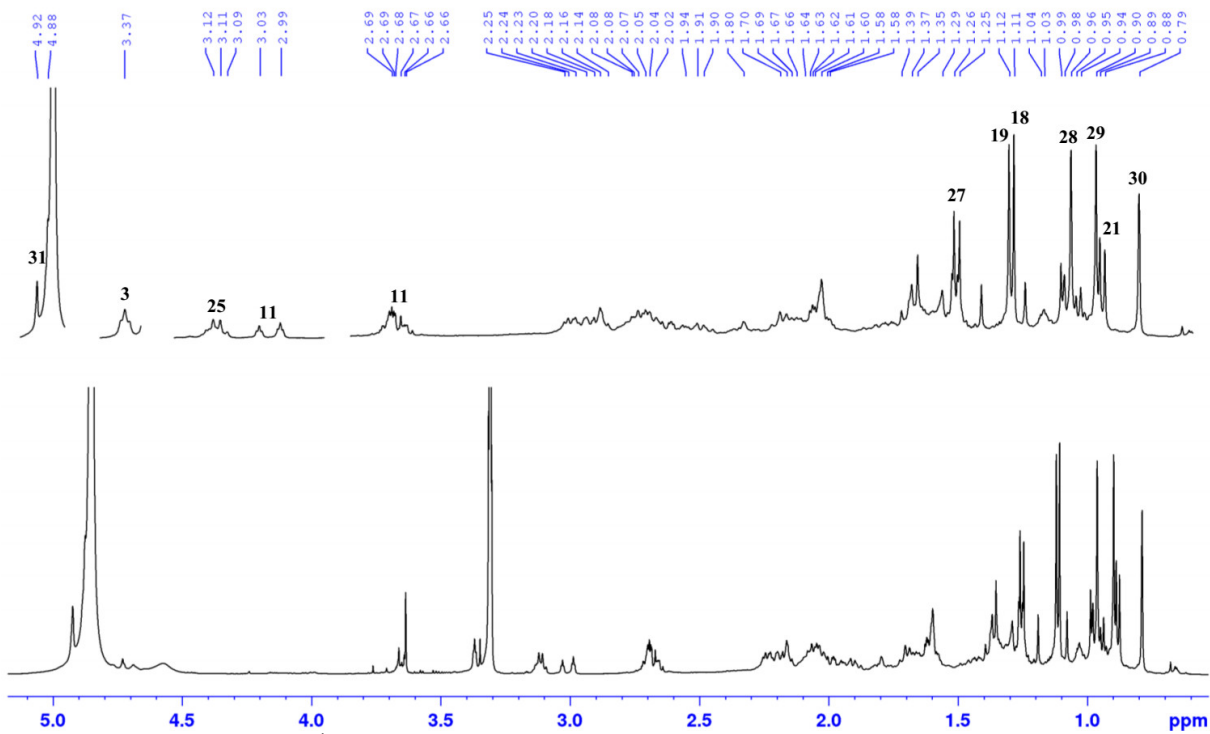
**Tabela 17.**  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) i  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) podaci za jedinjenja **19**, **20** i **21**.

| C/H | <b>19<sup>a</sup></b> |                              | <b>20<sup>a</sup></b> |                              | <b>21<sup>a</sup></b> |                              |
|-----|-----------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------------|
|     | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz) | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz) | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz) |
| 1   | 31,9                  | 1,52-1,56 (2H) m             | 31,9                  | 1,52-1,56 (2H) m             | 37,1                  | 1,67 m; 2,03 m               |
| 2   | 24,3                  | 1,73 m; 1,92 m               | 24,2                  | 1,70 m; 1,97 m               | 35,6                  | 2,44 m; 2,61 m               |
| 3   | 79,9                  | 4,67 brs                     | 79,9                  | 4,69 dd (3,6; 2,0)           | 220,6                 | -                            |
| 4   | 38,1                  | -                            | 38,1                  | -                            | 48,9*                 | -                            |
| 5   | 46,8                  | 1,59 m                       | 46,9                  | 1,55 m                       | 52,8                  | 1,67 m                       |
| 6   | 19,3                  | 1,55 m; 1,66 m               | 19,3                  | 1,55 m; 1,67 m               | 20,7                  | 1,65-1,69 (2H) m             |
| 7   | 27,2                  | 2,06-2,10 (2H) m             | 27,3                  | 2,08-2,11 (2H) m             | 27,5                  | 2,07 m; 2,12 m               |
| 8   | 136,2                 | -                            | 136,4                 | -                            | 137,4                 | -                            |
| 9   | 134,7                 | -                            | 134,6                 | -                            | 133,2                 | -                            |
| 10  | 38,0                  | -                            | 38,1                  | -                            | 38,1                  | -                            |
| 11  | 34,4                  | 2,10 m; 2,61 m               | 34,5                  | 2,10 m; 2,64 m               | 34,6                  | 2,09 m; 2,68 m               |
| 12  | 73,9                  | 4,00 d (8,0)                 | 73,8                  | 4,00 d (8,0)                 | 73,7                  | 4,01 d (8,0)                 |
| 13  | 50,8                  | -                            | 50,7                  | -                            | 50,8                  | -                            |
| 14  | 50,9                  | -                            | 50,9                  | -                            | 51,0                  | -                            |
| 15  | 33,4                  | 1,16 m; 1,67 m               | 33,4                  | 1,17 m; 1,70 m               | 33,5                  | 1,20 m; 1,71 m               |
| 16  | 29,2                  | 1,34 m; 2,03 m               | 29,1                  | 1,36 m; 2,03 m               | 29,1                  | 1,37 m; 2,04 m               |
| 17  | 44,2                  | 2,23 m                       | 44,0                  | 2,24 m                       | 44,0                  | 2,24 m                       |
| 18  | 16,8                  | 0,65 s                       | 17,1                  | 0,66 s                       | 17,2                  | 0,67 s                       |
| 19  | 19,4                  | 1,03 s                       | 19,2                  | 1,04 s                       | 19,0                  | 1,11 s                       |
| 20  | 37,9                  | 1,40 m                       | 37,8                  | 1,42 m                       | 37,8                  | 1,43 m                       |
| 21  | 18,2                  | 1,05 d (6,6)                 | 18,0                  | 1,06 d (6,6)                 | 18,1                  | 1,05 d (6,6)                 |
| 22  | 35,8                  | 1,23 m; 1,66 m               | 35,8                  | 1,27 m; 1,65 m               | 35,8                  | 1,26 m; 1,65 m               |
| 23  | 33,5                  | 2,05 m; 2,24 m               | 33,1                  | 2,04 m; 2,24 m               | 33,1                  | 2,04 m; 2,24 m               |
| 24  | 152,3                 | -                            | 150,9                 | -                            | 151,0                 | -                            |
| 25  | 49,4*                 | 3,06 q (7,1)                 | 46,9                  | 3,14 q (7,1)                 | 47,1                  | 3,12 q (7,1)                 |
| 26  | 182,1                 | -                            | 178,8                 | -                            | 179,0                 | -                            |
| 27  | 17,5                  | 1,24 d (7,1)                 | 17,0                  | 1,27 d (7,1)                 | 17,1                  | 1,26 d (7,1)                 |
| 28  | 28,4                  | 0,93 s                       | 28,3                  | 0,90 s                       | 27,0                  | 1,09 s                       |
| 29  | 22,5                  | 0,96 s                       | 22,2                  | 0,97 s                       | 21,8                  | 1,08 s                       |
| 30  | 25,4                  | 1,12 s                       | 25,4                  | 1,12 s                       | 25,4                  | 1,11 s                       |
| 31  | 109,6                 | 4,81 d (2,0); 4,89 d (2,0)   | 111,2                 | 4,90 d (2,0); 4,93 d (2,0)   | 111,1                 | 4,89 brs; 4,93 brs           |
| 3-  |                       |                              |                       |                              |                       |                              |
| 1'  | 171,0                 | -                            | 167,9                 | -                            |                       |                              |
| 2'  | 174,0                 | -                            | 169,1                 | -                            |                       |                              |
| 3'  |                       |                              | 53,1                  | 3,72 s                       |                       |                              |

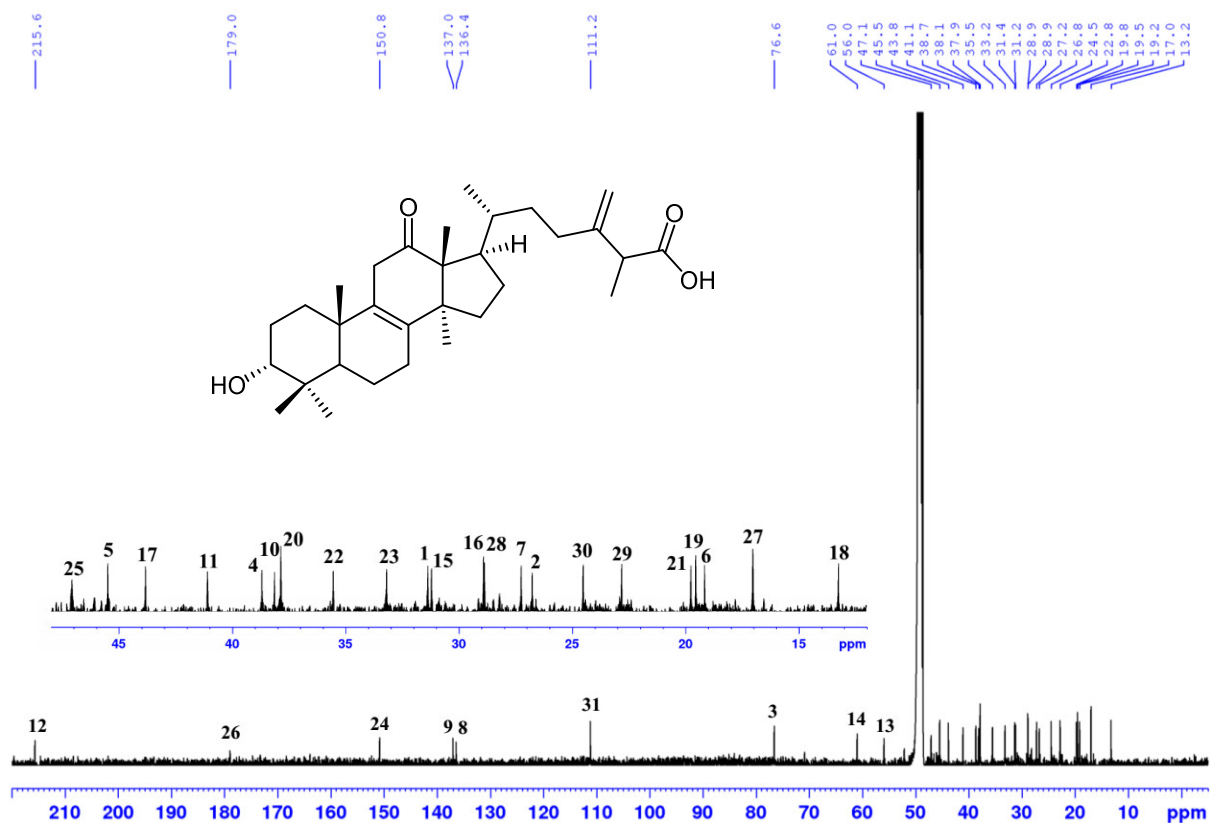
<sup>a</sup>Metanol-*d*<sub>4</sub>, \*očitan iz HSQC spektra

### 2.3.22. Određivanje strukture 3 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-12-okso-26-lanost-8-enske kiseline – poliporenske kiseline H (22)

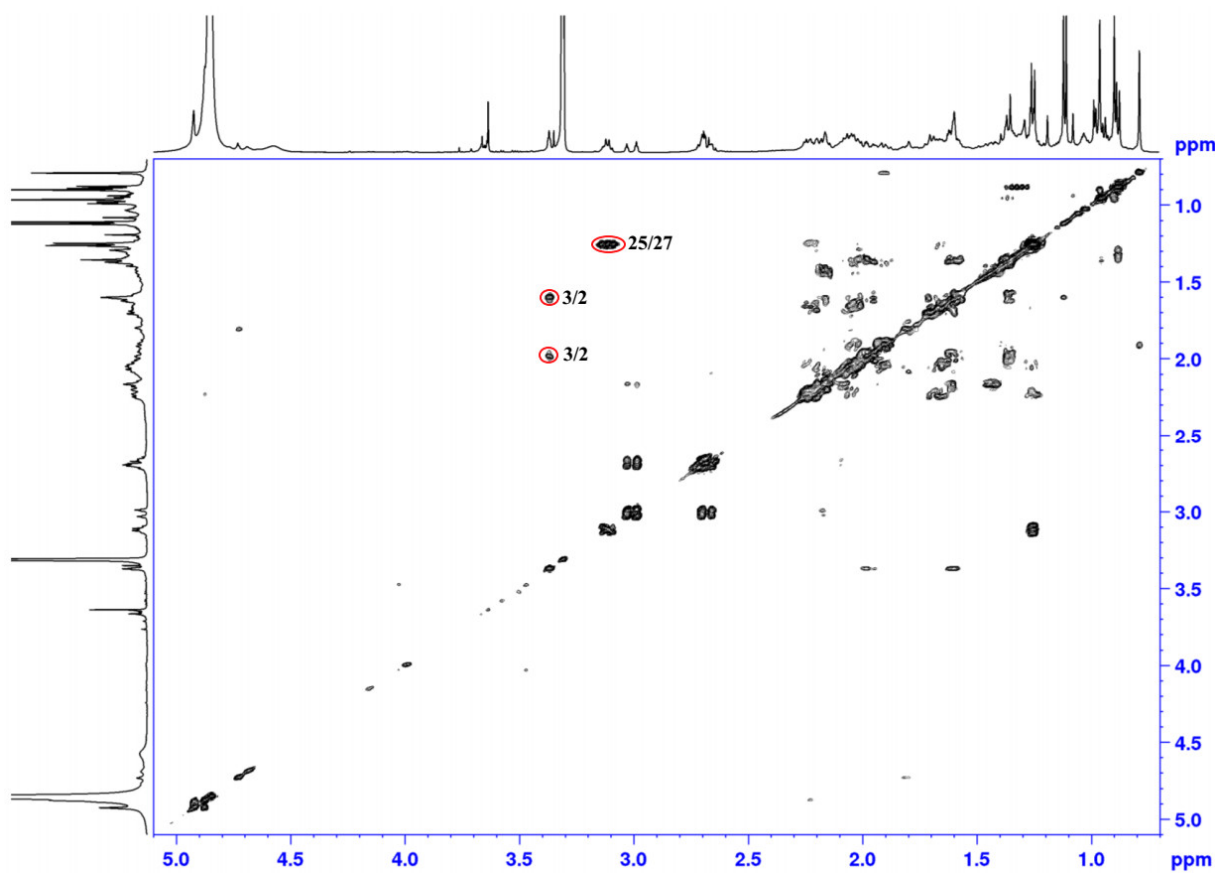
Jedinjenje **22** izolovano je kao bela kristalna supstanca. Na osnovu protonovanog molekulskog jona  $[\text{M}+\text{H}]^+$  na  $m/z$  485,3643 vrednosti, određena je molekulska formula  $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_4$ . Analizom  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podataka (**Tabela 18**, **Slike 61** i **62**) i velike sličnosti sa spektrima prethodno opisanih jedinjenja (**19-21**) zaključeno je da jedinjenje **22** pripada grupi derivata 24-metilen-26-lanost-8-enske kiseline. U  $^1\text{H}$  NMR spektru (**Slika 61**) uočava se signal oksimetinskog protona na  $\delta_{\text{H}}$  3,37 brs, potvrđen na osnovu analize HSQC spektra (**Slika 64**). Njegov položaj, H-3, je definisan COSY korelacijama H-3/H<sub>2</sub>-2 (**Slika 63**), kao i HMBC korelacijama H-3/C-1, C-5 (**Slika 65**). Na osnovu multipliciteta signala H-3 i NOESY korelacija H-3/H<sub>2</sub>-2, H<sub>3</sub>-28, H<sub>3</sub>-29 (**Slika 66**) identifikovana je 3 $\alpha$ -hidroksi supstitucija. U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru postoji signal keto grupe na  $\delta_{\text{C}}$  215,6. HMBC korelacije H-11, H<sub>3</sub>-18/C-12 (**Slika 65**) ukazuju da je keto grupa u C-12 položaju, kao kod prethodno opisanog poznatog jedinjenja **1** (palustrinske kiseline F). Utvrđeno je da jedinjenje **22** predstavlja 3 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-12-okso-26-lanost-8-ensku kiselinu, jedinjenje koje do sada nije opisano u literaturi, nazvano poliporenska kiselina H.



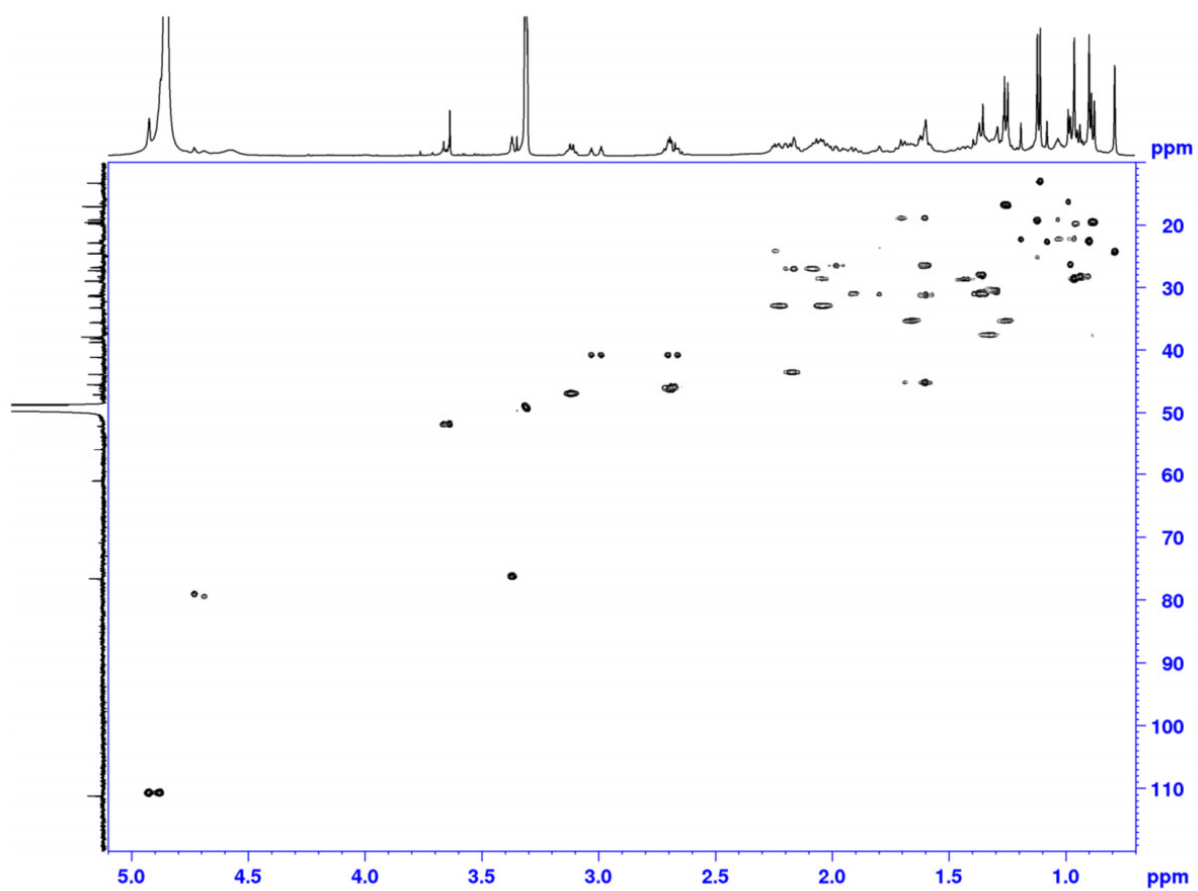
Slika 61.  $^1\text{H}$  NMR spektar (500 MHz, metanol- $d_4$ ) jedinjenja 22.



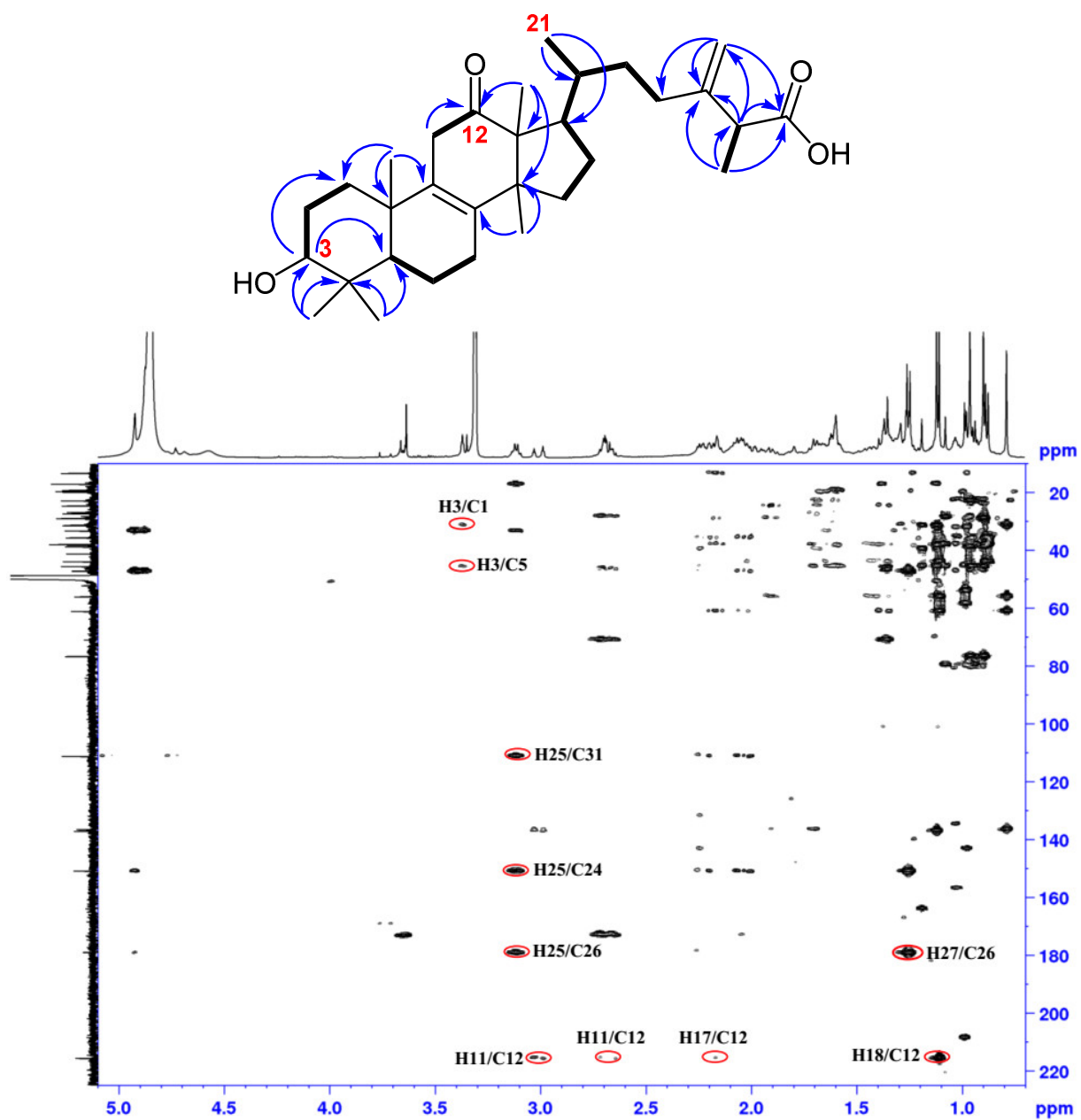
Slika 62.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (125 MHz, metanol- $d_4$ ) i struktura jedinjenja 22.



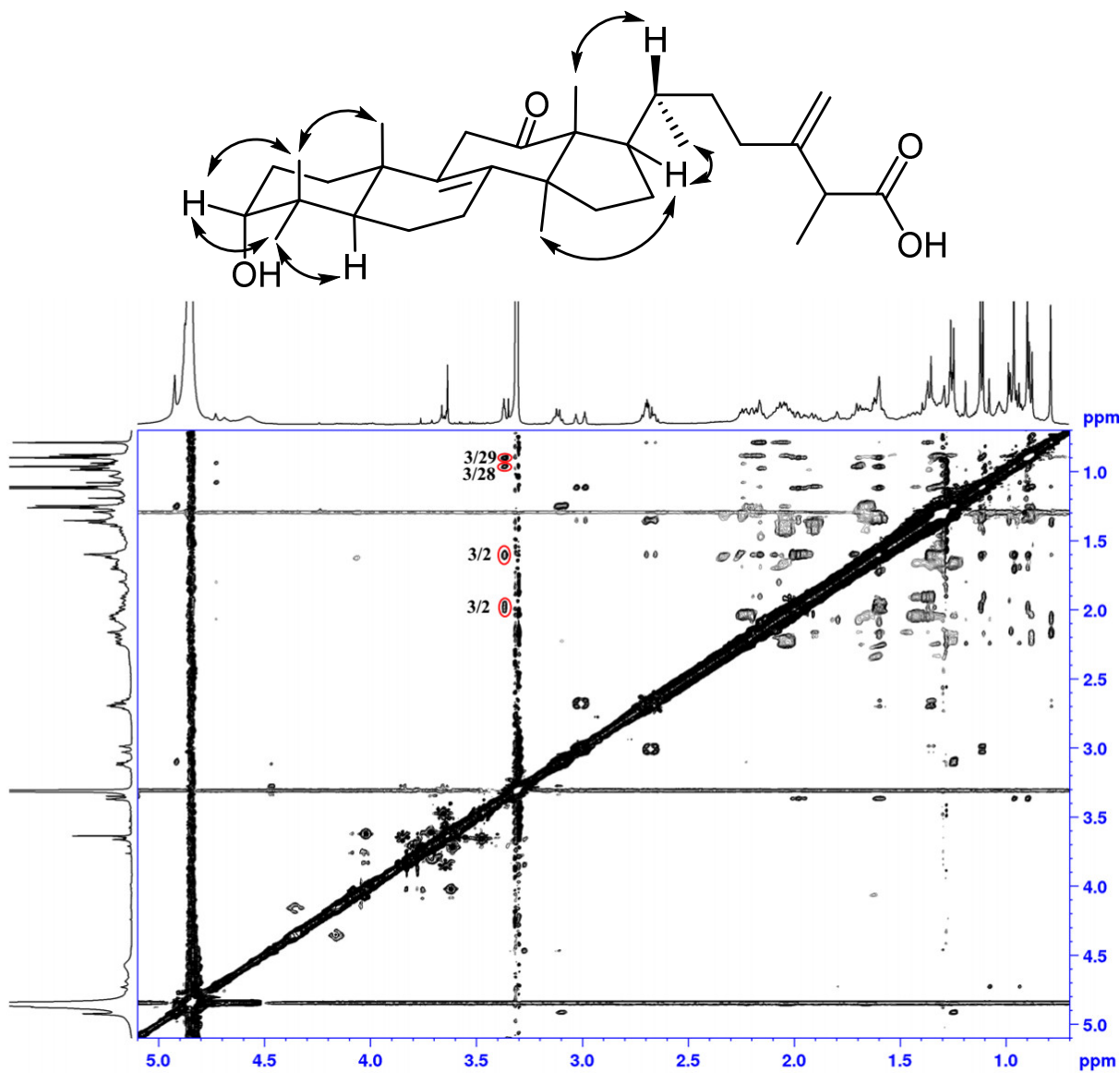
Slika 63. COSY spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 22.



Slika 64. HSQC spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 22.



Slika 65. HMBC korelacije i spektar (metanol-*d*<sub>4</sub>) jedinjenja 22.



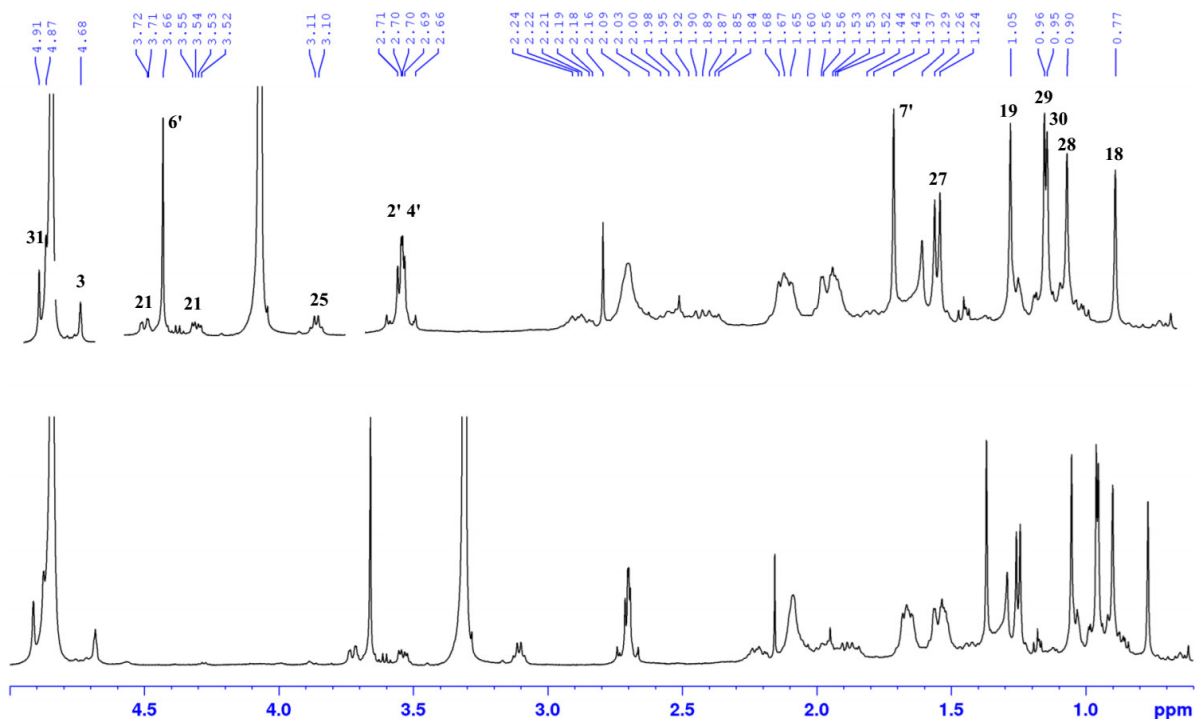
Slika 66. NOESY korelacije i spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 22.

### 2.3.23. Određivanje strukture 21-hidroksi-3 $\alpha$ -(5'-*O*-metil-3'-hidroksi-3'-metilglutariloksi)-24-metilen-26-lanost-8-enske kiseline – poliporenske kiseline I (23)

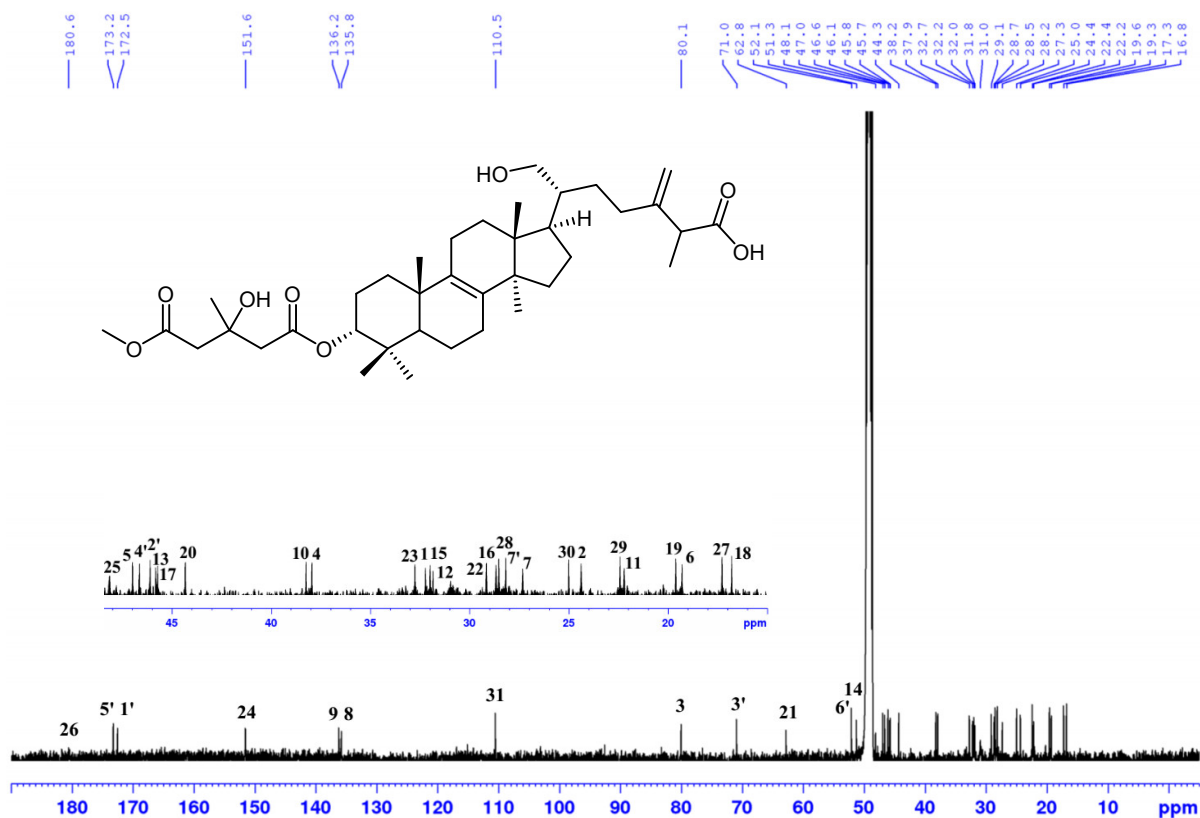
Jedinjenje 23 izolovano je kao bela kristalna supstanca. U HR-ESI-MS spektru, na osnovu protonovanog molekulskog jona  $[M+H]^+$  na  $m/z$  645,4374 vrednosti dobijena je molekulska formula  $C_{38}H_{60}O_8$ . NMR podaci jedinjenja 23 (Tabela 18, Slike 67-72) su vrlo slični NMR podacima poznatog jedinjenja 1 (palustrinska kiselina F). Na osnovu svih podataka zaključeno je da se radi o derivatu 24-metilen-26-lanost-8-enske kiseline. Dublet sekundarnog metila ( $H_3$ -21), koji se javlja u  $^1H$  NMR spektru jedinjenja 1, u spektru jedinjenja 23 zamenjen je signalima diasterotopne oksimetilenske grupe ( $H_2$ -21) na  $\delta_H$  3,54 (dd,  $J_1=11,0$ ;  $J_2= 5,0$  Hz) i 3,73 (dd,  $J_1=11,0$ ;  $J_2= 2,3$  Hz) (Slika 67). Pored toga, u  $^1H$  NMR spektru jedinjenja 23 uočavaju se i signali oksimetinske grupe na  $\delta_H$  4,68 (prošireni singlet) i signal metoksi grupe na  $\delta_H$  3,67. U  $^{13}C$  NMR spektru (Slika 68) javljaju se dva signala estarskih ( $\delta_C$  172,5 i 173,2) i kiselinskih karbonilnih ugljenika ( $\delta_C$  180,6). HMBC korelacije  $H_3$ -6'/ $C$ -5' ( $\delta_C$  173,2) ukazuju na 5-*O*-metil-3-hidroksi-3-metilglutariloksi jedinicu. Da se ovaj suspsituent nalazi u položaju C-3, utvrđeno je na osnovu HMBC korelacije H-3 sa karbonilnim ugljenikom iz estarskog bočnog niza ( $\delta_C$  172,5, C-1') (Slika 71). Na osnovu korelacija  $H_2$ -21/ $H$ -20 iz COSY spektra (Slika 69), kao i  $H_2$ -21/ $C$ -17, C-20, C-22 korelacija iz HMBC spektra dokazan je položaj oksigenovane metilenske grupe (C-21). Značajne korelacije iz NOESY spektra: H-20/ $H_3$ -18,



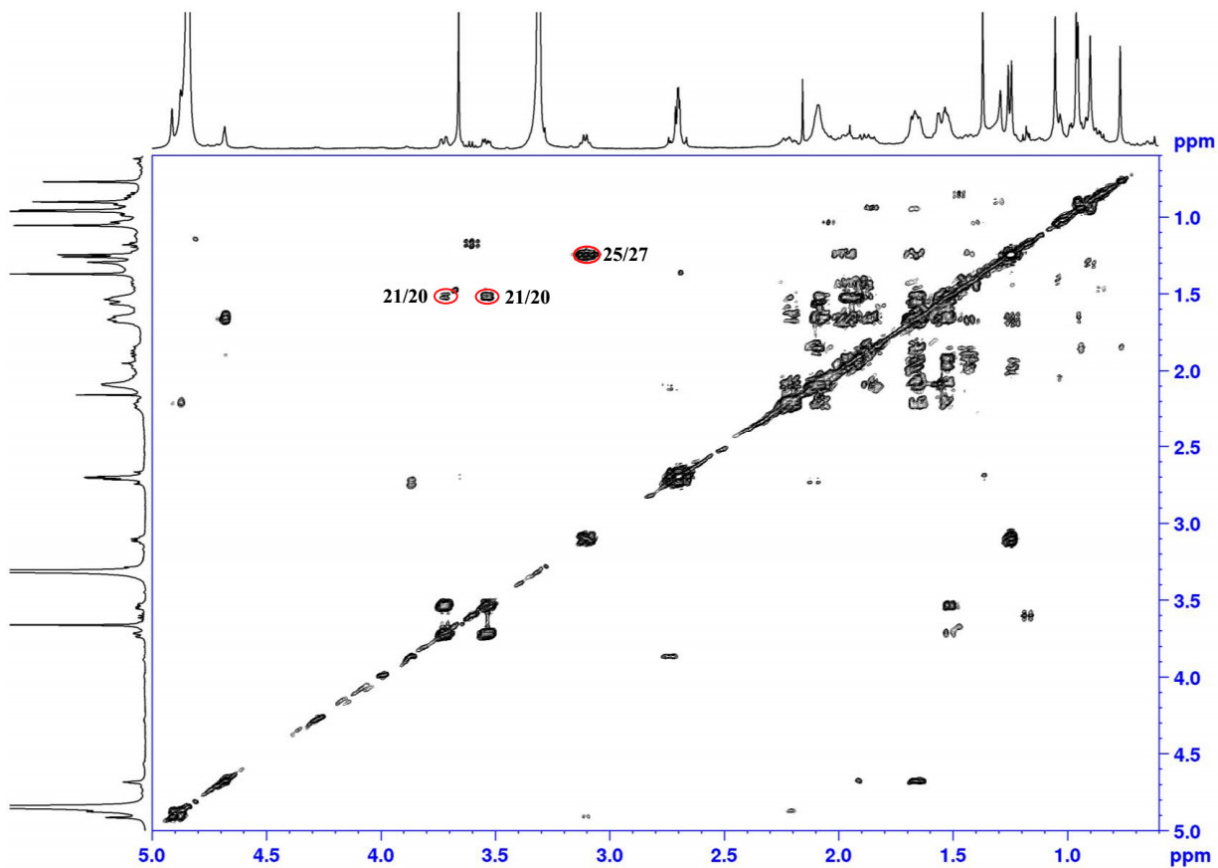
mного jače od H<sub>2</sub>-21/H<sub>3</sub>-18 korelacija, zajedno sa H<sub>2</sub>-21/H<sub>2</sub>-12, H-17/H<sub>2</sub>-21 i H<sub>3</sub>-30 korelacijama (Slika 72) potvrdile su  $\alpha$ -orijentaciju H-17 i  $\beta$ -orijentaciju H-20. Oblik H-3 signala je tipičan za 3 $\beta$ -H relativnu konfiguraciju, što je dodatno potvrđeno H-3/H<sub>2</sub>-2, H<sub>3</sub>-28, H<sub>3</sub>-29 NOESY korelacijama. Na osnovu svega navedenog zaključeno je da jedinjenje **23** predstavlja 21-hidroksi-3 $\alpha$ -(5'-O-metil-3'-hidroksi-3'-metilglutariloksi)-24-metilen-26-lanost-8-ensku kiselinu, jedinjenje po prvi put opisano u literaturi, nazvano poliporenska kiselina I.



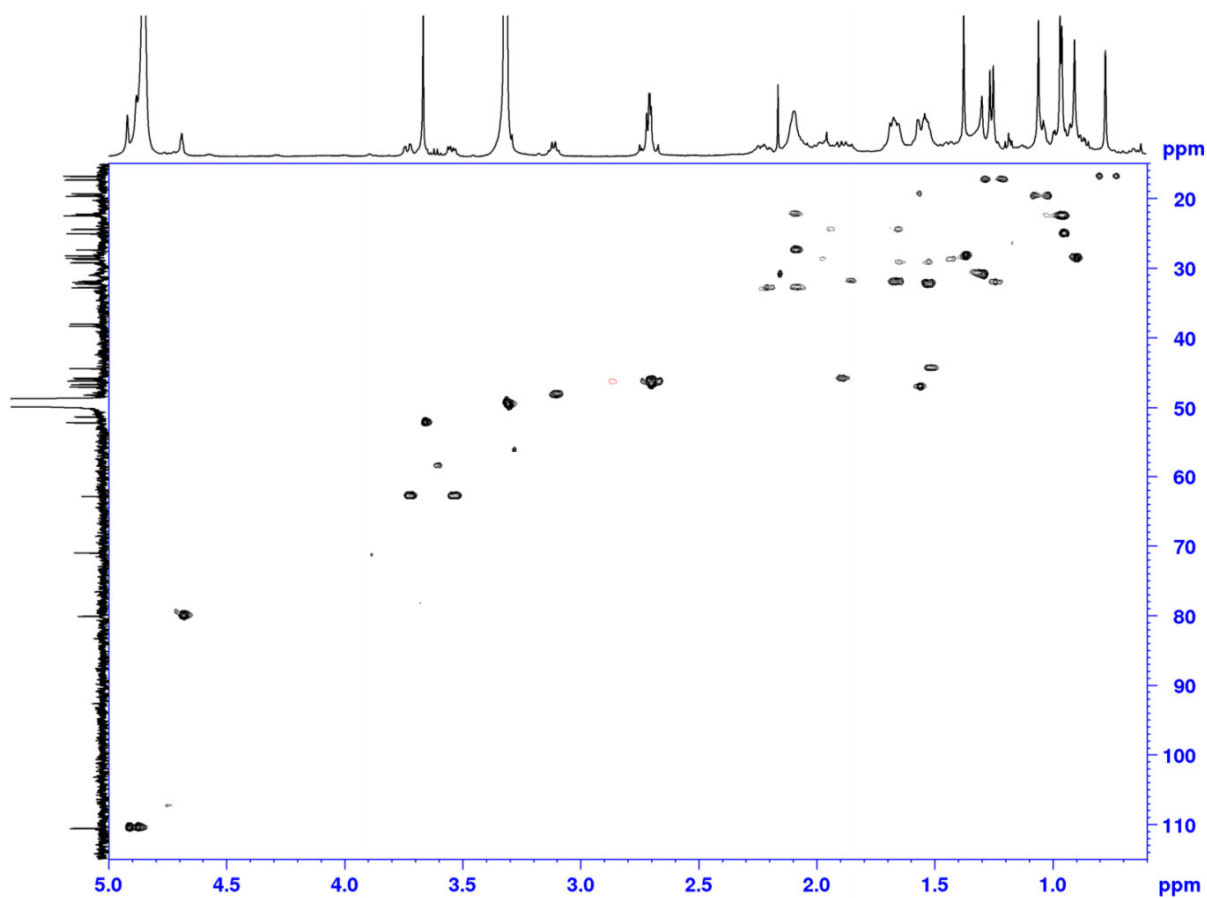
Slika 67. <sup>1</sup>H NMR spektar (500 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>) jedinjenja **23**.



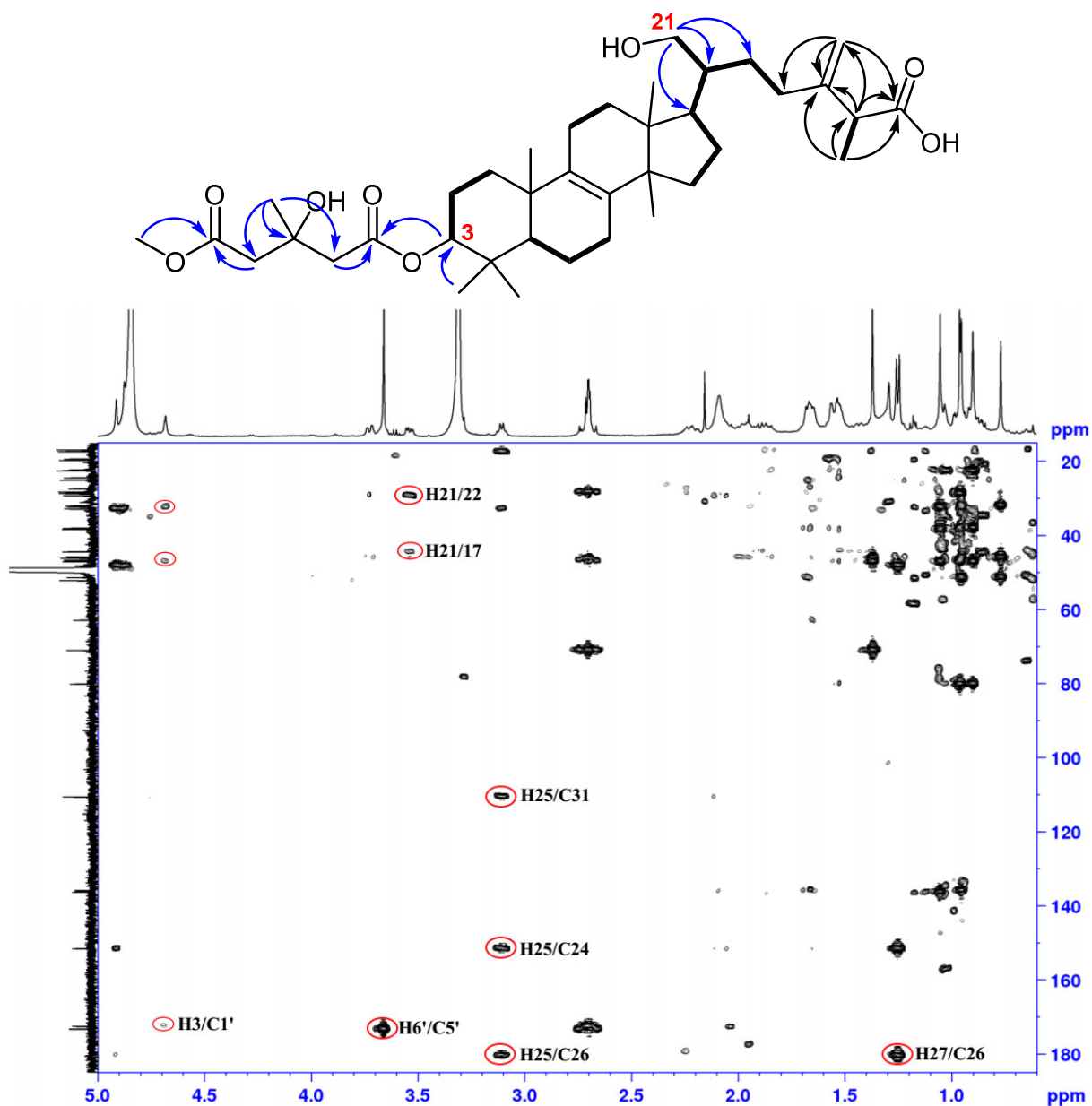
Slika 68. <sup>13</sup>C NMR spektar (125 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>) i struktura jedinjenja **23**.



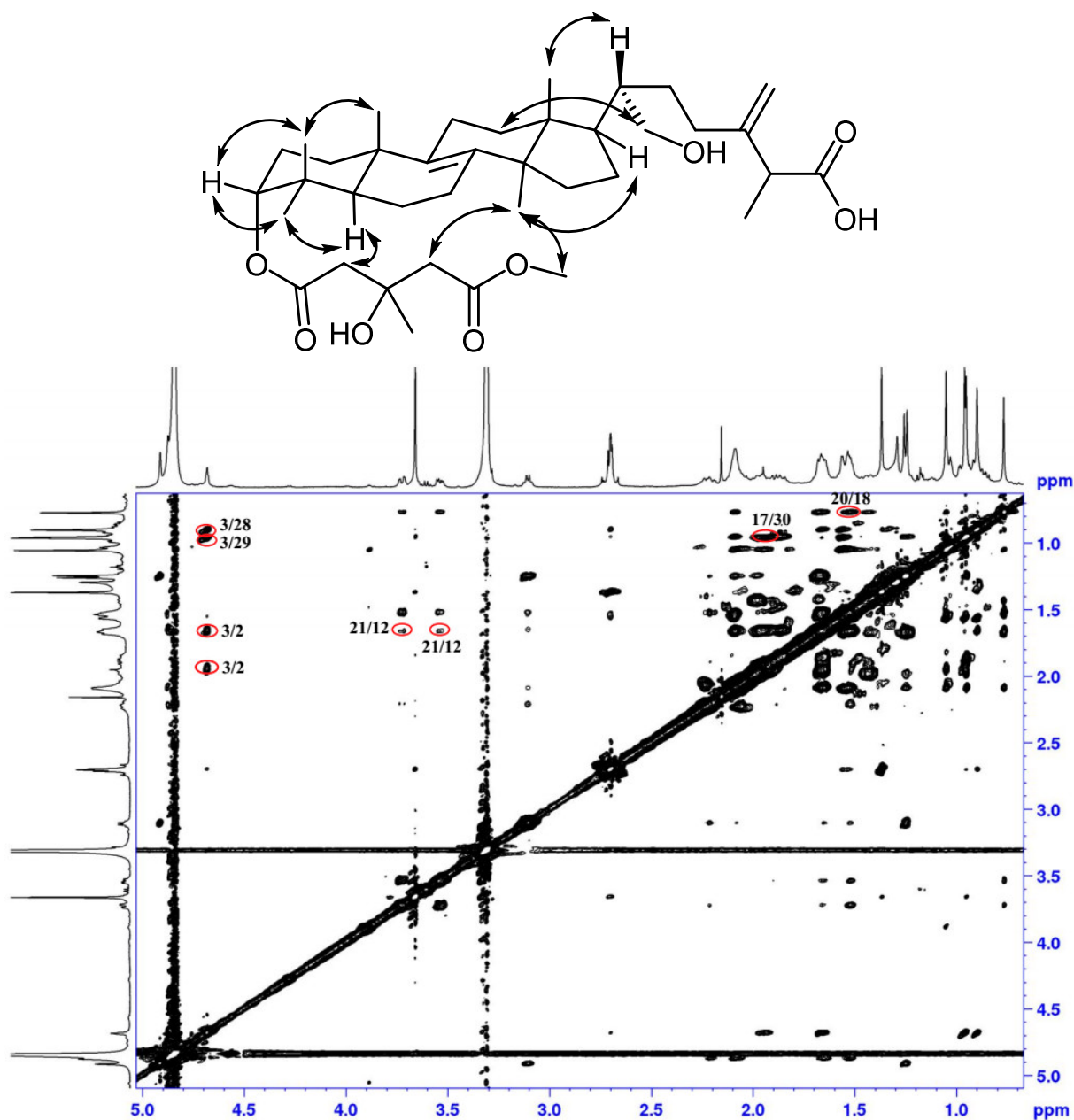
Slika 69. COSY spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 23.



Slika 70. HSQC spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 23.



Slika 71. HMBC korelacije i spektar (metanol-*d*<sub>4</sub>) jedinjenja 23.

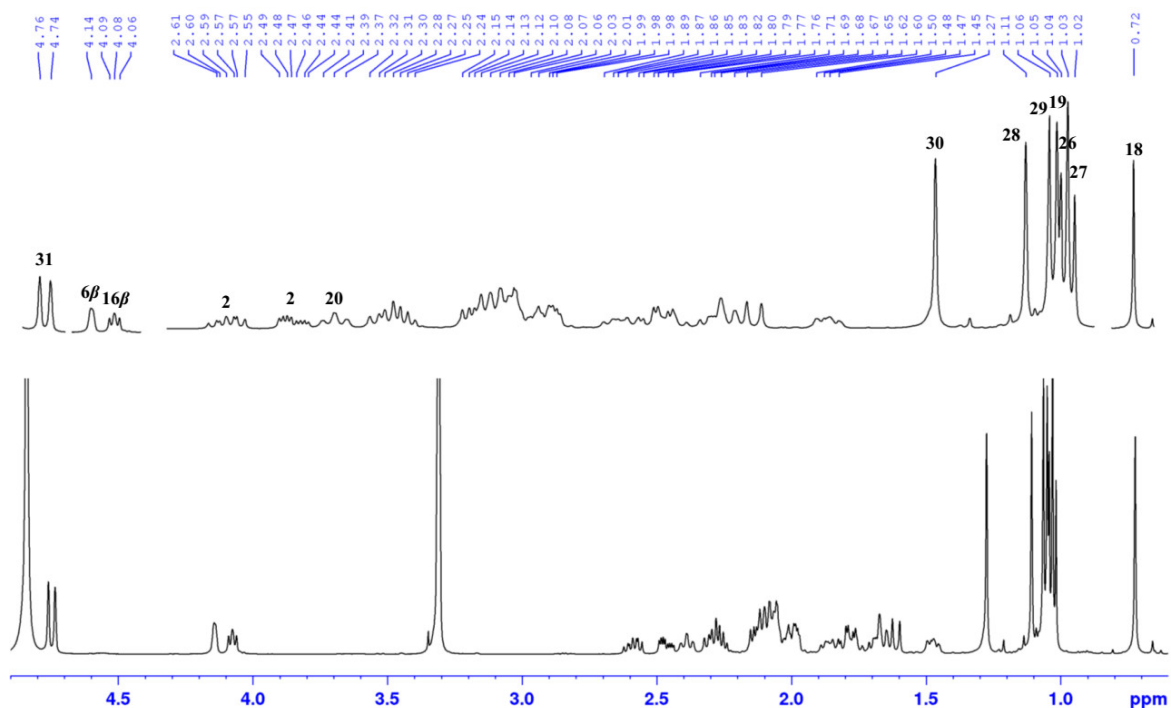


Slika 72. NOESY korelacije i spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 23.

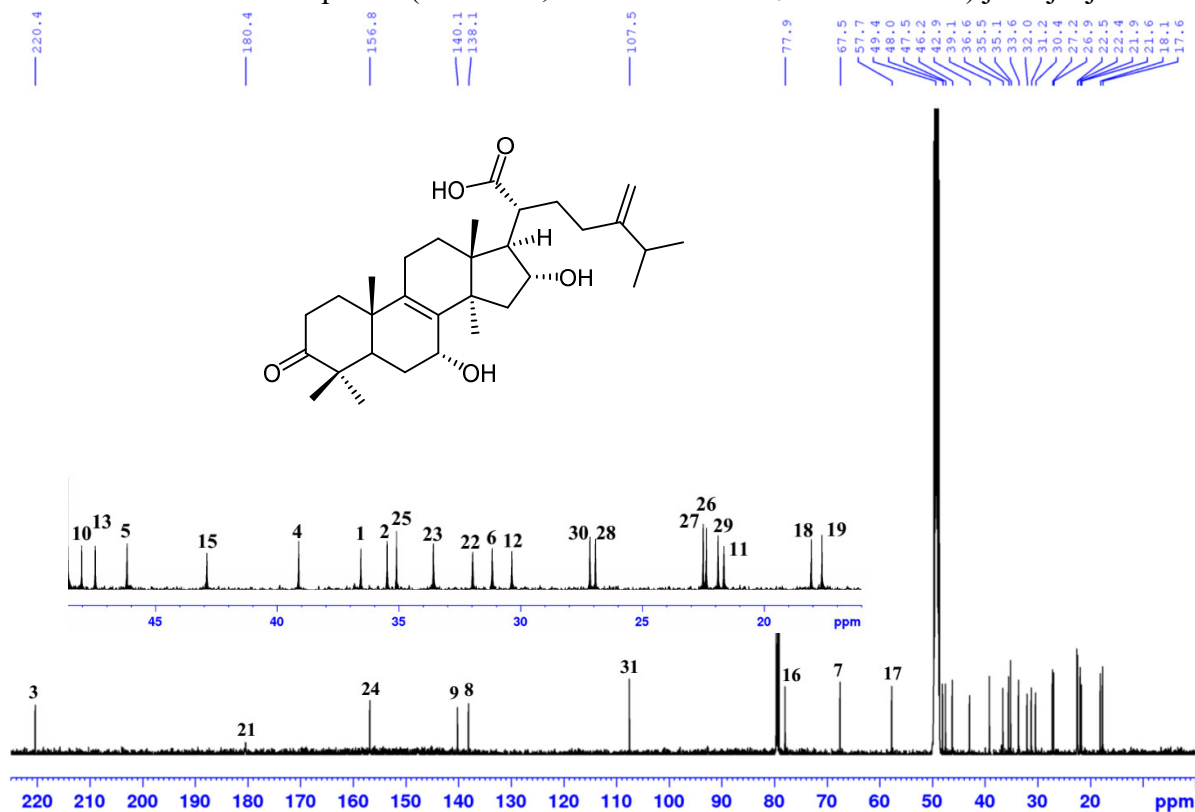
### 2.3.24. Određivanje strukture 7 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -dihidroksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-8-enske kiseline – poliporenske kiseline J (24)

Jedinjenje 24 izolovano je kao bela amorfna supstanca. Deprotonovani molekulski jon  $[M-H]^-$  na  $m/z$  499,3441 vrednosti iz HR-ESI-MS spektra, odgovara molekularnoj formuli  $C_{31}H_{48}O_5$ . NMR spektri jedinjenja 24 ( $^1H$ ,  $^{13}C$ , 2D NMR, Slike 73-78) su tipični za lanostanski skelet, sa velikom sličnošću sa spektrima derivata 24-metilen-21-lanost-8-enske kiseline (jedinjenja 10-14). U  $^1H$  NMR spektru (Slika 73) uočava se pet singleta ( $\delta_H$  0,72; 1,04; 1,05; 1,11 i 1,27) i dva dubleta ( $\delta_H$  1,02 i 1,03 (oba d,  $J=6,4$  Hz)), koji potiču od metil grupa. Na osnovu hemijskih pomeranja i HSQC korelacija identifikovane su dve oksigenovane metinske grupe, H-16 na  $\delta_H$  4,08 (dd,  $J_1=8,7$ ;  $J_2=6,3$  Hz) i H-7  $\delta_H$  4,14 (prošireni singlet), a COSY korelacije H-7/H<sub>2</sub>-6 i H-16/H<sub>2</sub>-15, H-17 (Slika 75) i HMBC korelacije H-7/C-5, C-8, C-9 i H-16/C-17, C-14 (Slika 77) ukazuju na njihov položaj. U  $^{13}C$  NMR spektru identifikovani su signali 21-kiselinskog ( $\delta_C$  180,4) i 3-keto ugljenika ( $\delta_C$  220,4) (Slika 74). Njihov položaj je određen na osnovu korelacija H-17, H-20, H-22/C-21 i H<sub>2</sub>-2, H<sub>2</sub>-1, H<sub>3</sub>-28 i H<sub>3</sub>-29/C-3 iz HMBC spektra (Slika 77). Relativne konfiguracije 7 $\alpha$ -OH, 16 $\alpha$ -OH, 17 $\alpha$ -H i 21 $\alpha$ -COOH

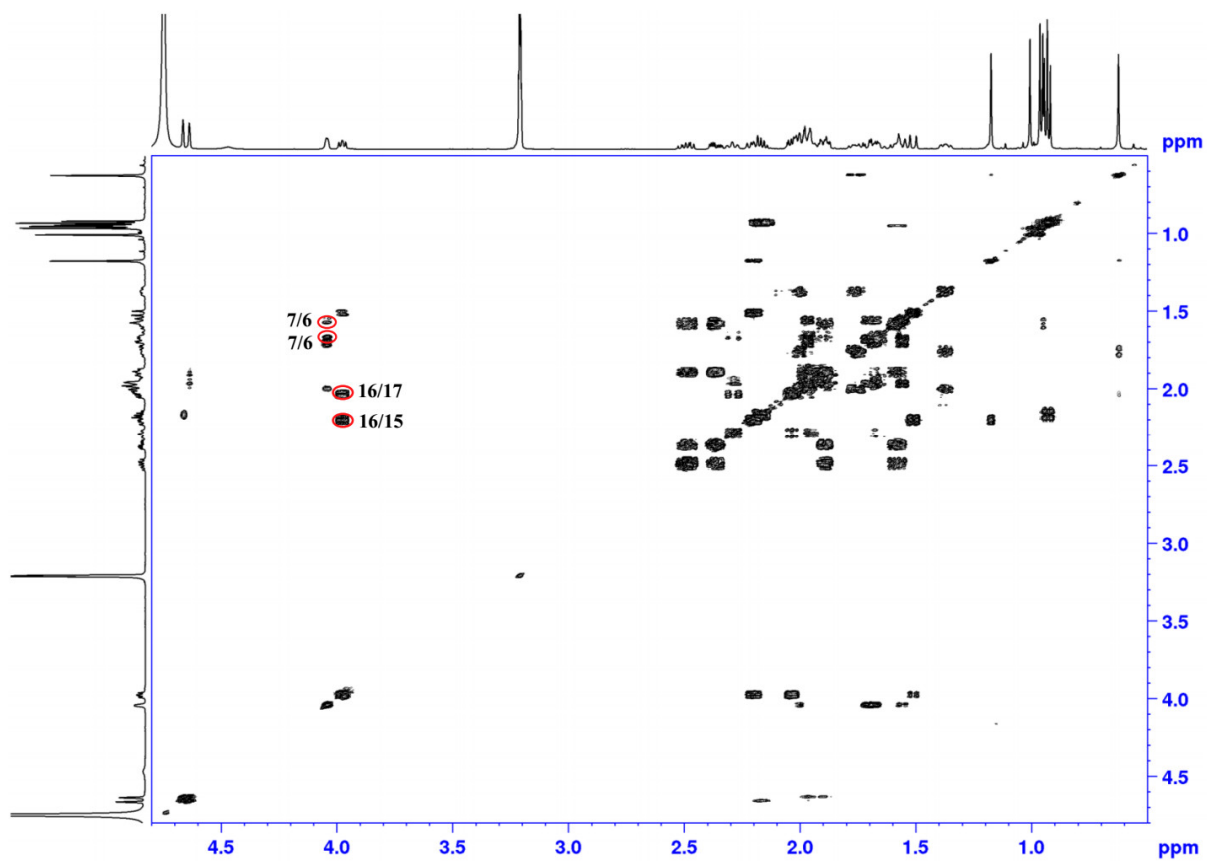
baziraju su na NOESY korelacijama: H-7/H<sub>3</sub>-18, H-15 $\alpha$ , H-16/H<sub>3</sub>-18, H-15 $\alpha$ , H<sub>2</sub>-22, H-17/H<sub>3</sub>-30 i H-20/H-16, H<sub>3</sub>-18, redom (**Slika 78**). Poređenja radi, hemijsko pomeranje ugljenika C-20 ( $\delta_C$  49,4) se slaže sa hemijskim pomeranjem istog atoma ugljenika u drugim prirodnim lanostanima sa  $\alpha$ -orijentisanom karboksilnom grupom u istom položaju ( $\delta_C > 48,3$ ).<sup>44</sup> Na osnovi svega navedenog, zaključuje se da je jedinjenje **24** 7 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -dihidroksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-8-enska kiselina, jedinjenje koje do sada nije opisano u literaturi, nazvano poliporenska kiselina J.



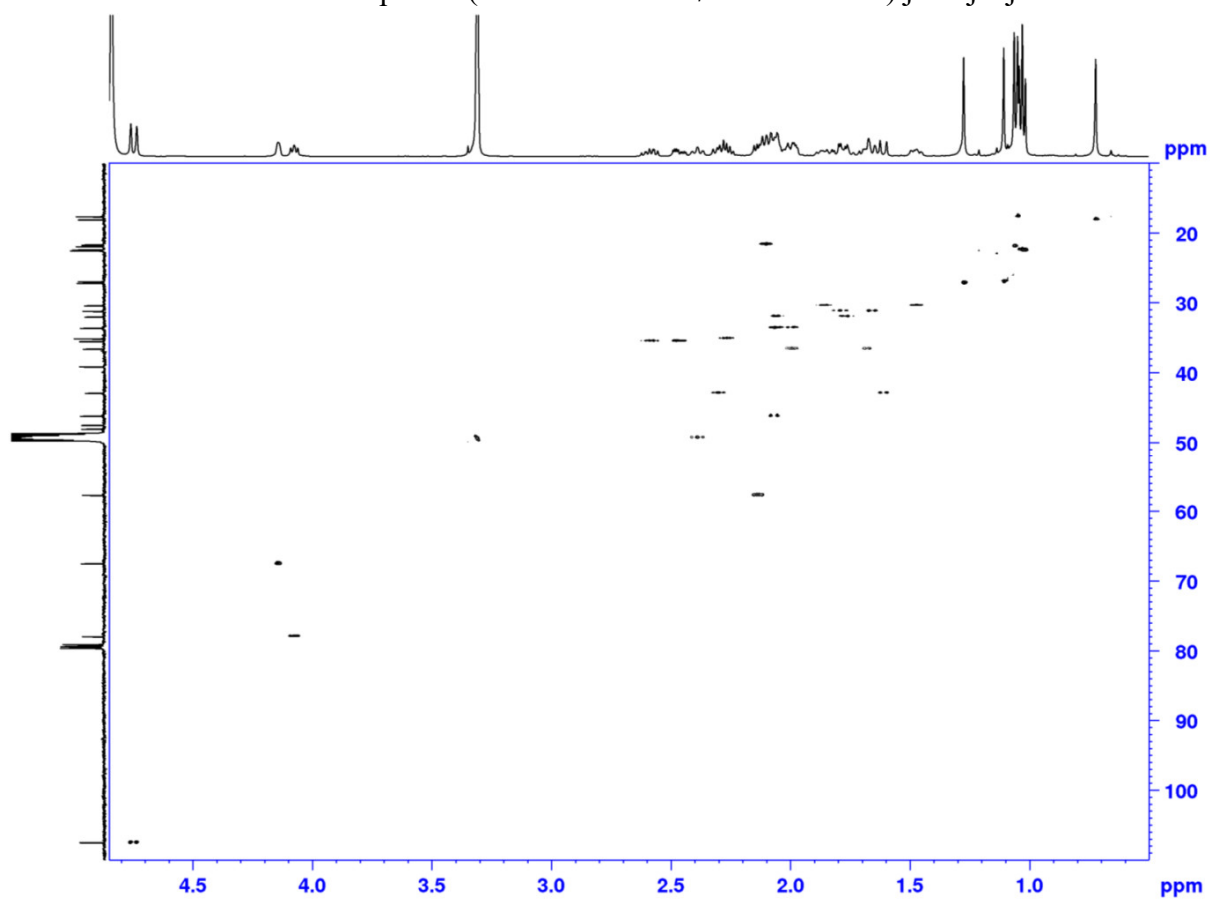
**Slika 73.** <sup>1</sup>H NMR spektar (500 MHz, smeša metanol-*d*<sub>4</sub> i hloroform-*d*) jedinjenja **24**.



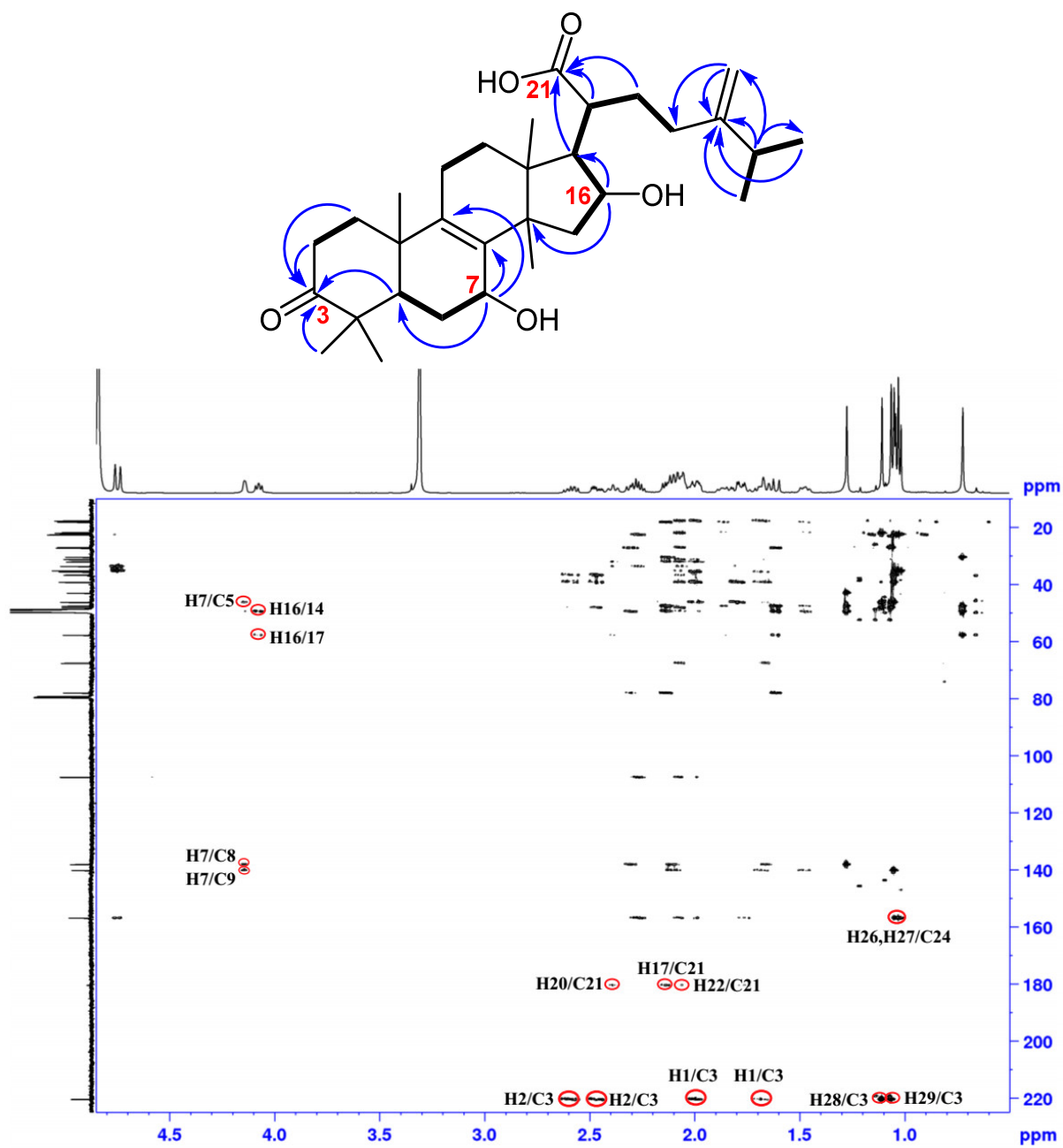
**Slika 74.** <sup>13</sup>C NMR spektar (125 MHz, smeša metanol-*d*<sub>4</sub> i hloroform-*d*) jedinjenja **24**.



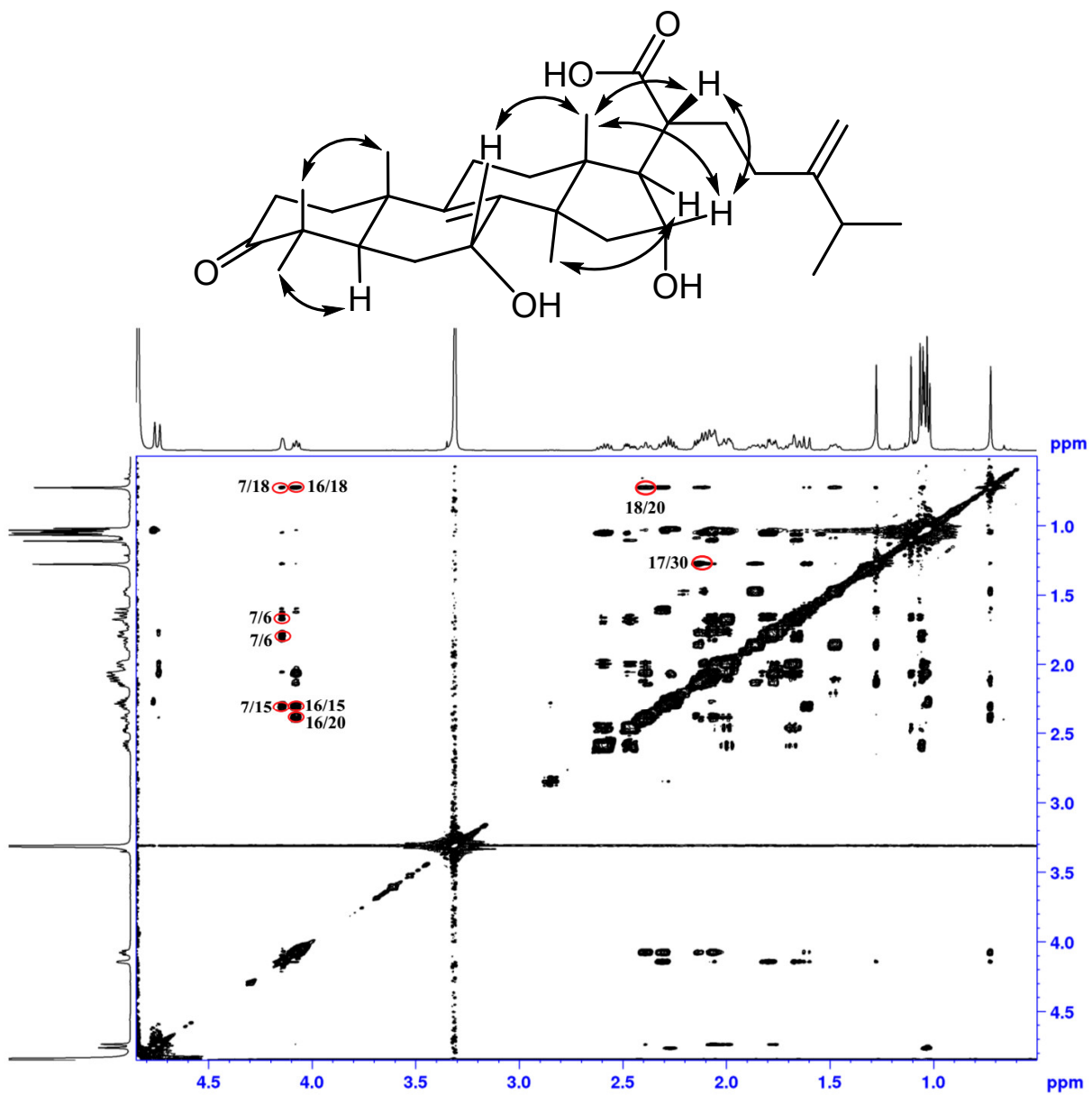
Slika 75. COSY spektar (smeša metanol- $d_4$  i hloroform- $d$ ) jedinjenja 24.



Slika 76. HSQC spektar (smeša metanol- $d_4$  i hloroform- $d$ ) jedinjenja 24.



Slika 77. HMBC korelacije i spektar (smeša metanol- $d_4$  i hloroform- $d$ ) jedinjenja 24.



Slika 78. NOESY korelacije i spektar (smeša metanol-*d*<sub>4</sub> i hloroform-*d*) jedinjenja 24.



**Tabela 18.**  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) i  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) podaci za jedinjenja **22**, **23** i **24**.

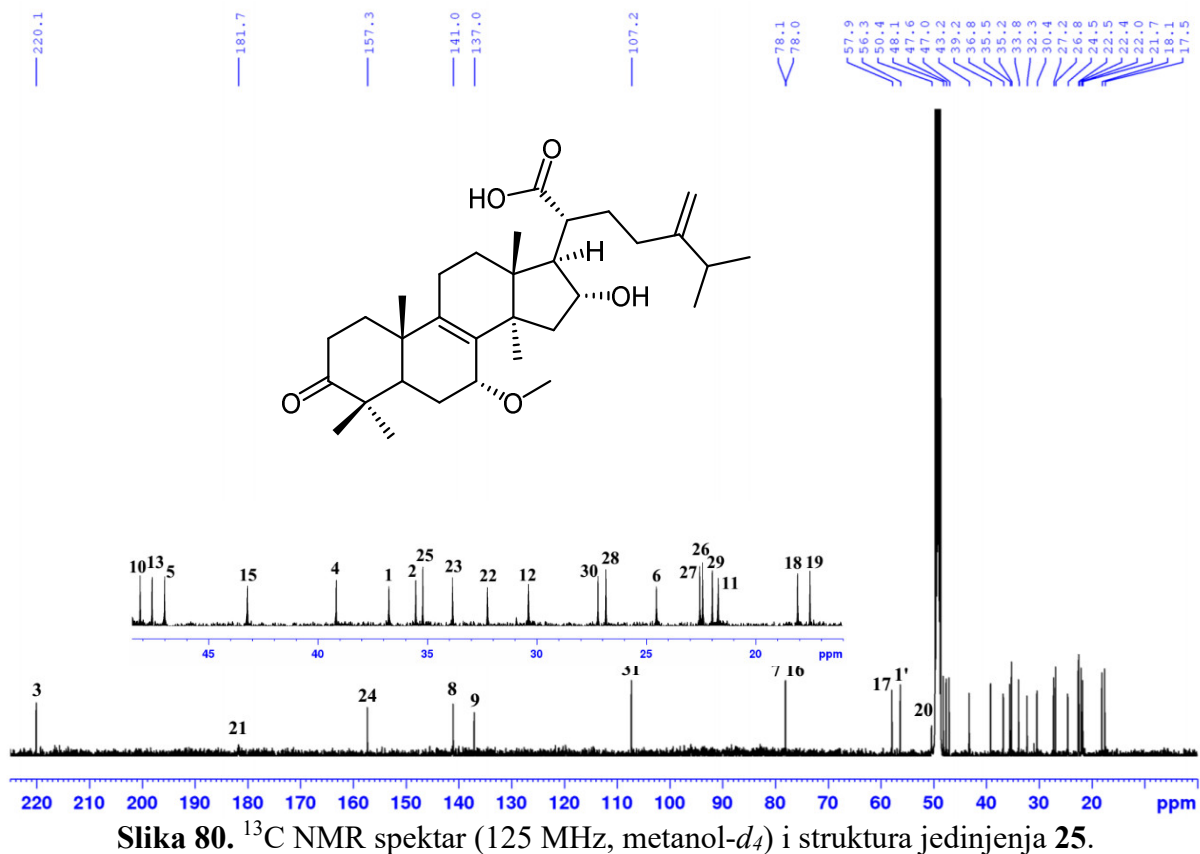
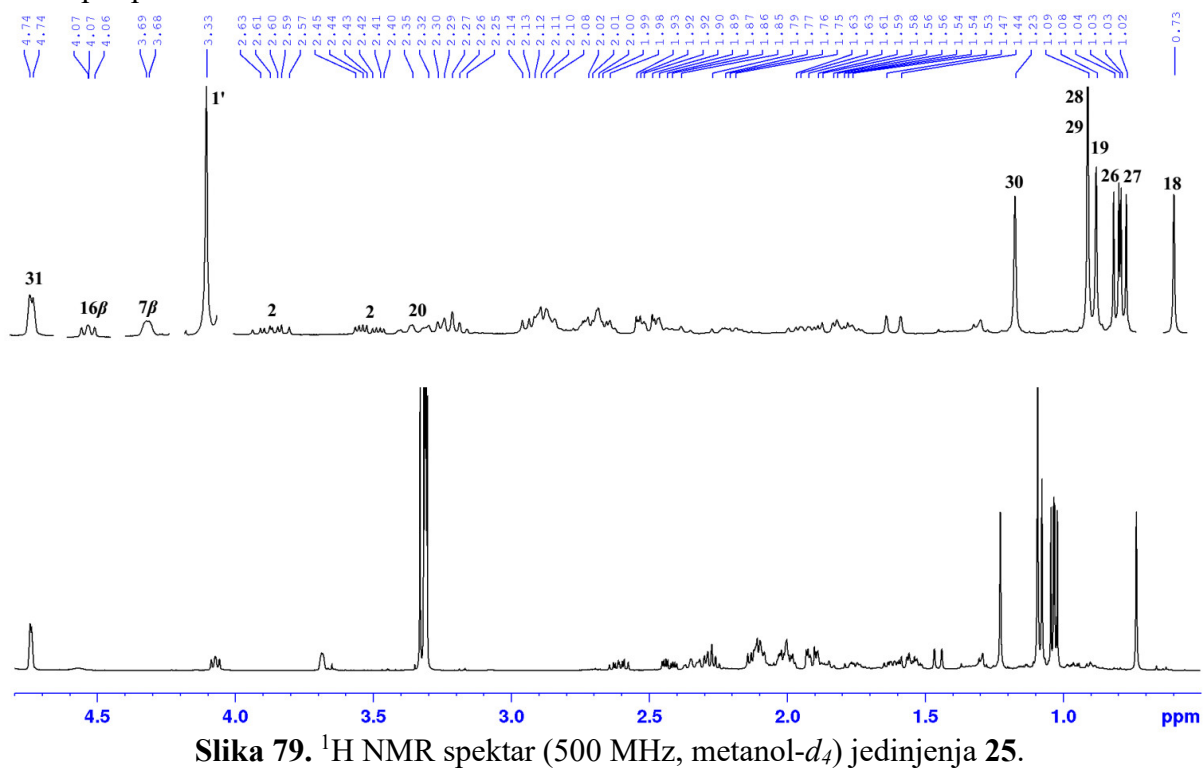
| C/H | <b>22<sup>a</sup></b> |                              | <b>23<sup>a</sup></b> |  | <b>24<sup>b</sup></b> |  |
|-----|-----------------------|------------------------------|-----------------------|--|-----------------------|--|
|     | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz) | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz)               | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz)                           |
| 1   | 31,4                  | 1,58-1,63 (2H) m             | 32,2                  | 1,52-1,56 (2H) m                           | 36,6                  | 1,67 m; 1,99 m   |
| 2   | 26,8                  | 1,61 m; 1,98 m               | 24,4                  | 1,67 m; 1,96 m                             | 35,5                  | 2,46 ddd (16,1; 7,6; 3,7)<br>2,60 ddd (16,1; 9,0; 7,5) |
| 3   | 76,6                  | 3,37 brs                     | 80,1                  | 4,68 brs                                   | 220,4                 | -  |
| 4   | 38,7                  | -                            | 37,9                  | -  | 39,1                  | -  |
| 5   | 45,5                  | 1,60 m                       | 47,0                  | 1,60, m                                    | 46,2                  | 2,07 m   |
| 6   | 19,2                  | 1,61 m; 1,71 m               | 19,3                  | 1,56 m; 1,65 m                             | 31,2                  | 1,65 m; 1,80 m   |
| 7   | 27,2                  | 2,09 m; 2,18 m               | 27,3                  | 2,08-2,12 (2H) m                           | 67,5                  | 4,14 brs   |
| 8   | 136,4                 | -                            | 135,8                 | -  | 138,1                 | -  |
| 9   | 137,0                 | -                            | 136,2                 | -  | 140,1                 | -  |
| 10  | 38,2                  | -                            | 38,2                  | -  | 48,0                  | -  |
| 11  | 41,1                  | 2,67 m; 3,02 m               | 22,2                  | 2,08-2,12 (2H) m                           | 21,6                  | 2,07-2,11 (2H) m                                       |
| 12  | 215,6                 | -                            | 31,8                  | 1,66 m; 1,86 m                             | 30,4                  | 1,47 m; 1,85 m   |
| 13  | 56,0                  | -                            | 45,8                  | -  | 47,5                  | -  |
| 14  | 61,0                  | -                            | 51,3                  | -  | 49,6*                 | -  |
| 15  | 31,2                  | 1,37 m; 1,90 m               | 32,0                  | 1,25 m; 1,66 m                             | 42,9                  | 1,61 m; 2,30 m   |
| 16  | 28,9                  | 1,44 m; 2,05 m               | 28,7                  | 1,43 m; 1,98 m                             | 77,9                  | 4,08 dd (8,7; 6,3)                                     |
| 17  | 43,8                  | 2,18 m                       | 45,7                  | 1,90 m                                     | 57,7                  | 2,13 m   |
| 18  | 13,2                  | 1,11 s                       | 16,8                  | 0,78 s                                     | 18,1                  | 0,72 s   |
| 19  | 19,5                  | 1,12 s                       | 19,6                  | 1,06 s                                     | 17,6                  | 1,04 s   |
| 20  | 37,9                  | 1,33 m                       | 44,3                  | 1,52 m                                     | 49,4*                 | 2,41 m   |
| 21  | 19,8                  | 0,88 d (6,4)                 | 62,8                  | 3,54 dd (11,0; 5,0)<br>3,73 dd (11,0; 2,3) | 180,4                 | -  |
| 22  | 35,5                  | 1,26 m; 1,66 m               | 29,2                  | 1,53 m; 1,66 m                             | 32,0                  | 1,77 m; 2,05 m   |
| 23  | 33,2                  | 2,04 m; 2,23 m               | 32,8                  | 2,09 m; 2,22 m                             | 33,6                  | 1,99 m; 2,06 m   |
| 24  | 150,8                 | -                            | 151,6                 | -  | 156,8                 | -  |
| 25  | 47,1                  | 3,12 m                       | 48,1                  | 3,11 q (7,1)                               | 35,1                  | 2,27 sep (6,4)   |
| 26  | 179,0                 | -                            | 180,6                 | -  | 22,4                  | 1,03 d (6,4)   |
| 27  | 17,0                  | 1,27 d (7,1)                 | 17,3                  | 1,27 d (7,1)                               | 22,5                  | 1,02 d (6,4)   |
| 28  | 28,9                  | 0,98 s                       | 28,5                  | 0,90 s                                     | 26,9                  | 1,11 s   |
| 29  | 22,8                  | 0,90 s                       | 22,4                  | 0,97 s                                     | 21,9                  | 1,05 s   |
| 30  | 24,5                  | 0,79 s                       | 25,0                  | 0,96 s                                     | 27,2                  | 1,27 s   |
| 31  | 111,2                 | 4,88 brs; 4,92 brs           | 110,5                 | 4,88 brs; 4,92 brs                         | 107,5                 | 4,74 brs; 4,76 brs                                     |
| 3-  |                       |                              |                       |  |                       |  |
| 1'  |                       |                              | 172,5                 | -  |                       |  |
| 2'  |                       |                              | 46,1                  | 2,67-2,72 (2H) m                           |                       |  |
| 3'  |                       |                              | 71,0                  | -  |                       |  |
| 4'  |                       |                              | 46,6                  | 2,67-2,72 (2H) m                           |                       |  |
| 5'  |                       |                              | 173,2                 | -  |                       |  |
| 6'  |                       |                              | 52,1                  | 3,67 s                                     |                       |  |
| 7'  |                       |                              | 28,2                  | 1,37 s                                     |                       |  |

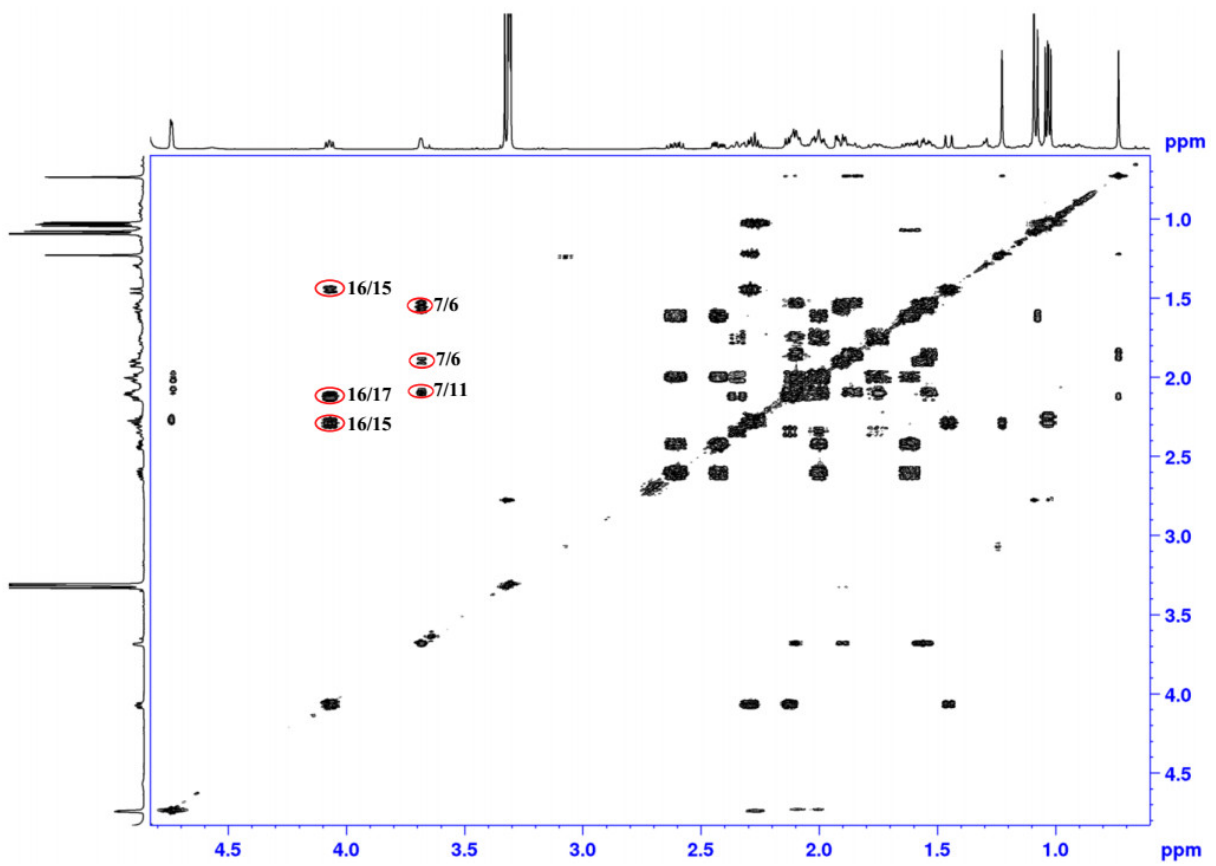
<sup>a</sup>Metanol-*d*<sub>4</sub>, <sup>b</sup>Metanol-*d*<sub>4</sub> i hlороform-*d*, \*očitan iz HSQC spektra

### 2.3.25. Određivanje strukture 16 $\alpha$ -hidroksi-7 $\alpha$ -metoksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-8-enske kiseline – poliporenske kiseline K (25)

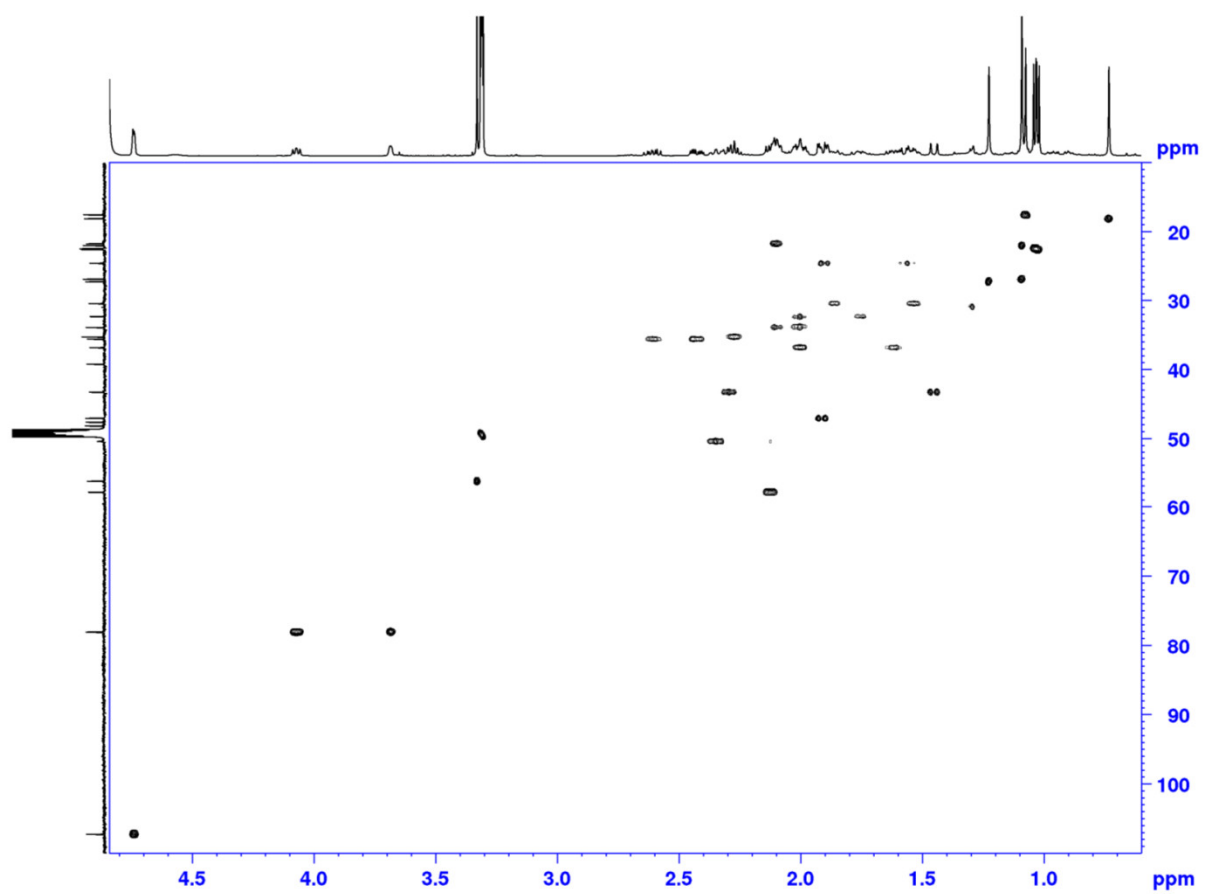
Jedinjenje **25** izolovano je kao bela kristalna supstanca. Na osnovu deprotonovanog molekulskog jona  $[\text{M-H}]^-$  na  $m/z$  513,3597 vrednosti iz HR-ESI-MS spektra određena je molekulska formula  $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_5$ . Poređenjem NMR podataka (**Tabela 19**, **Slike 79-84**) utvrđen je isti tip lanostanskog skeleta, broj i raspored kiseoničnih funkcionalnih grupa kao kod jedinjenja **24**, prisustvo keto grupe ( $\delta_{\text{C}}$  220,9) i dve oksimetinske grupe ( $\delta_{\text{H}}$  3,68 i 4,07). Razliku čini pojava signala oksigenovane metil grupe ( $\delta_{\text{H}}$  3,33 s,  $\delta_{\text{C}}$  56,3), koja je asignirana kao metoksi grupa u položaju C-7, na osnovu korelacija 7-OCH<sub>3</sub>/C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  78,0) i H-7 ( $\delta_{\text{H}}$  3,68)/7-OCH<sub>3</sub>, C-5, C-8 i C-9 u HMBC spektru (**Slika 83**). Dodatna potvrda dobijena je i na osnovu COSY korelacija H-7/H<sub>2</sub>-6, H-11 (**Slika 81**). Relativna konfiguracija 7 $\beta$ -H određena je na osnovu korelacija H-7/H<sub>2</sub>-6, H<sub>2</sub>-15 i H<sub>3</sub>-18 i 7-OCH<sub>3</sub>/H<sub>3</sub>-30 iz NOESY spektra (**Slika 84**), dok je relativna konfiguracija atoma C-17 i C-20 određena na isti

način kao kod jedinjenja **24**. Veoma sličan multiplicitet i hemijsko pomeranje preostale oksimetinske grupe ( $\delta_H$  4,07 dd,  $\delta_C$  78,1) ukazuju na isti  $16\alpha$ -OH položaj, što je utvrđeno na osnovu COSY korelacija H-16/H<sub>2</sub>-15, H-17 i NOESY korelacija H-16/H-20, H<sub>3</sub>-18. Položaj keto grupe je definisan na osnovu korelacija H<sub>2</sub>-1, H<sub>2</sub>-2, H<sub>3</sub>-28, H<sub>3</sub>-29/C-3 u HMBC spektru (Slika 83). Slično kao kod jedinjenja **24**, hemijsko pomeranje C-20 ( $\delta_C$  50,4) je u saglasnosti sa  $\alpha$ -orijentacijom COOH grupe.<sup>44</sup> Na osnovu spektralnih podataka, zaključuje se da jedinjenje **25** predstavlja  $16\alpha$ -hidroksi- $7\alpha$ -metoksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-8-ensku kiselinu, jedinjenje koje do sada nije opisano u literaturi, nazvano poliporenska kiselina K.

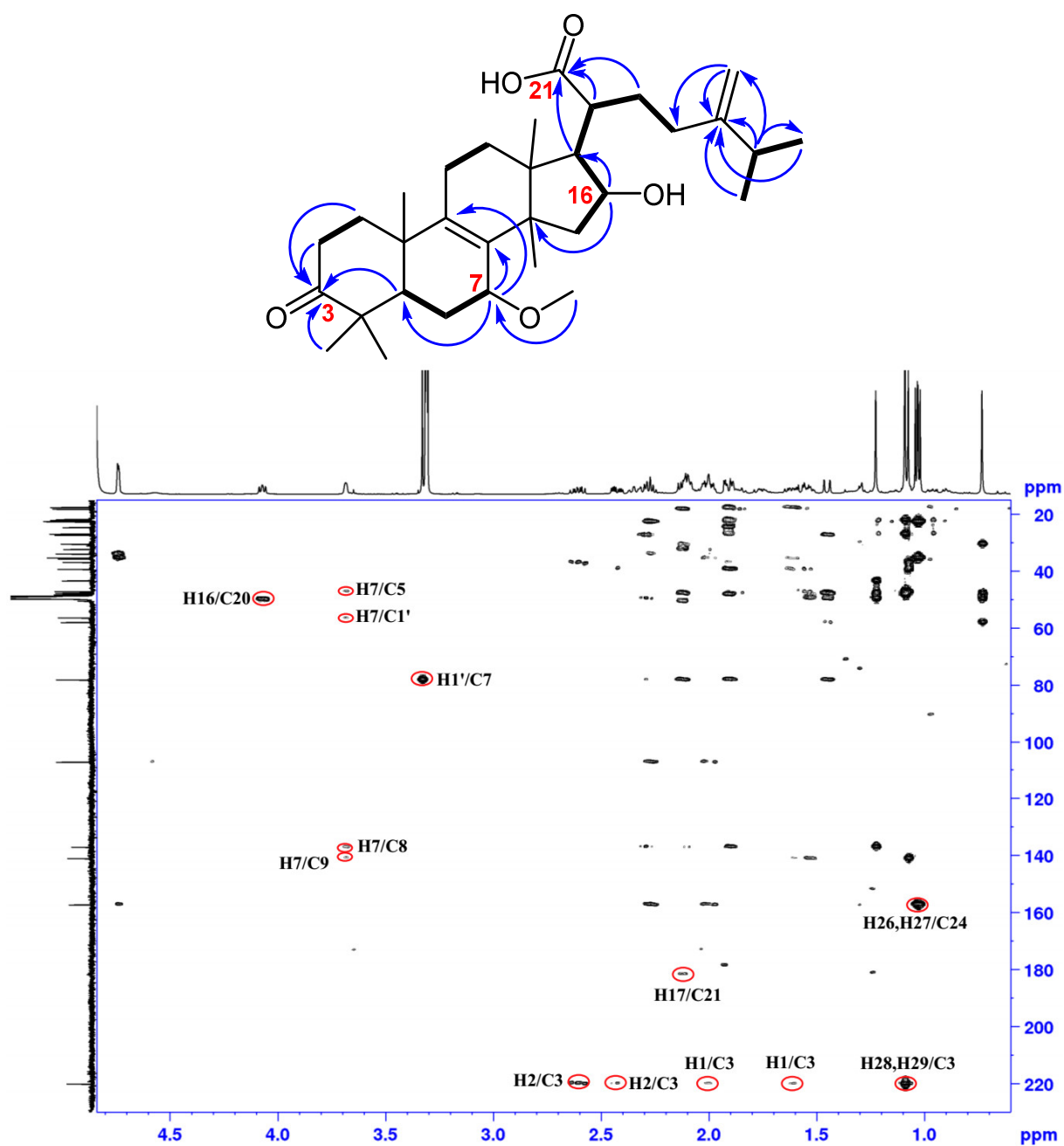




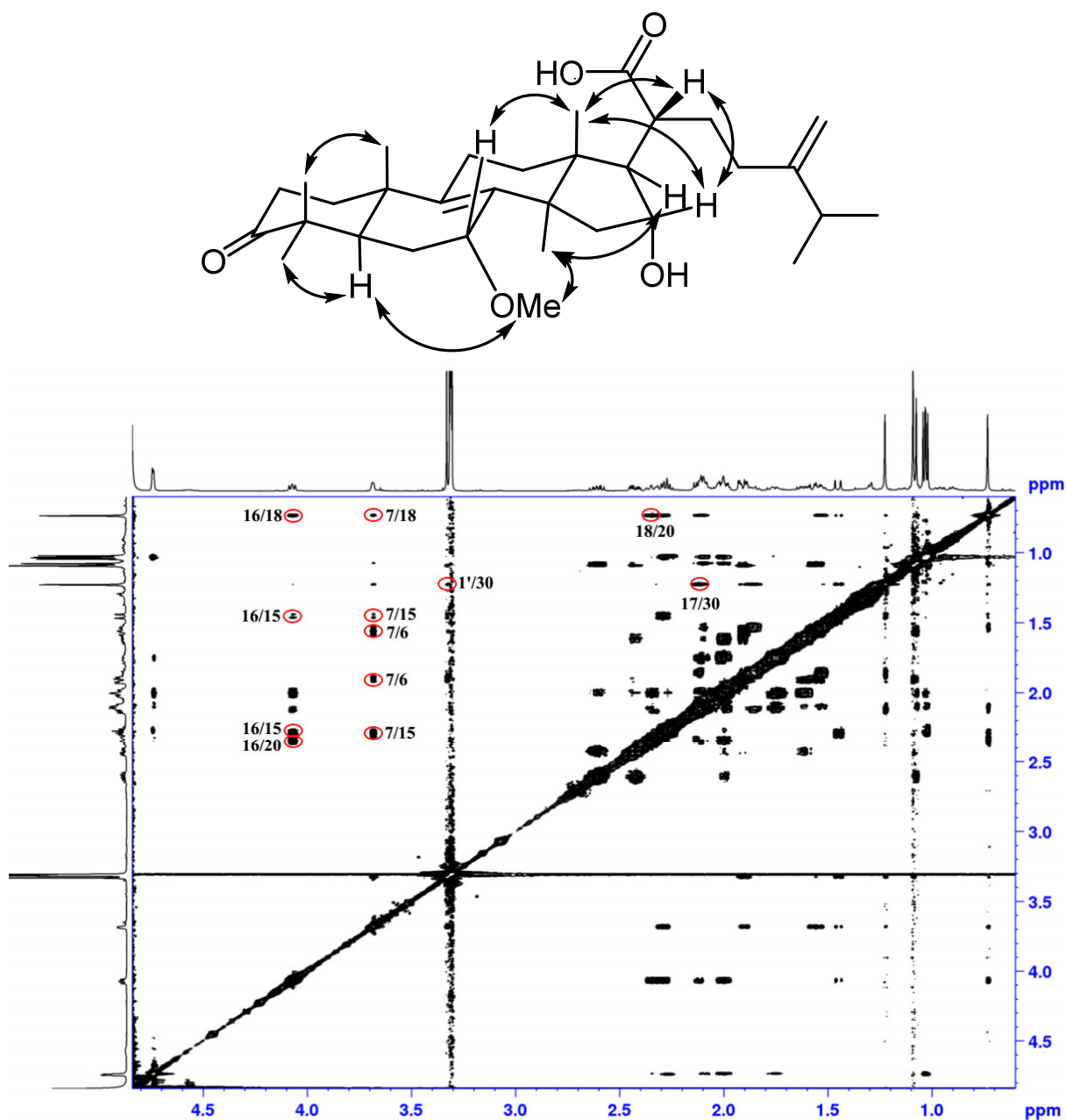
Slika 81. COSY spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 25.



Slika 82. HSQC spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 25.



Slika 83. HMBC korelacije i spektar (metanol-*d*<sub>4</sub>) jedinjenja 25.

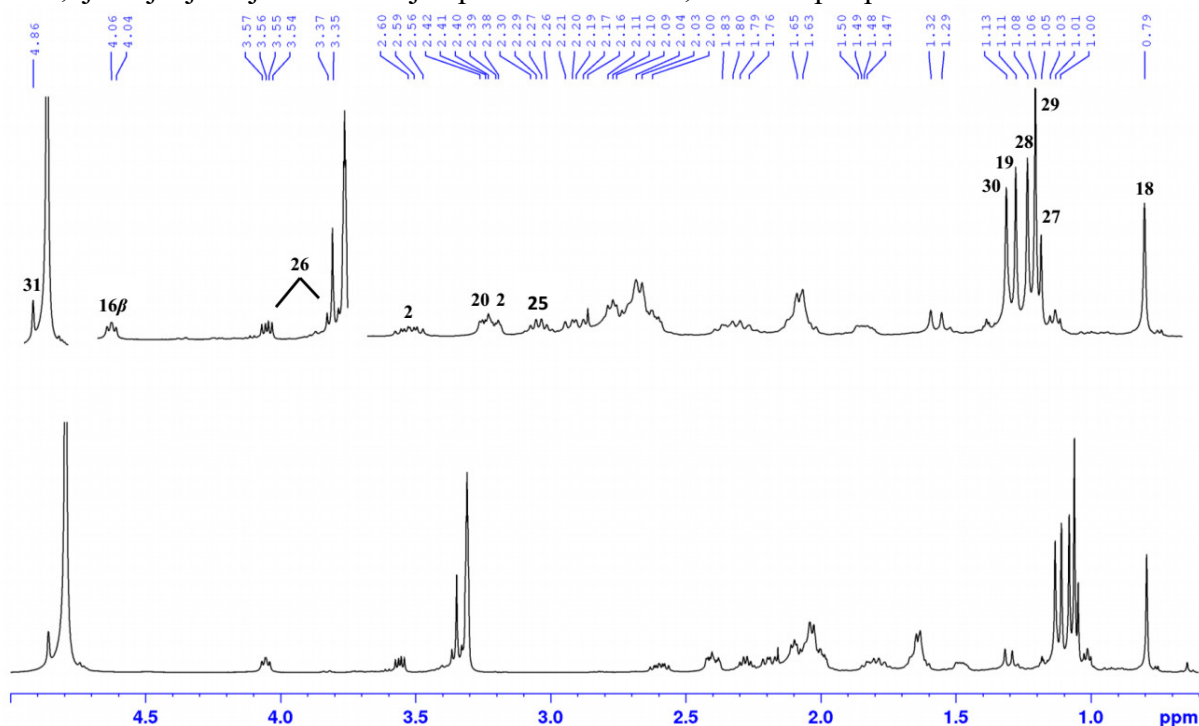


Slika 84. NOESY korelacije i spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 25.

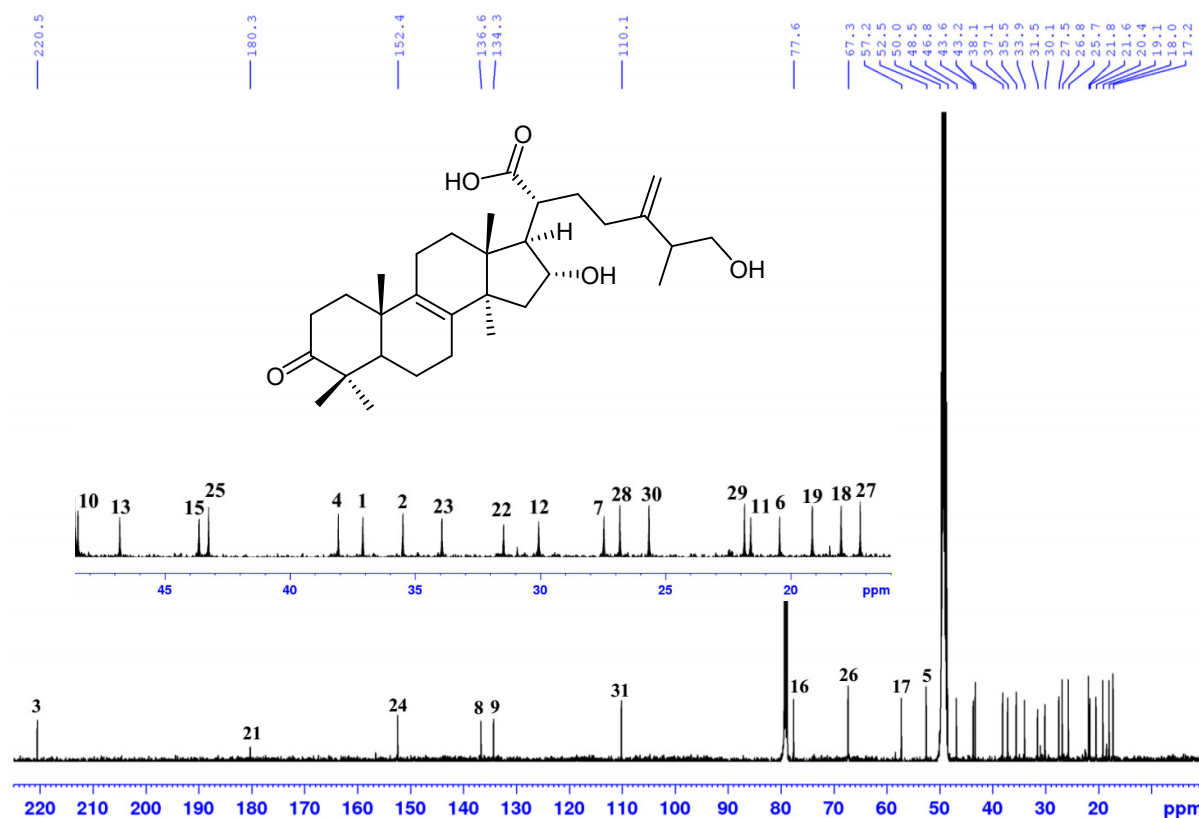
### 2.3.26. Određivanje strukture 16 $\alpha$ -26-dihidroksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-8-enske kiseline – poliporenske kiseline L (26)

Molekulska formula  $C_{31}H_{48}O_5$  jedinjenja 26, bele kristalne supstance, određena je na osnovu deprotonovanog molekuskog jona  $[M-H]^-$  na  $m/z$  501,3592 vrednosti iz HR-ESI-MS spektra. Sličnost NMR podataka (Tabela 19, Slike 85-90) sa jedinjenjima 24 i 25 (Tabele 18 i 19) ukazuje na isti tip 24-metilen-3-okso-21-lanost-8-enske kiseline sa dve hidroksilne grupe. Proton oksigenovane metinske grupe na  $\delta_H$  4,06 (dd,  $J_1=9,0$ ;  $J_2=6,7$  Hz), ima gotovo identičan multiplicitet i hemijsko pomeranje kao i H-16 $\beta$  u jedinjenjima 24 i 25 što je ukazalo na 16 $\alpha$ -hidroksilaciju kod jedinjenja 26. Ovo je utvrđeno i COSY korelacijama H-16/H-15 ( $\delta_H$  2,20) i H-17 ( $\delta_H$  2,10) (Slika 87) i HMBC korelacijama H-16/C-14 ( $\delta_C$  49,4) i C-17 ( $\delta_C$  57,2) (Slika 89). NOESY korelacije H-16/H<sub>3</sub>-18, H<sub>2</sub>-15 i H-20 potvrđuju 16 $\alpha$ -OH relativnu konfiguraciju (Slika 90). Dublet metila (H<sub>3</sub>-26), koji se javlja u  $^1H$  NMR spektrima jedinjenja 24 i 25 na  $\delta_H$  1,03 (kod oba jedinjenja), u spektru jedinjenja 26 zamenjen je signalima diasterotopne oksimetilenske grupe (H<sub>2</sub>-26) ( $\delta_H$  3,50, dd,  $J_1=10,8$ ;  $J_2=7,1$  Hz i  $\delta_H$  3,40, dd,  $J_1=10,8$ ;  $J_2=5,9$  Hz). COSY korelacije ove metilenske grupe sa H-25 protonom ( $\delta_H$

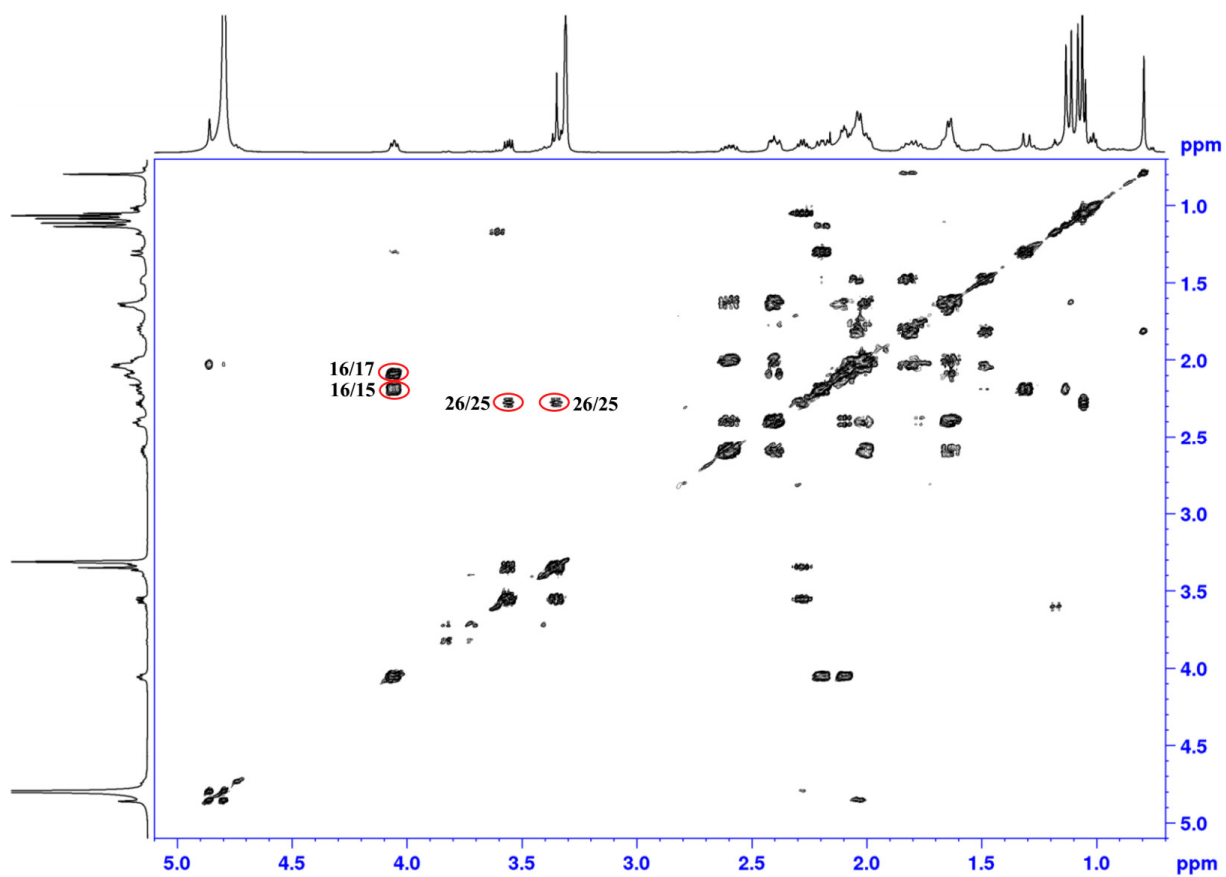
2,25 m) i H-25/H-27 korelacije, kao i HMBC korelacije H<sub>2</sub>-26/C-24 ( $\delta_C$  152,4), C-27 ( $\delta_C$  17,2) i C-25 ( $\delta_C$  43,2) potvrdile su prisustvo C(26)H<sub>2</sub>-OH grupe. Relativne konfiguracije C-17 i C-20 su identične kao i kod jedinjenja **24** i **25**, što je utvrđeno na osnovu istih korelacija iz NOESY spektra (Slika 90), dok C-25 relativna konfiguracija nije definisana. Na osnovu svih navedenih činjenica, zaključuje se da jedinjenje **26** predstavlja 16 $\alpha$ -26-dihidroksi-24-metilen-3-okso-21-lanost-8-ensku kiselinu, jedinjenje koje do sada nije opisano u literaturi, nazvano poliporenska kiselina L.



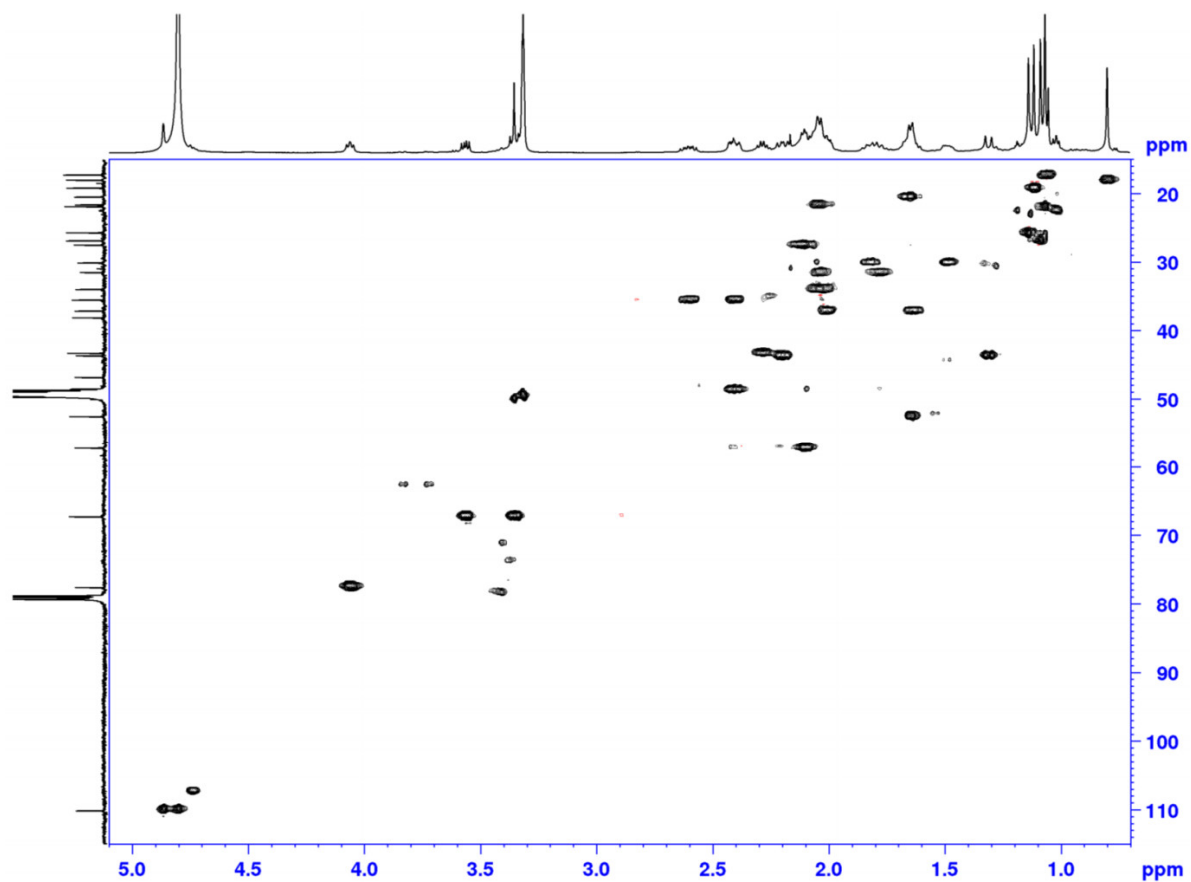
Slika 85. <sup>1</sup>H NMR spektar (500 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>) jedinjenja **26**.



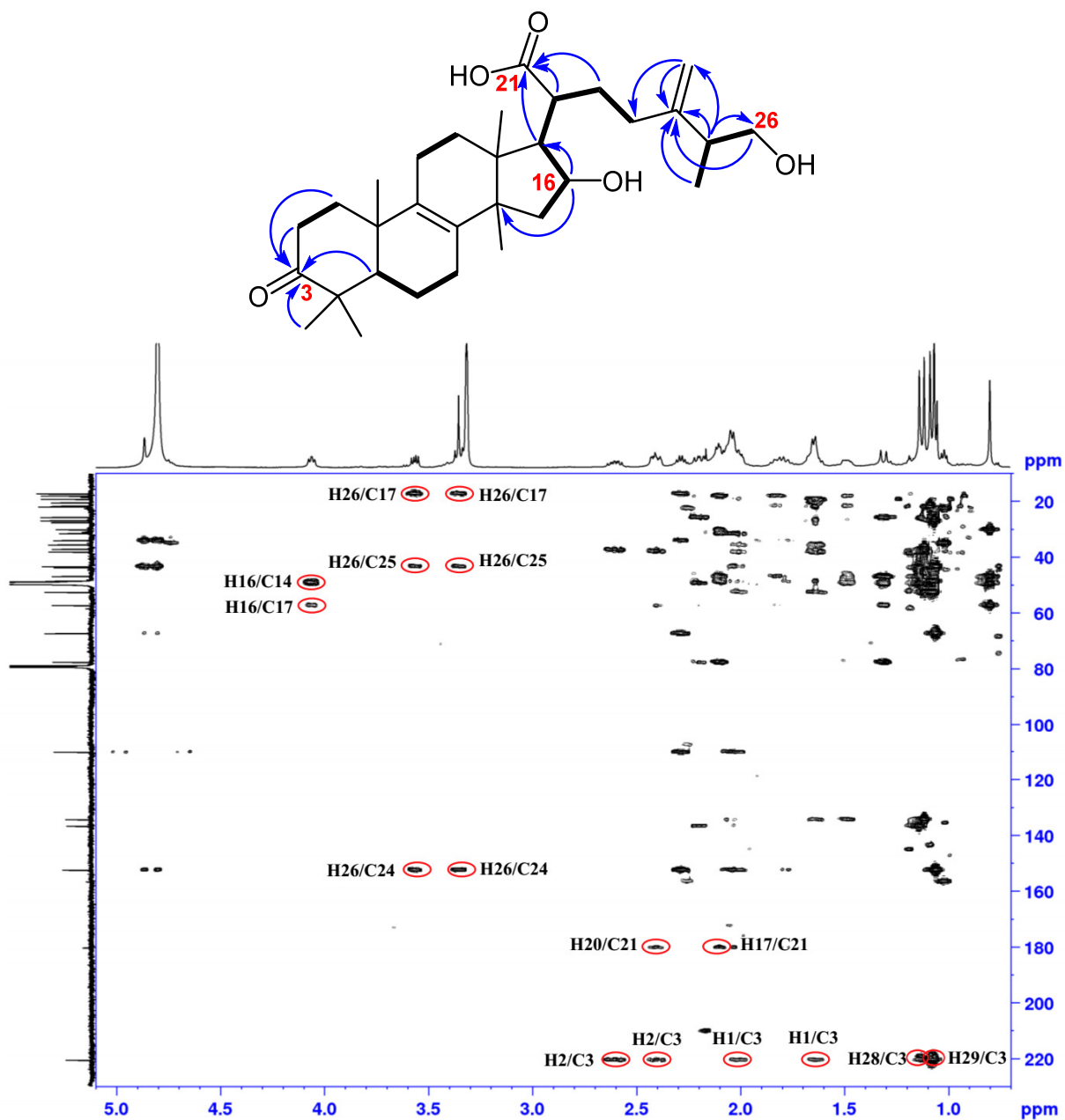
Slika 86. <sup>13</sup>C NMR spektar (125 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>) i struktura jedinjenja **26**.



Slika 87. COSY spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 26.

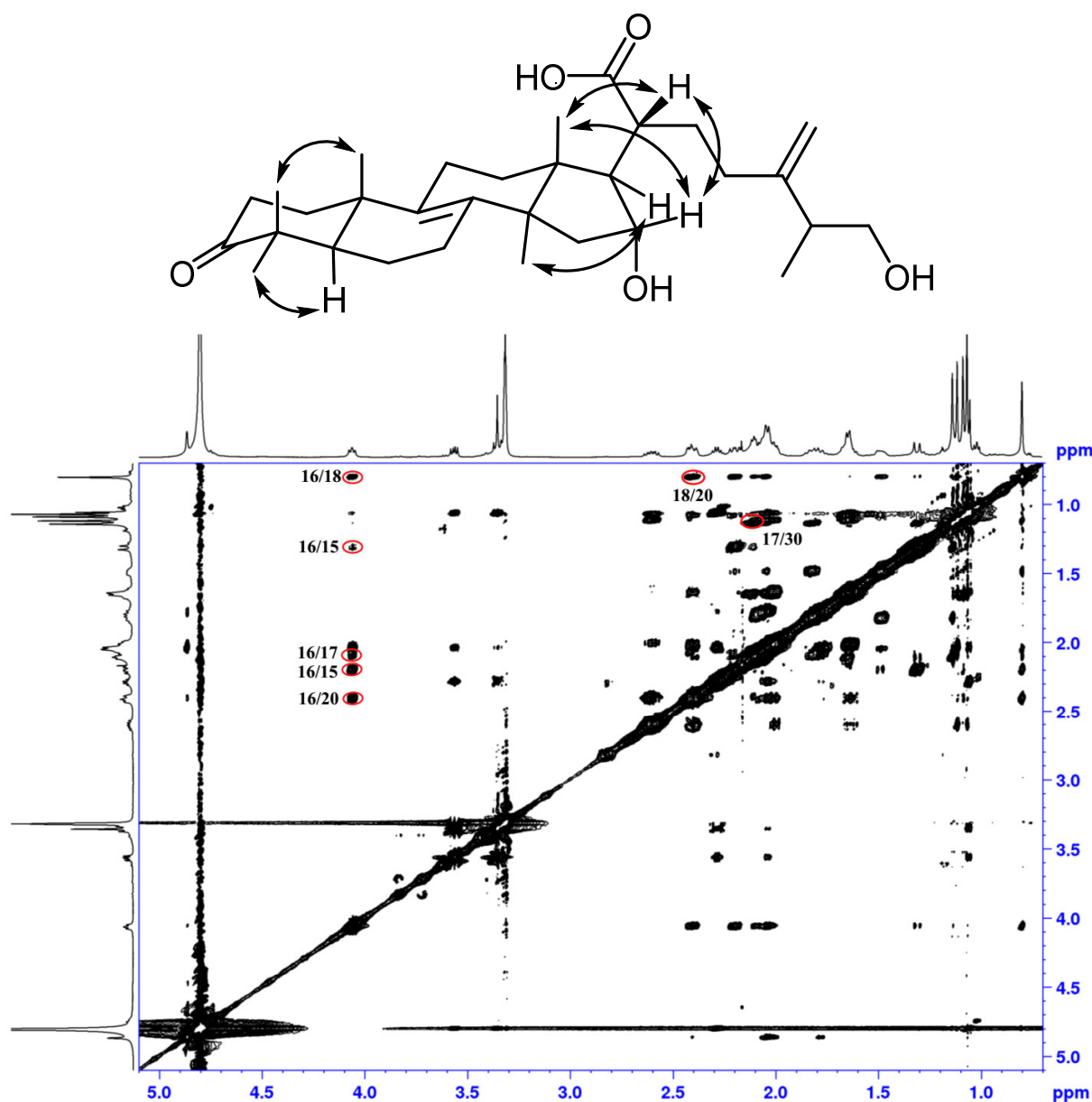


Slika 88. HSQC spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 26.



Slika 89. HMBC korelacije i spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 26.



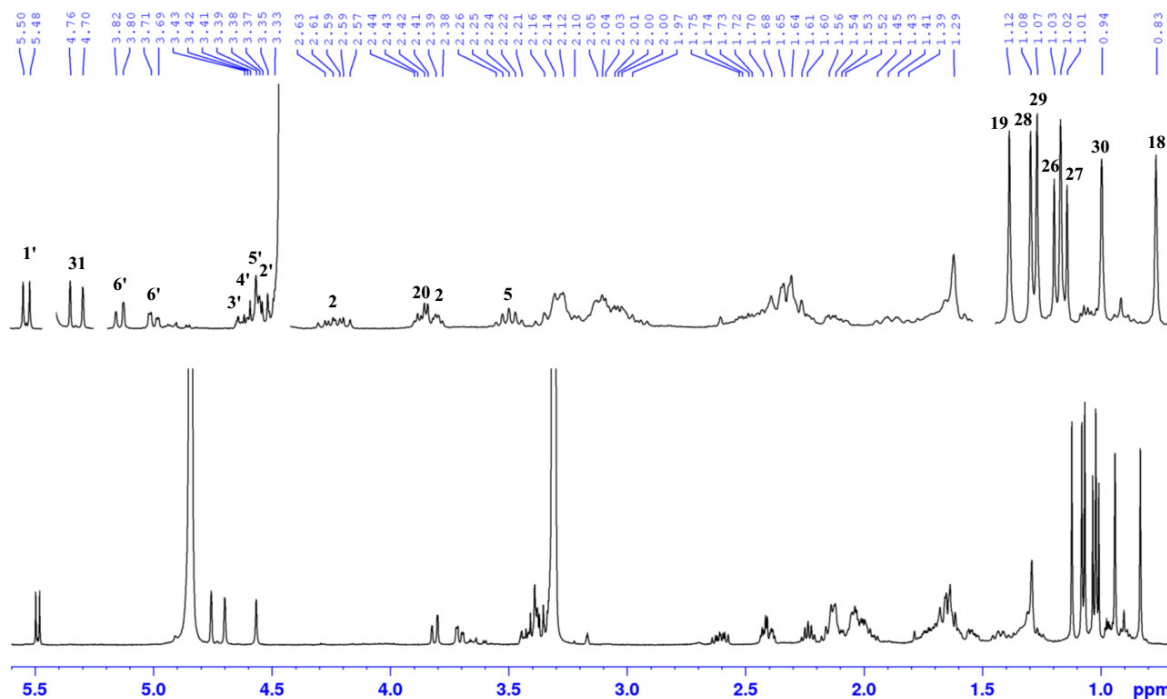


Slika 90. NOESY korelacije i spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 26.

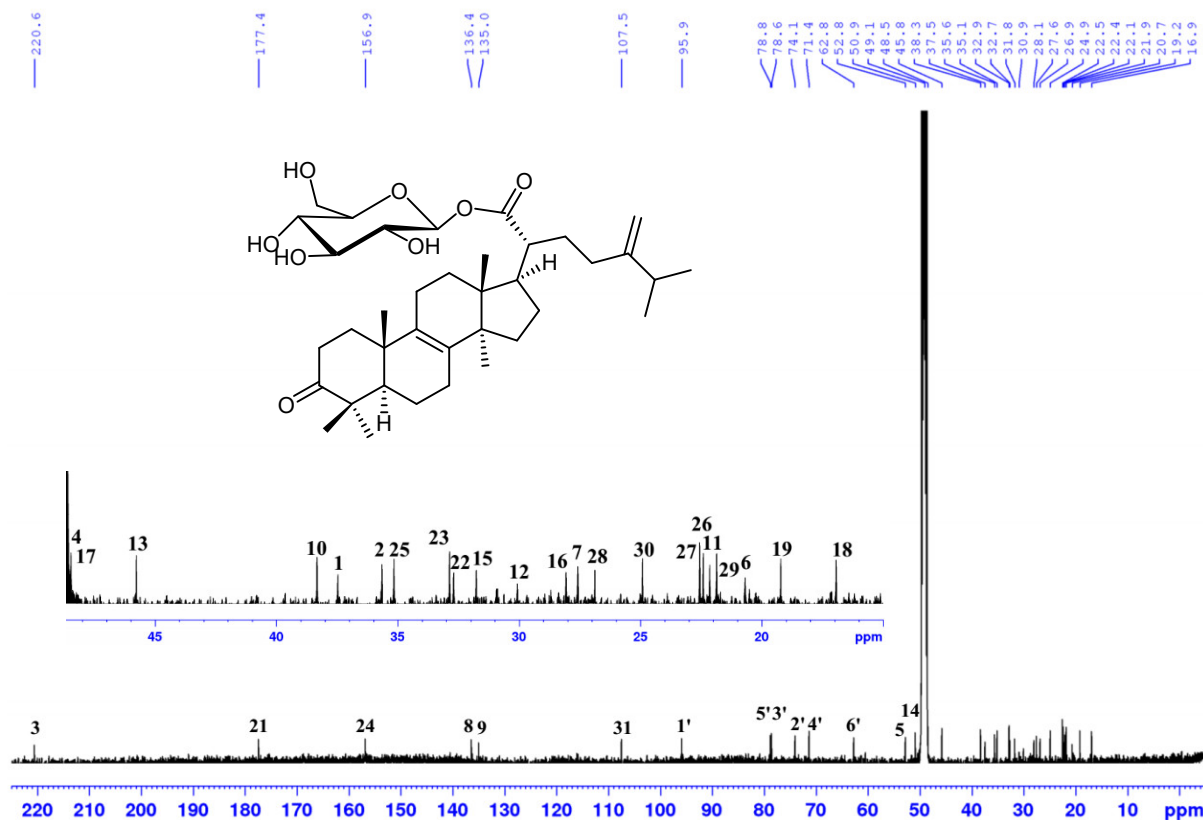
### 2.3.27. Određivanje strukture 21-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozida 24-metilen-3-okso-21-lanost-8-enske kiseline – fomitozida L (27)

Molekulska formula jedinjenja 27,  $C_{37}H_{58}O_8$ , dobijena je iz HR-ESI-MS spektra na osnovu deprotonovanog molekuskog jona  $[M-H]^-$  na  $m/z$  629,4011 vrednosti. U  $^{13}C$  NMR spektru (Slika 92) prisutno je 37 signala različitih ugljenika, tipičnih za triterpenske glikozide (Tabela 19). Signali keto ( $\delta_C$  220,6) i estarskog ( $\delta_C$  177,4) karbonilnog ugljenika, kao i ugljenici tetrasupstituisane ( $\delta_C$  135,0 i 136,4) i terminalne ( $\delta_C$  156,9 i 107,5) dvostruke veze ukazali su na osnovni skelet 24-metilen-3-okso-21-lanost-8-enske kiseline, kao kod jedinjenja 24-26, što je potvrđeno analizom 1D i 2D NMR spektara (Slike 91-96). Šest signala u oblasti  $\delta_C$  60-100 ppm i signali anomernog protona na  $\delta_H$  5,49 (d,  $J=8,1$  Hz), oksimetilenske grupe na  $\delta_H$  3,70 (dd,  $J_1=11,8$ ;  $J_2=2,5$  Hz) i 3,81 (brd,  $J=11,8$  Hz) i četiri oksimetinskih grupa na  $\delta_H$  3,3-3,5 ppm ukazuju na  $\beta$ -D-glukopiranozil jedinicu (Slika 91). Kiselom hidrolizom jedinjenja 27 dobijena je  $\beta$ -D-glukoza, koja je identifikovana HPLC hromatografijom, na osnovu poređenja retencionih vremena sa analitičkim standardom  $\beta$ -D-glukoze. Na osnovu HMBC korelacije anomernog protona (H-1',  $\delta_H$  5,49) sa estarskim karbonilom (C-21,  $\delta_C$

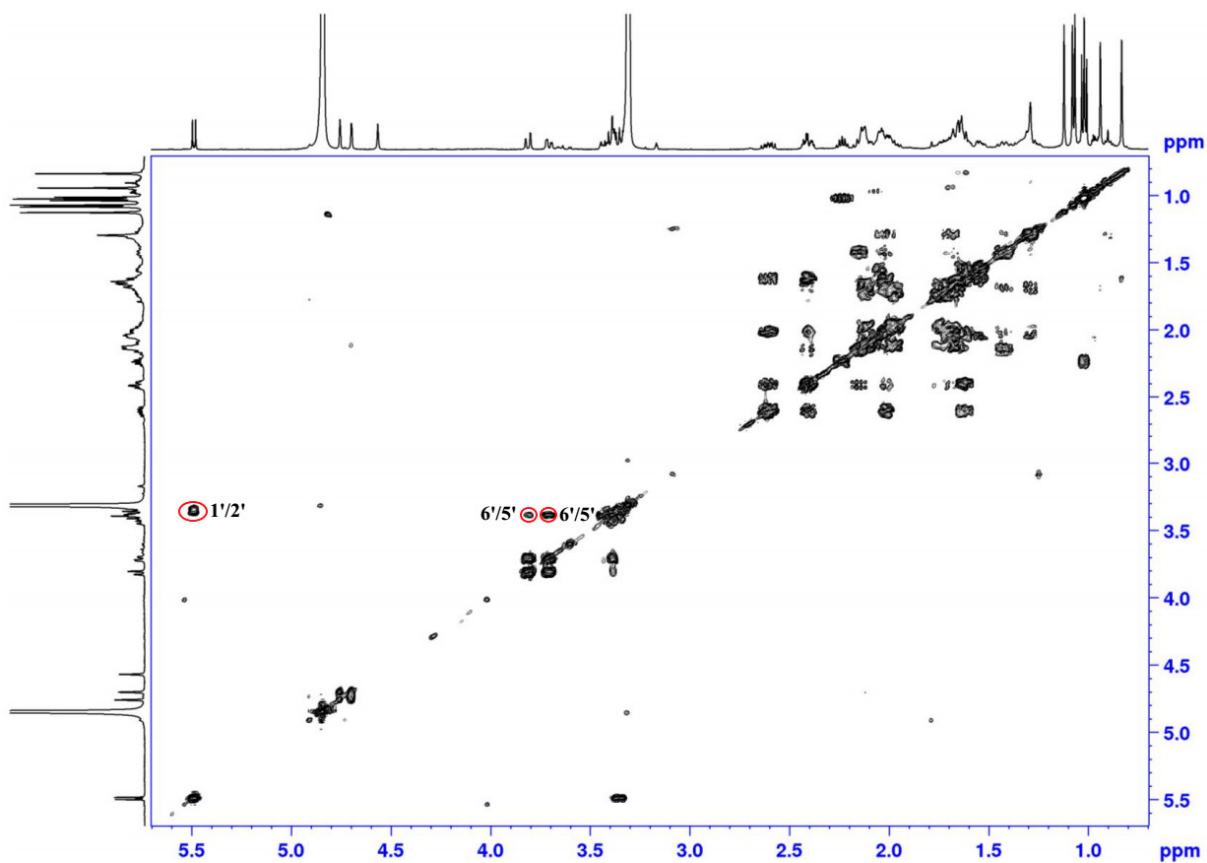
177,4) određeno je C-21 mesto *O*-glikozilacije. Relativne konfiguracije C-17 i C-20 su iste kao kod prethodno opisanih jedinjenja **24-26**, što je utvrđeno na osnovu NOESY korelacija H-17/H<sub>3</sub>-30 i H-20/H<sub>3</sub>-18 (Slika 96). Hemijsko pomeranje C-20 ( $\delta_C$  49,1) veoma je slično kao kod fomitozida K ( $\delta_C$  48,8), sličnog lanostanskog glikozida sa  $\alpha$ -orijentacijom karboksilne grupe.<sup>123</sup> Na osnovu svega navedenog utvrđeno je da je jedinjenje **27** 21-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozid 24-metilen-3-okso-21-lanost-8-enske kiseline, jedinjenje koje do sada nije opisano u literaturi i nazvano je fomitozid L. Jedinjenje **27** predstavlja prvi primer izolovanog triterpenskog glikozida iz gljive *F. betulina*.



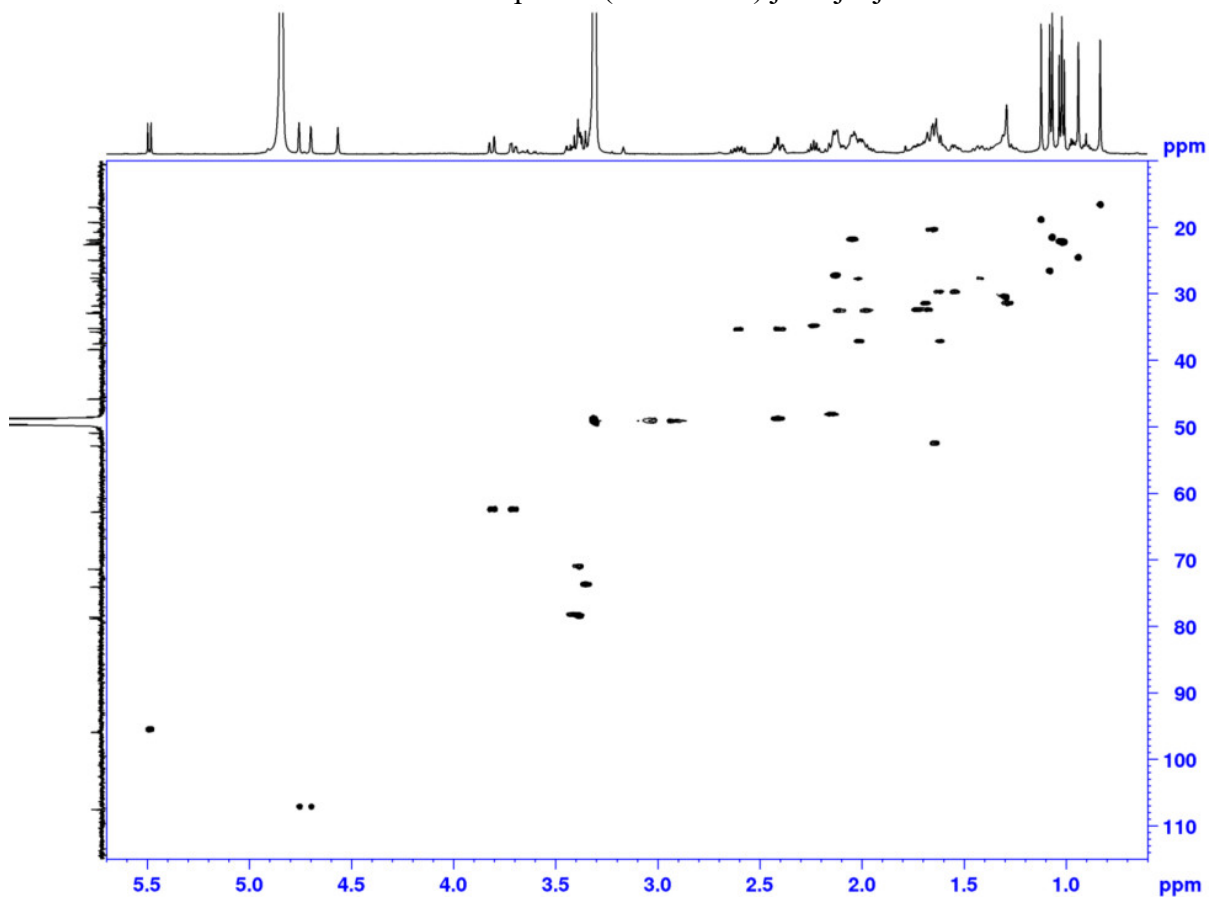
Slika 91. <sup>1</sup>H NMR spektar (500 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>) jedinjenja **27**.



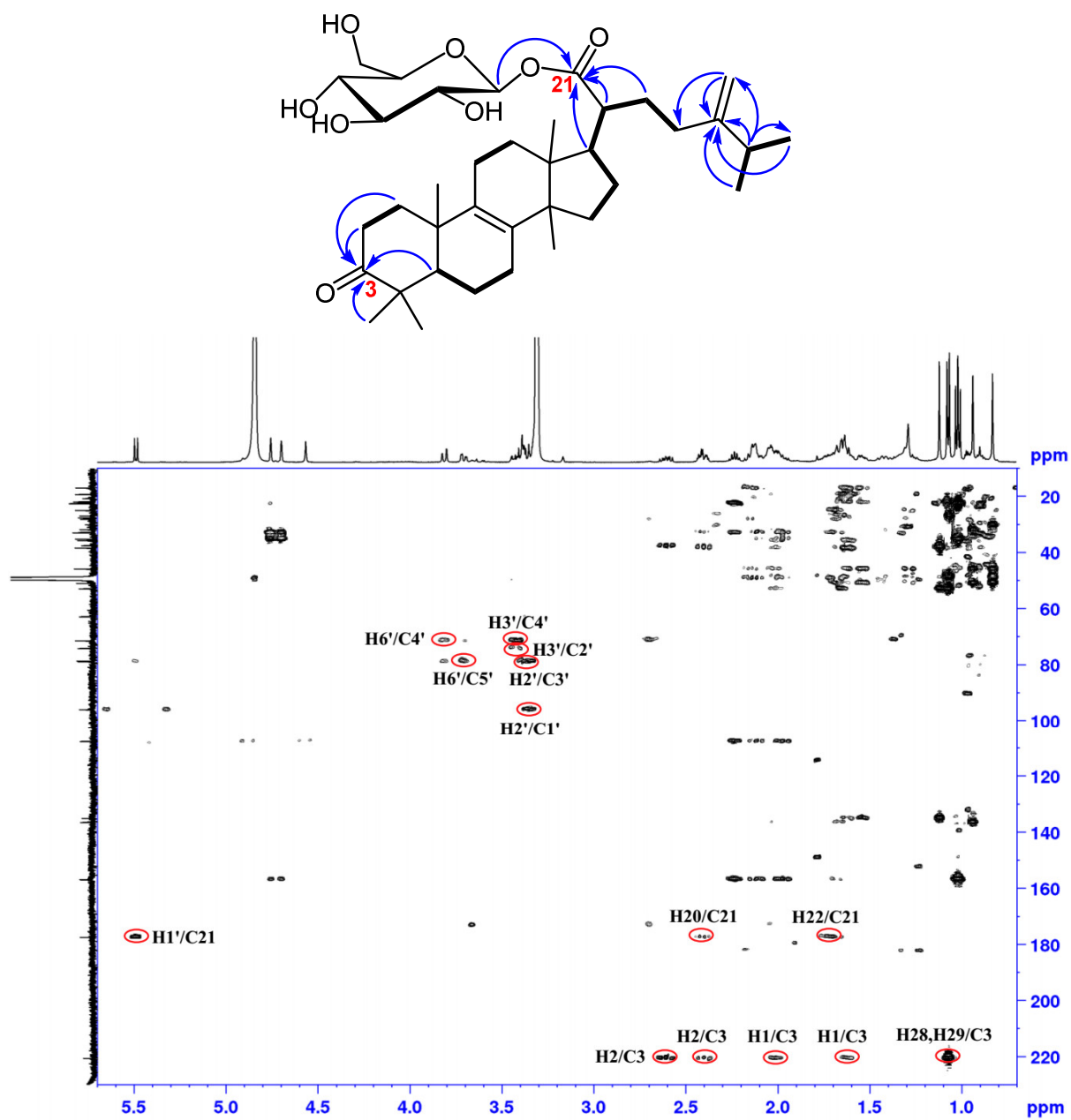
Slika 92. <sup>13</sup>C NMR spektar (125 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>) i struktura jedinjenja **27**.



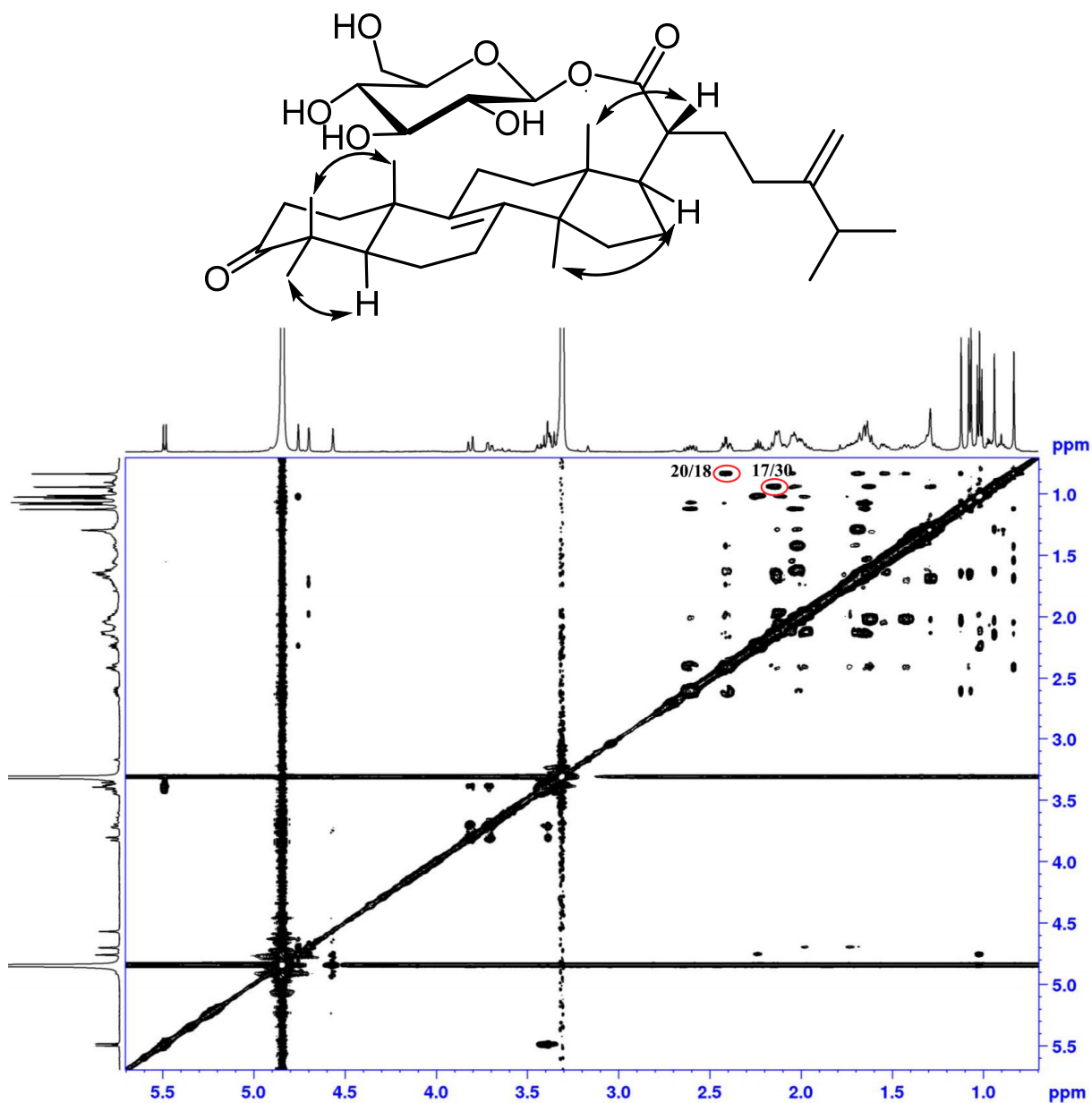
Slika 93. COSY spektar (metanol-*d*<sub>4</sub>) jedinjenja 27.



Slika 94. HSQC spektar (metanol-*d*<sub>4</sub>) jedinjenja 27.



Slika 95. HMBC korelacije i spektar (metanol-*d*<sub>4</sub>) jedinjenja 27.



Slika 96. NOESY korelacije i spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 27.

**Tabela 19.**  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) i  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) podaci za jedinjenja **25**, **26** i **27**.

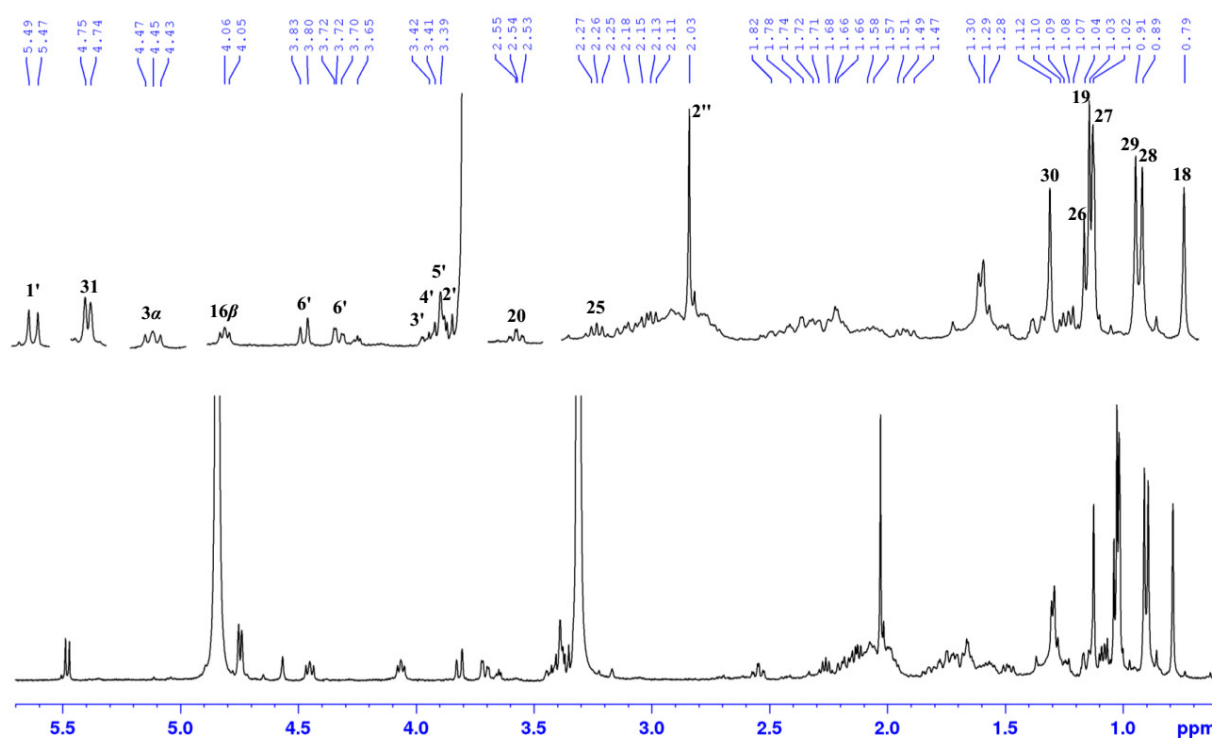
| C/H  | <b>25<sup>b</sup></b> |  | <b>26<sup>b</sup></b> |                                     | <b>27<sup>a</sup></b> |                                      |
|------|-----------------------|--|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
|      | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz)                           | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz)        | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J u Hz)         |
| 1    | 36,8                  | 1,61 m; 2,00 m   | 37,1                  | 1,64 m; 2,01 m                      | 37,5                  | 1,61 m; 2,01 m                       |
| 2    | 35,5                  | 2,42 ddd (16,1; 7,1; 3,7)<br>2,60 ddd (16,1; 9,2; 7,3) | 35,5                  | 2,40 m<br>2,60 ddd (16,1; 9,8; 7,3) | 35,6                  | 2,40 m<br>2,60 ddd (15,9; 9,7; 7,3)  |
| 3    | 220,9                 | -  | 220,5                 | -                                   | 220,6                 | -                                    |
| 4    | 39,2                  | -  | 38,0                  | -                                   | 48,5                  | -                                    |
| 5    | 47,0                  | 1,90 m   | 52,5                  | 1,65 m                              | 52,8                  | 1,60 m                               |
| 6    | 24,5                  | 1,56 m; 1,90 m   | 20,4                  | 1,63-1,68 (2H) m                    | 20,7                  | 1,64-1,67 (2H) m                     |
| 7    | 78,0                  | 3,68 brd   | 27,4                  | 2,10-2,13 (2H) m                    | 27,6                  | 2,10-2,14 (2H) m                     |
| 8    | 137,0                 | -  | 136,6                 | -                                   | 136,4                 | -                                    |
| 9    | 141,0                 | -  | 134,3                 | -                                   | 135,0                 | -                                    |
| 10   | 48,1                  | -  | 48,5                  | -                                   | 38,3                  | -                                    |
| 11   | 21,7                  | 2,07-2,11 (2H) m                                       | 21,6                  | 2,04-2,06 (2H) m                    | 22,1                  | 2,02-2,06 (2H) m                     |
| 12   | 30,4                  | 1,54 m; 1,85 m   | 30,1                  | 1,48 m; 1,82 m                      | 30,1                  | 1,54 m; 1,62 m                       |
| 13   | 47,6                  | -  | 46,8                  | -                                   | 45,8                  | -                                    |
| 14   | 49,4*                 | -  | 49,4*                 | -                                   | 50,9                  | -                                    |
| 15   | 43,2                  | 1,45 m; 2,30 m   | 43,6                  | 1,31 m; 2,20 m                      | 31,8                  | 1,28 m; 1,68 m                       |
| 16   | 78,1                  | 4,07 dd (8,7; 6,7)                                     | 77,6                  | 4,06 m                              | 28,1                  | 1,42 m; 2,01 m                       |
| 17   | 57,8                  | 2,12 m   | 57,2                  | 2,10 m                              | 48,5                  | 2,14 m                               |
| 18   | 18,1                  | 0,73 s   | 18,0                  | 0,79 s                              | 16,9                  | 0,83 s                               |
| 19   | 17,5                  | 1,07 s   | 19,1                  | 1,11 s                              | 19,2                  | 1,12 s                               |
| 20   | 50,4                  | 2,34 m   | 48,7*                 | 2,41 m                              | 49,1*                 | 2,41 m                               |
| 21   | 180,0                 | -  | 180,3                 | -                                   | 177,4                 | -                                    |
| 22   | 32,2                  | 1,75 m; 2,00 m   | 31,5                  | 1,78 m; 2,04 m                      | 32,7                  | 1,67 m; 1,72 m                       |
| 23   | 33,8                  | 2,00 m; 2,10 m   | 33,9                  | 2,02-2,06 (2H) m                    | 32,9                  | 1,98 m; 2,10 m                       |
| 24   | 157,3                 | -  | 152,4                 | -                                   | 156,9                 | -                                    |
| 25   | 35,2                  | 2,27 m   | 43,2                  | 2,28 m                              | 35,1                  | 2,23 sep (6,4)                       |
| 26   | 22,4                  | 1,03 d (4,9)   | 67,2                  | 3,35 m<br>3,56 dd (10,8; 5,9)       | 22,4                  | 1,03 d (6,4)                         |
| 27   | 22,5                  | 1,03 d (4,9)   | 17,2                  | 1,06 d (6,4)                        | 22,5                  | 1,01 d (6,4)                         |
| 28   | 26,8                  | 1,09 s   | 26,8                  | 1,11 s                              | 26,9                  | 1,08 s                               |
| 29   | 22,0                  | 1,09 s   | 21,8                  | 1,08 s                              | 21,9                  | 1,07 s                               |
| 30   | 27,2                  | 1,23 s   | 25,6                  | 1,13 s                              | 24,9                  | 0,94 s                               |
| 31   | 107,2                 | 4,74 brs; 4,74 brs                                     | 110,1                 | 4,80 brs; 4,87 brs                  | 107,5                 | 4,70 brs; 4,76 brs                   |
| 7-   | 56,3                  | 3,33 s   |                       |                                     |                       |                                      |
| OMe  |                       |  |                       |                                     |                       |                                      |
| 21-  |                       |  |                       |                                     |                       |                                      |
| OGlc |                       |  |                       |                                     |                       |                                      |
| 1'   |                       |  |                       |                                     | 95,9                  | 5,49 d (8,1)                         |
| 2'   |                       |  |                       |                                     | 74,1                  | 3,35 m                               |
| 3'   |                       |  |                       |                                     | 78,6                  | 3,41 m                               |
| 4'   |                       |  |                       |                                     | 71,3                  | 3,39 m                               |
| 5'   |                       |  |                       |                                     | 78,8                  | 3,37 m                               |
| 6'   |                       |  |                       |                                     | 62,9                  | 3,70 dd (11,8; 2,5)<br>3,81 d (11,8) |

<sup>a</sup>Metanol-*d*<sub>4</sub>, <sup>b</sup>Metanol-*d*<sub>4</sub> i hloroform-*d*, \*očitan iz HSQC spektra

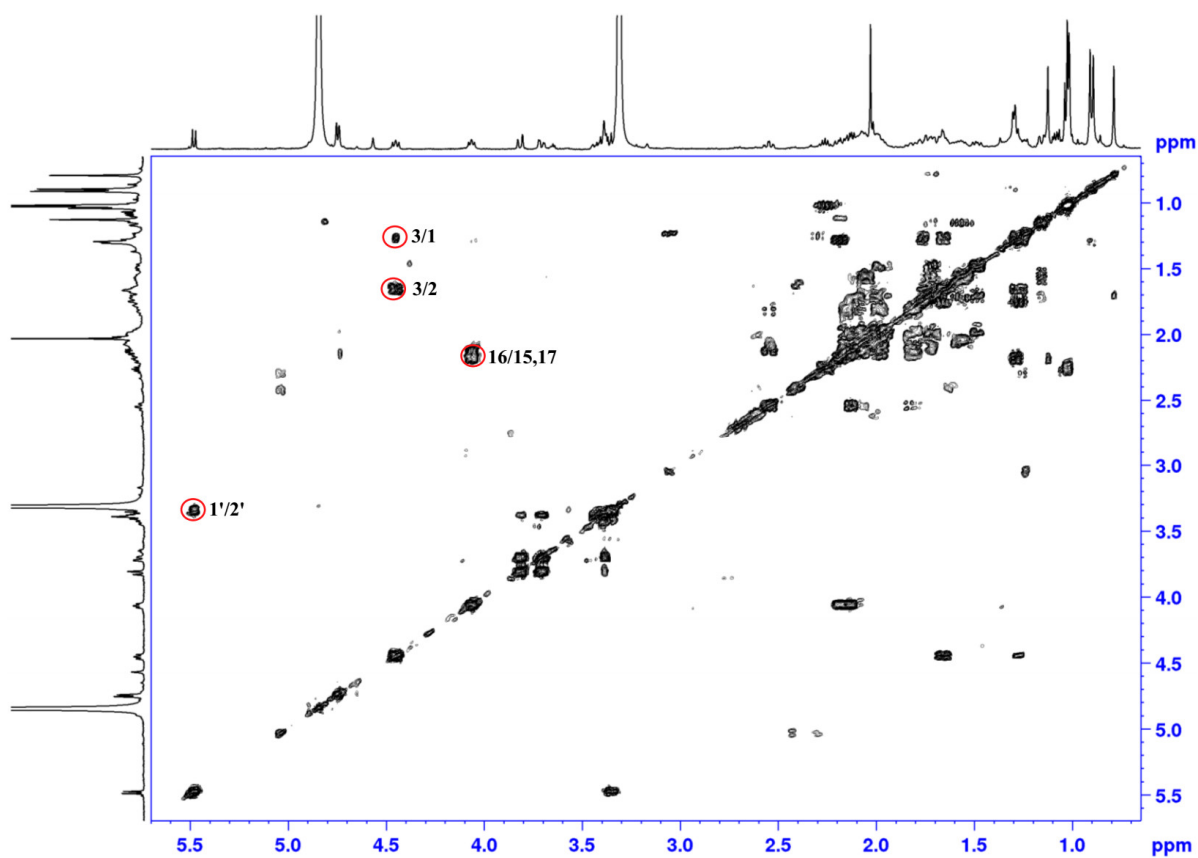
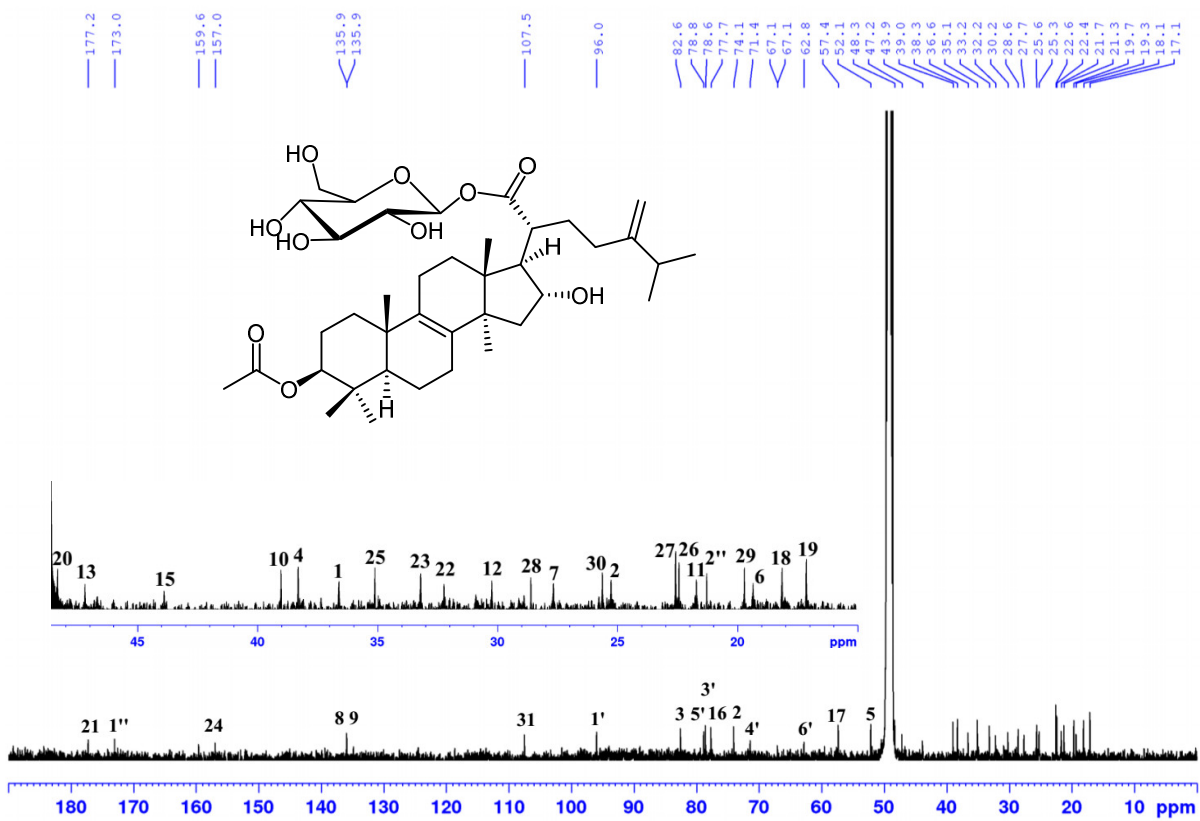
### 2.3.28. Određivanje strukture 21-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozida 3 $\beta$ -acetoksi-16 $\alpha$ -hidroksi-24-metilen-21-lanost-8-enske kiseline – fomitozida **M** (**28**)

Jedinjenje **28**, bela kristalna supstanca, ima molekulsku formulu  $\text{C}_{39}\text{H}_{62}\text{O}_{10}$  dobijenu na osnovu protonovanog molekuskog jona  $[\text{M}+\text{H}]^+$  na  $m/z$  691,4287 vrednosti iz HR-ESI-MS spektra. Na osnovu analize  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR podataka (**Slike 97 i 98, Tabela 20**) ustanovljena je velika sličnost sa prethodno opisanim jedinjenjem **27**. Pored 37 signala iz  $^{13}\text{C}$  NMR spektra, koji potiču od triterpenskog glikozida, uočavaju se dva dodatna signala na  $\delta_{\text{C}}$  21,3 i 173,0 ppm, tipična za acetat. Osim toga, izostaje signal keto grupe ( $\delta_{\text{C}}$  220,6 ppm kod jedinjenja **27**), a uočavaju se dva signala oksigenovanih ugljenikovih atoma na  $\delta_{\text{C}}$  77,7 i 82,6 (**Slika 100**). U  $^1\text{H}$  NMR spektru, prisutan je i

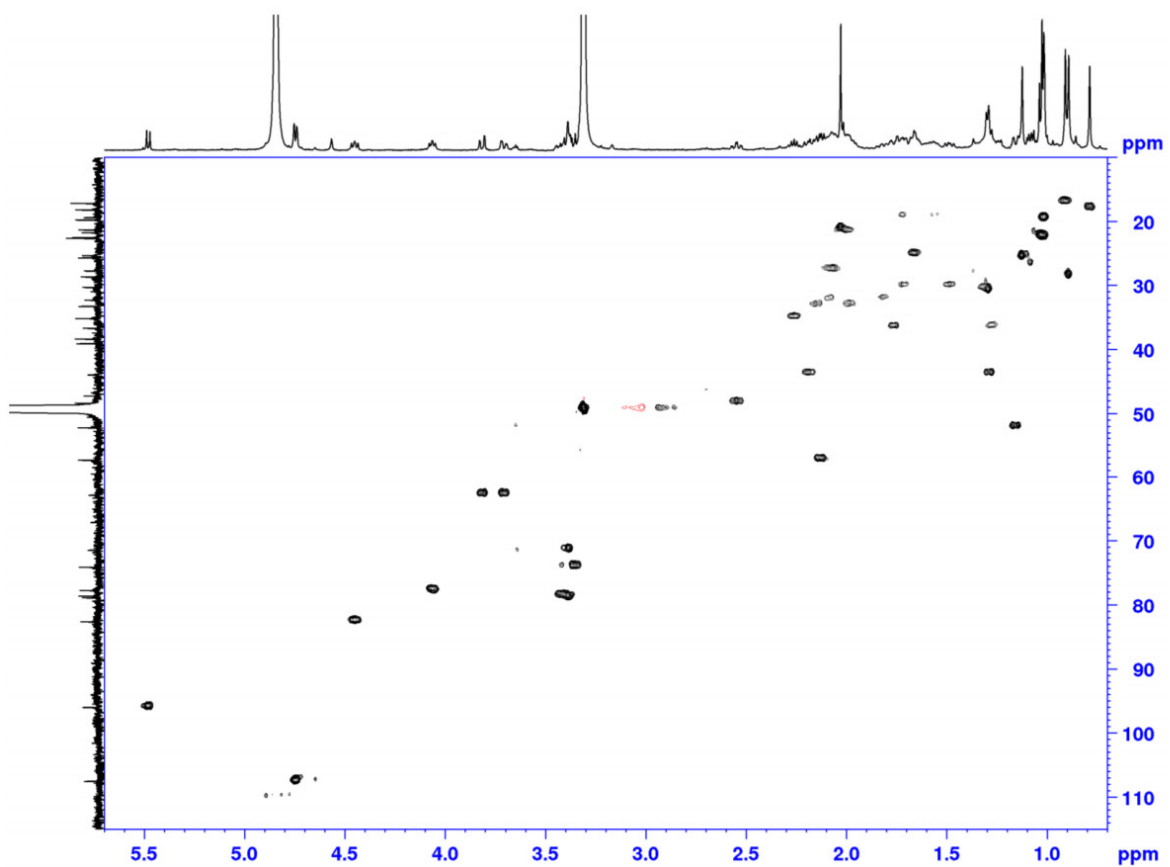
singlet metil grupe na  $\delta_H$  2,03 (H-2''), čija HMBC korelacija sa estarskim karbonilom na  $\delta_C$  173,0 (Slika 101), potvrđuje prisustvo acetatne grupe. Na osnovu HMBC korelacija H-3/C-1'' (Slika 101), kao i COSY korelacije H-3/H-2 (Slika 99), određen je 3-OAc položaj supstituenta. Hemijsko pomeranje i multiplicitet H-3 protona ( $\delta_H$  4,45, dd,  $J_1=8,6$ ;  $J_2=7,5$  Hz) je tipičan za  $3\beta$ -OAc konfiguraciju. Signal iz oksimetinske grupe ( $\delta_H$  4,06, dd,  $J_1=9,0$ ;  $J_2=6,4$  Hz;  $\delta_C$  77,7 ppm) odgovara  $16\alpha$ -hidroksilaciji kao kod jedinjenja 21 i 25-27. Položaj  $16\alpha$ -OH je potvrđen na osnovu HMBC korelacija H-16/C-15 i C-20, H-17/C-16 (Slika 101) i NOESY korelacija H-16/H<sub>3</sub>-18, H-20 (Slika 102). Estarska veza glukoze (kao kod jedinjenja 27) sa C-21 atomom utvrđena je na osnovu korelacije H-1' ( $\delta_H$  5,48, d,  $J=8,1$  Hz) sa C-21 ( $\delta_C$  177,2) iz HMBC spektra. Kao šećerna jedinica identifikovana je  $\beta$ -D-glukoza, poređenjem retencionih vremena u HPLC hromatogramu, proizvoda dobijenog nakon hidrolize jedinjenja 28 sa analitičkim standardom  $\beta$ -D-glukoze. Na osnovu svega navedenog zaključuje se da jedinjenje 28 predstavlja 21-O- $\beta$ -D-glukopiranozid  $3\beta$ -acetoksi- $16\alpha$ -hidroksi-24-metilen-21-lanost-8-enske kiseline, triterpenski glikozid, koji do sada nije opisan u literaturi, nazvan fomitozid M.



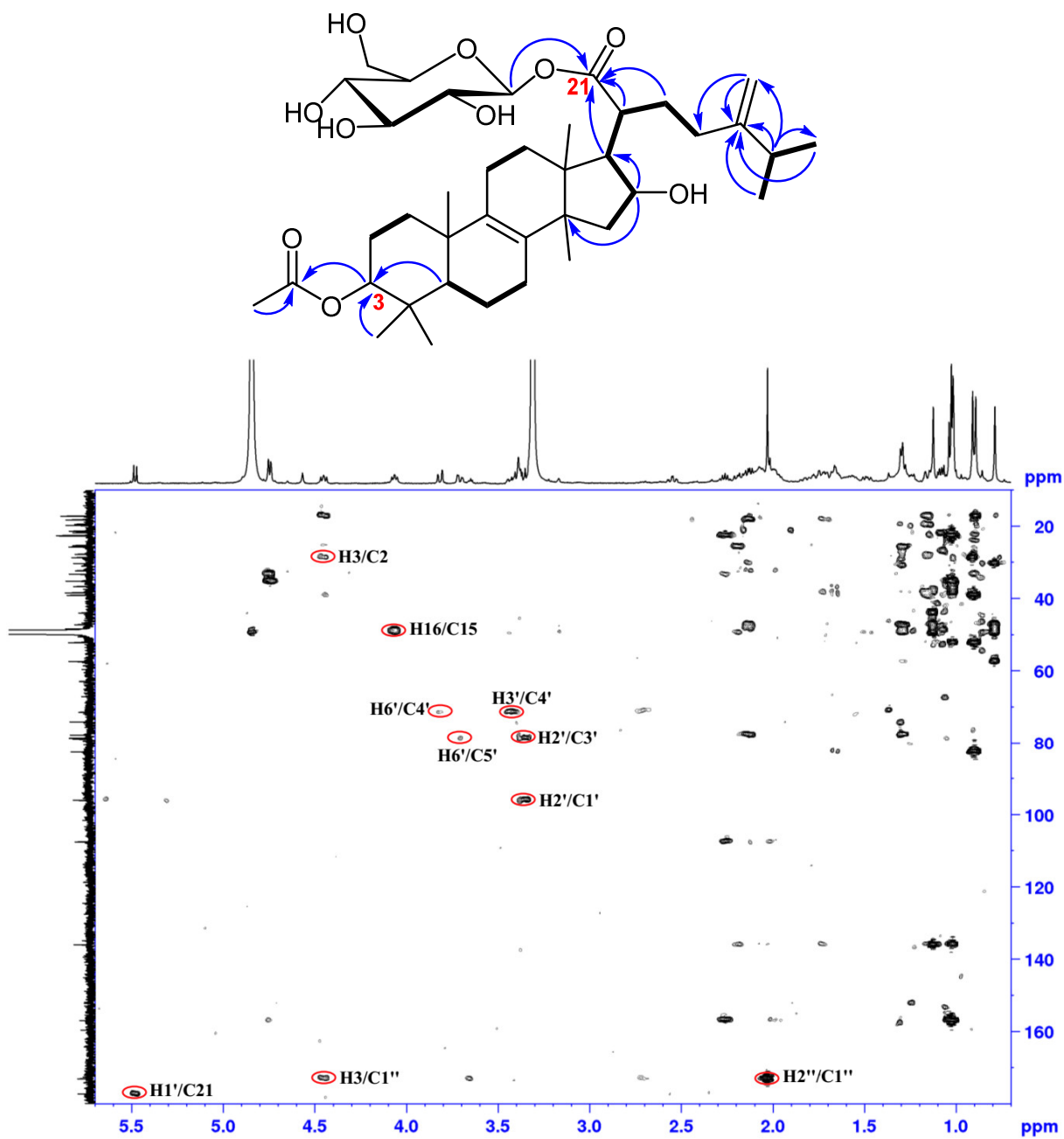
Slika 97.  $^1\text{H}$  NMR spektar (500 MHz, metanol- $d_4$ ) jedinjenja 28.



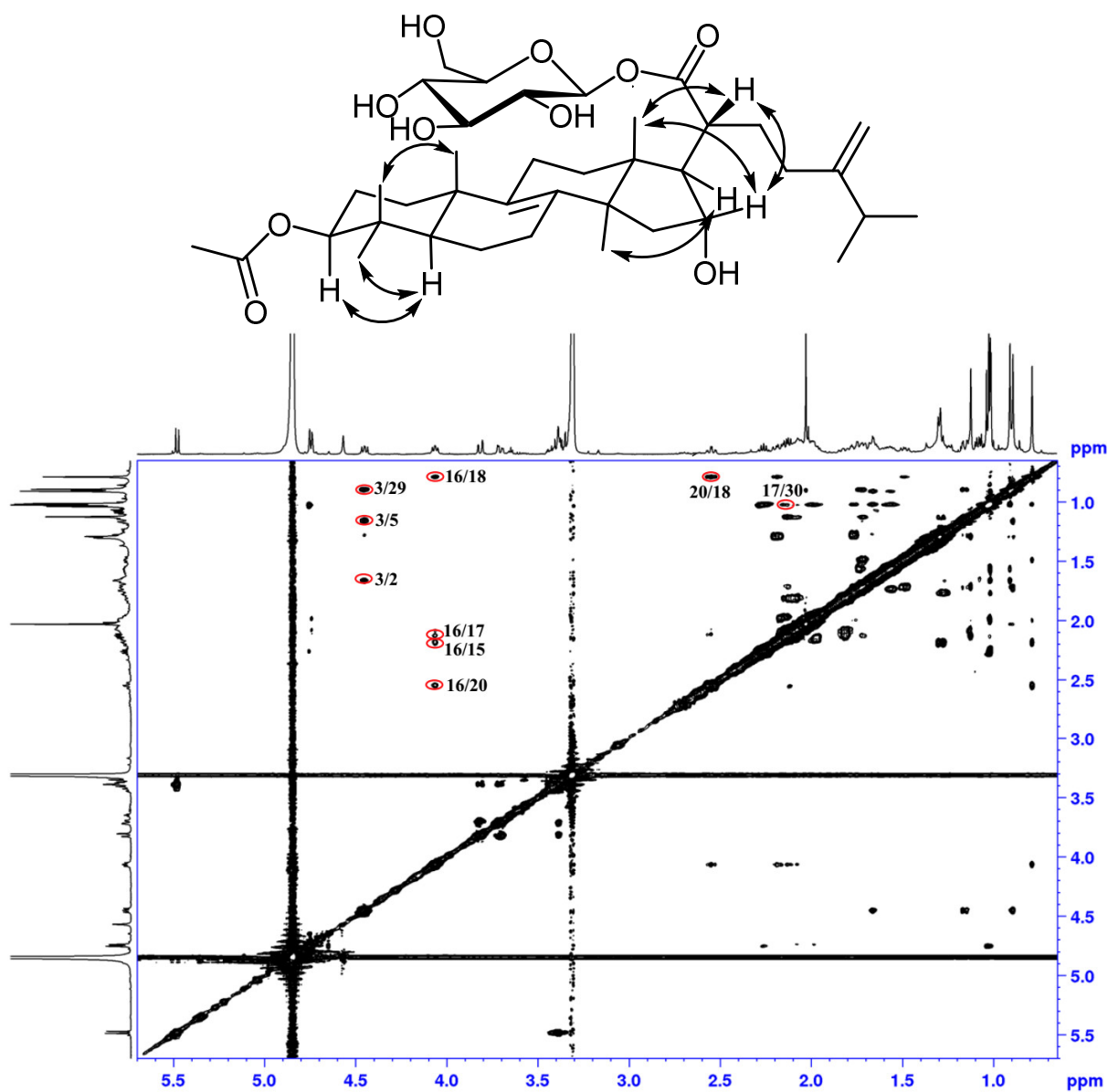




Slika 100. HSQC spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 28.



Slika 101. HMBC korelacije i spektar (metanol-*d*<sub>4</sub>) jedinjenja 28.

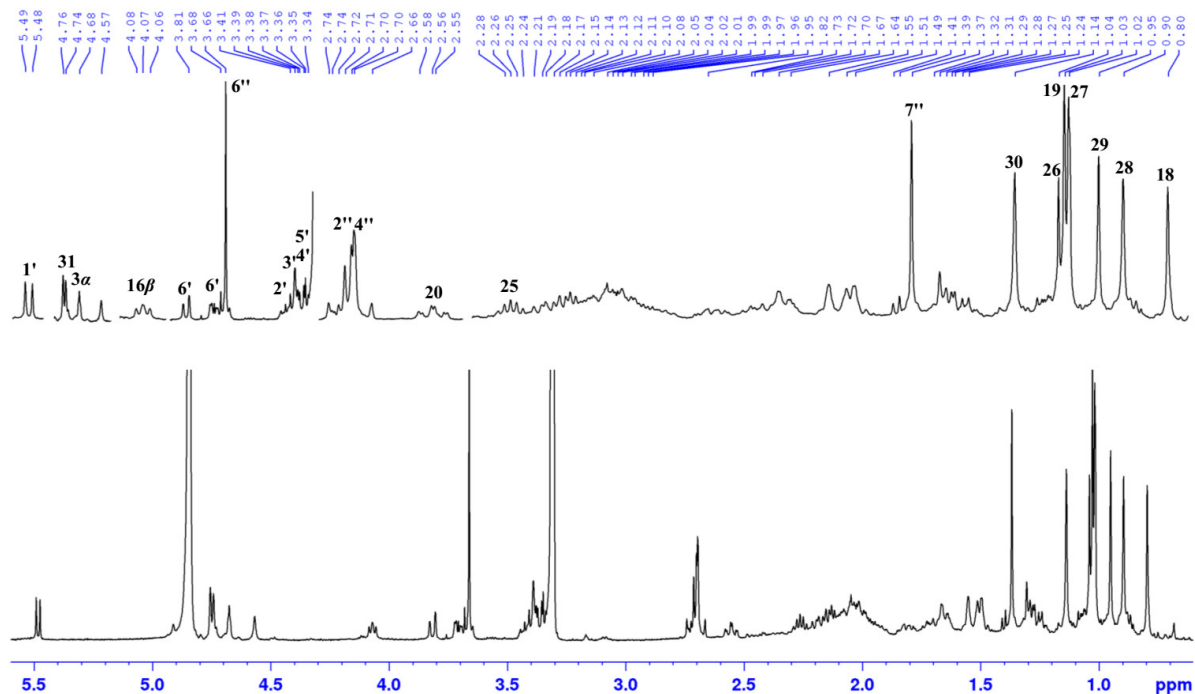


Slika 102. NOESY korelacije i spektar(metanol- $d_4$ ) jedinjenja 28.

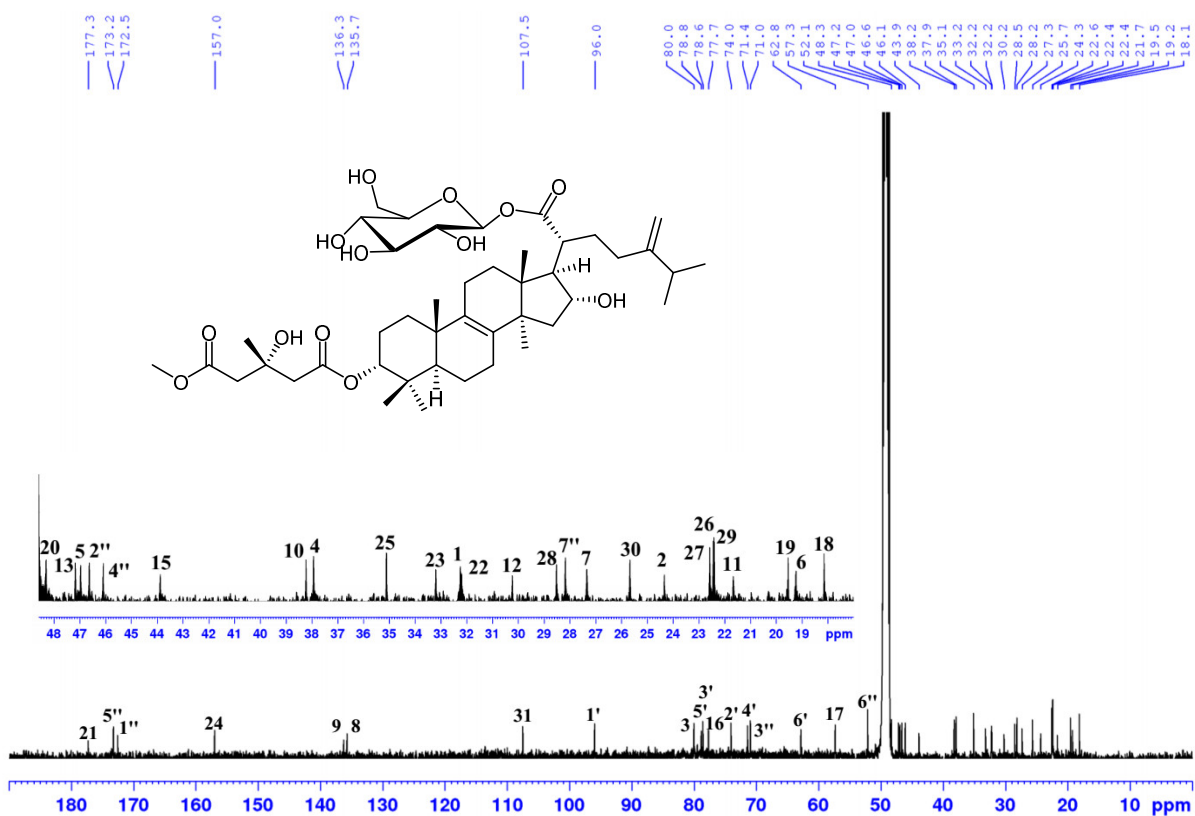
### 2.3.29. Određivanje strukture 21- $O$ - $\beta$ -D-glukopiranozida 16 $\alpha$ -hidroksi-3 $\alpha$ -(5'- $O$ -metil-3'-hidroksi-3'-metilglutariloksi)-24-metilen-21-lanost-8-enske kiseline – fomitozida N (29)

Jedinjenje 29, bela kristalna supstanca, u HR-ESI-MS spektru pokazuje adukt  $[M+Na]^+$  na  $m/z$  829,4746 vrednosti, na osnovu koga je dobijena molekulska formula  $C_{44}H_{70}O_{13}$ .  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR spektri jedinjenja 29 (Slike 103 i 104, Tabela 20) ukazuju na prisustvo  $\beta$ -D-glukoze kao šećerne komponente, kao i kod jedinjenja 27 i 28 i 5- $O$ -metil-3-hidroksi-3-metilglutariloksi grupe (umesto acetoksi grupe kod jedinjenja 28). Preostali signali iz NMR spektara potiču od osnovnog skeleta 24-metilen-16 $\alpha$ -hidroksi-21-lanost-8-enske kiseline. HMBC korelacija H-3 ( $\delta_H$  4,67, brs) sa C-1' ( $\delta_C$  172,5) iz 5- $O$ -metil-3-hidroksi-3-metilglutariloksi grupe ukazuje na njenu povezanost sa C-3 (Slika 107). Oblik H-3 signala (brs) ukazuje na 3 $\beta$ -H konfiguraciju što je u saglasnosti sa modelom kuplovanja, prethodno opisanom u delu 2.2.6. (Slika 15), kao i kod jedinjenja 19, 20 i 23. Signal protona oksigenovane metinske grupe ( $\delta_H$  4,07, dd,  $J_1=8,8$ ;  $J_2=6,4$  Hz) okarakterisan je kao 16 $\beta$ -H na osnovu analogije sa spektralnim podacima jedinjenja 28. Navedeni položaji i konfiguracije su potvrđeni na osnovu podatka iz COSY, HSQC, HMBC i NOESY spektara (Slike 105-108). Prisustvo  $\beta$ -D-glukoze potvrđeno je primenom HPLC hromatografske tehnike, na osnovu poređenja retencionih vremena proizvoda hidrolize jedinjenja 29 i analitičkog standarda  $\beta$ -D-glukoze. Položaj glukozil

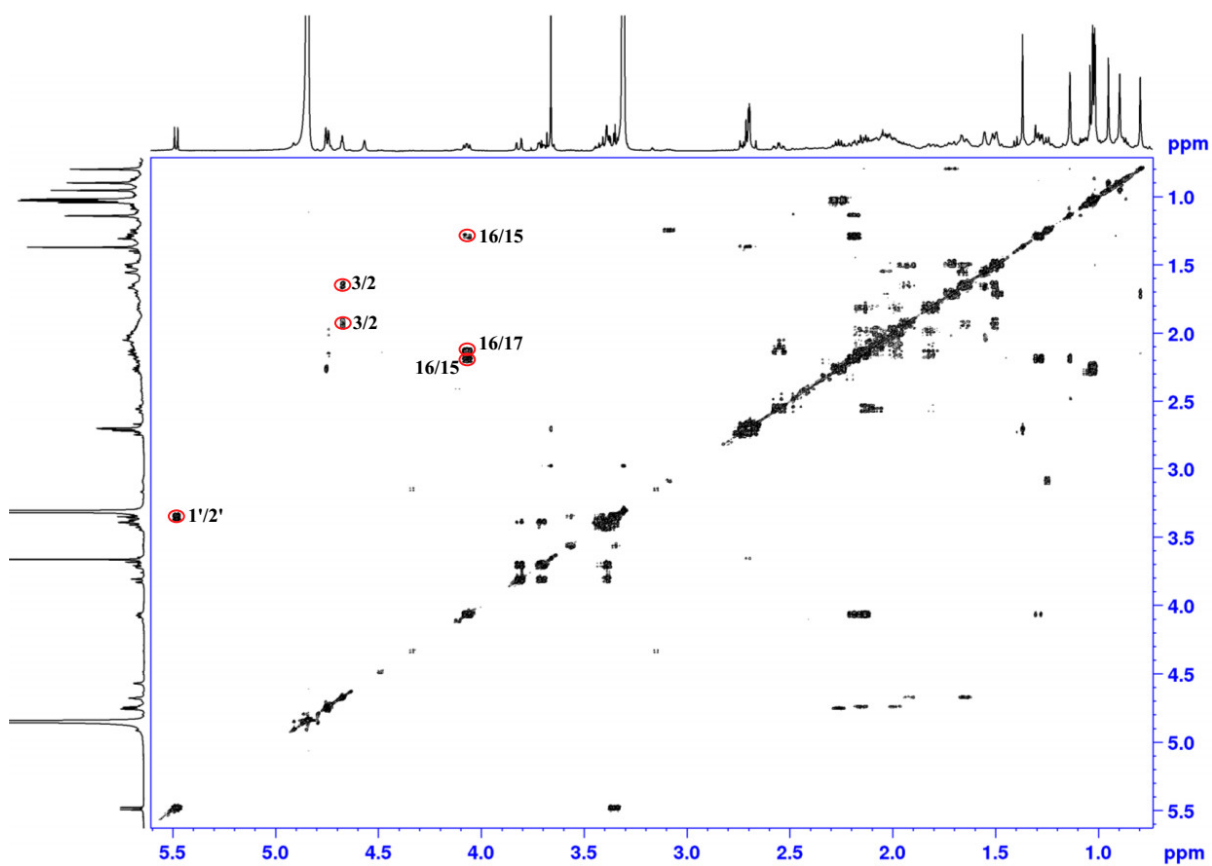
grupe određen je na osnovu HMBC korelacija anomernog protona H-1' ( $\delta_H$  5,48, d,  $J=8,1$  Hz) sa C-21 ( $\delta_C$  177,3). Hemijsko pomeranje C-20 ( $\delta_C$  48,3) je identično kao kod jedinjenja **28** i samim tim u saglasnosti sa istom relativnom konfiguracijom C-20 ( $\alpha$ -COOglc). Na osnovu svih spektralnih podataka utvrđeno je da jedinjenje **29** predstavlja 21-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozid 16 $\alpha$ -hidroksi-3 $\alpha$ -(5'-*O*-metil-3'-hidroksi-3'-metilglutariloksi)-24-metilen-21-lanost-8-enske kiseline, jedinjenje koje do sada nije opisano u literaturi, nazvano fomitozid N.



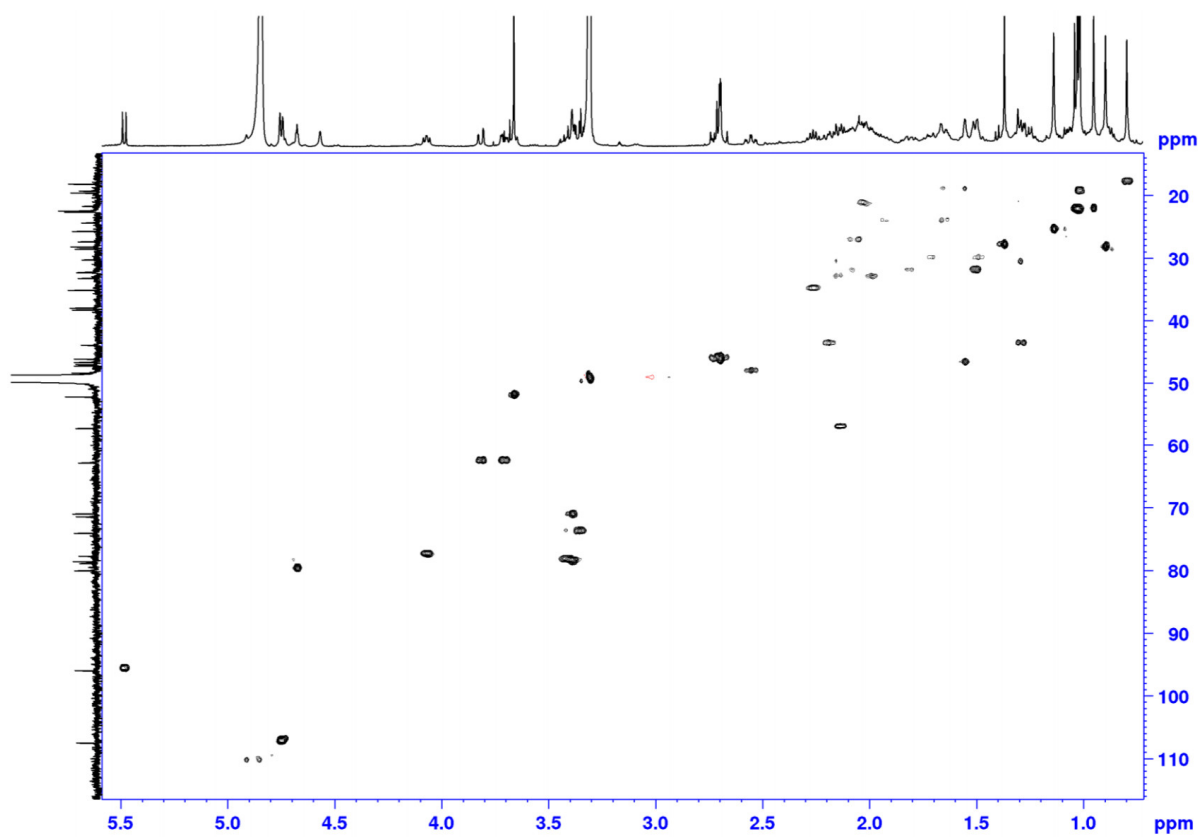
Slika 103.  $^1\text{H}$  NMR spektar (500 MHz, metanol- $d_4$ ) jedinjenja **29**.



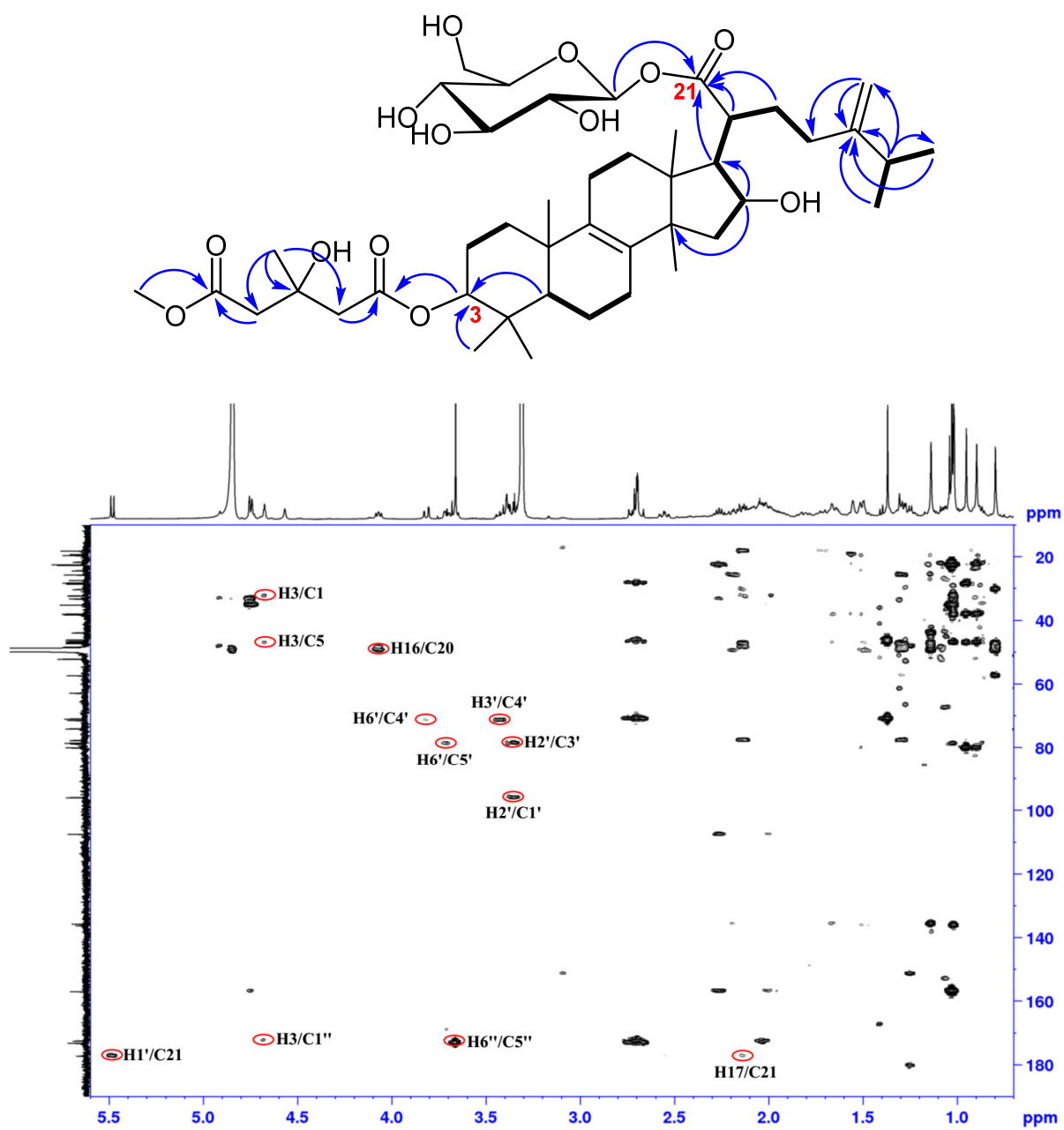
Slika 104.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (125 MHz, metanol- $d_4$ ) i struktura jedinjenja **29**.



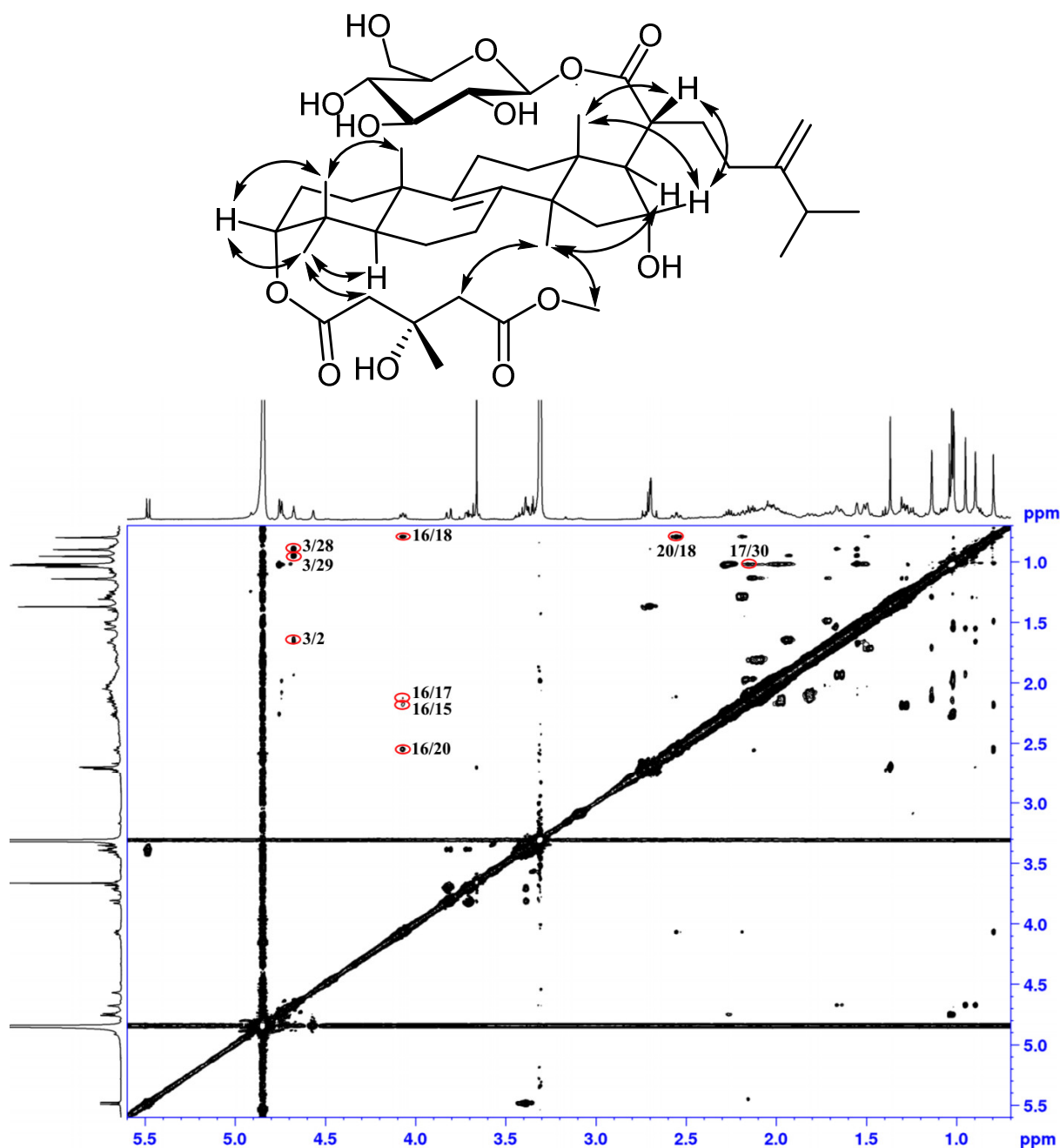
Slika 105. COSY spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 29.



Slika 106. HSQC spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 29.



Slika 107. HMBC korelacije i spektar (metanol-*d*<sub>4</sub>) jedinjenja 29.

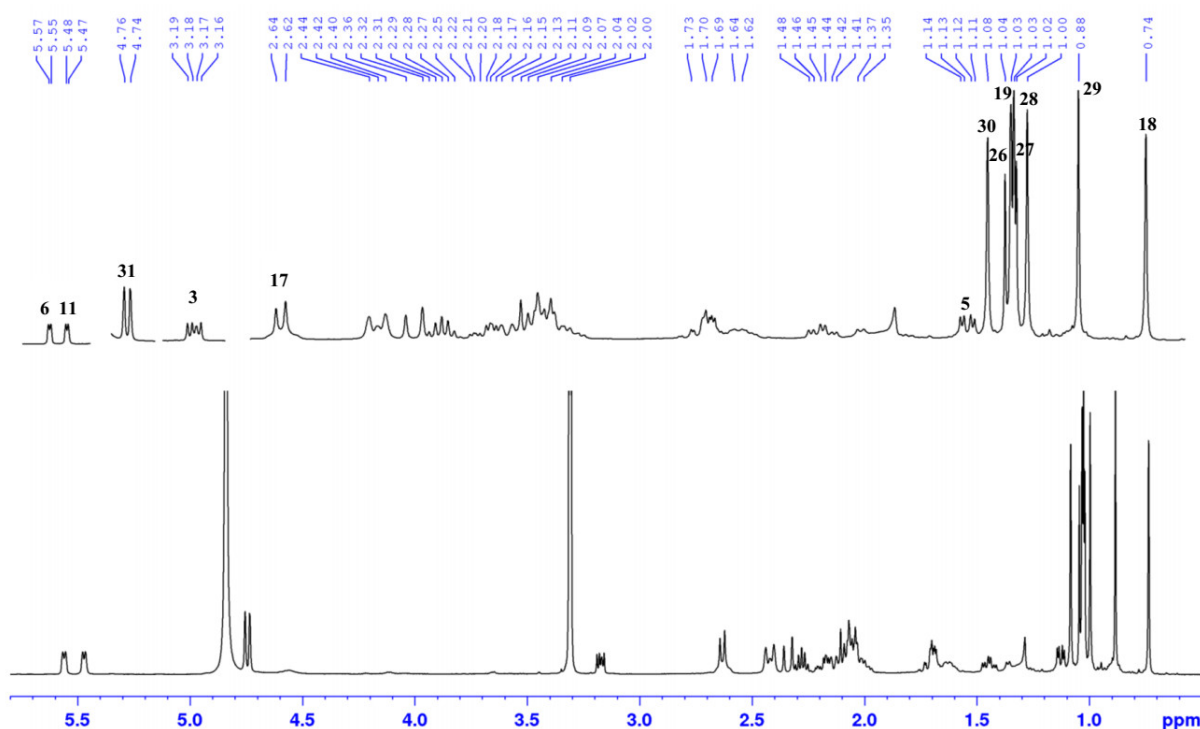


Slika 108. NOESY korelacije i spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 29.

### 2.3.30. Određivanje strukture 3 $\beta$ -hidroksi-24-metilen-16-okso-21-lanost-7,9(11)-dientske kiseline – poliporenske kiseline M (30)

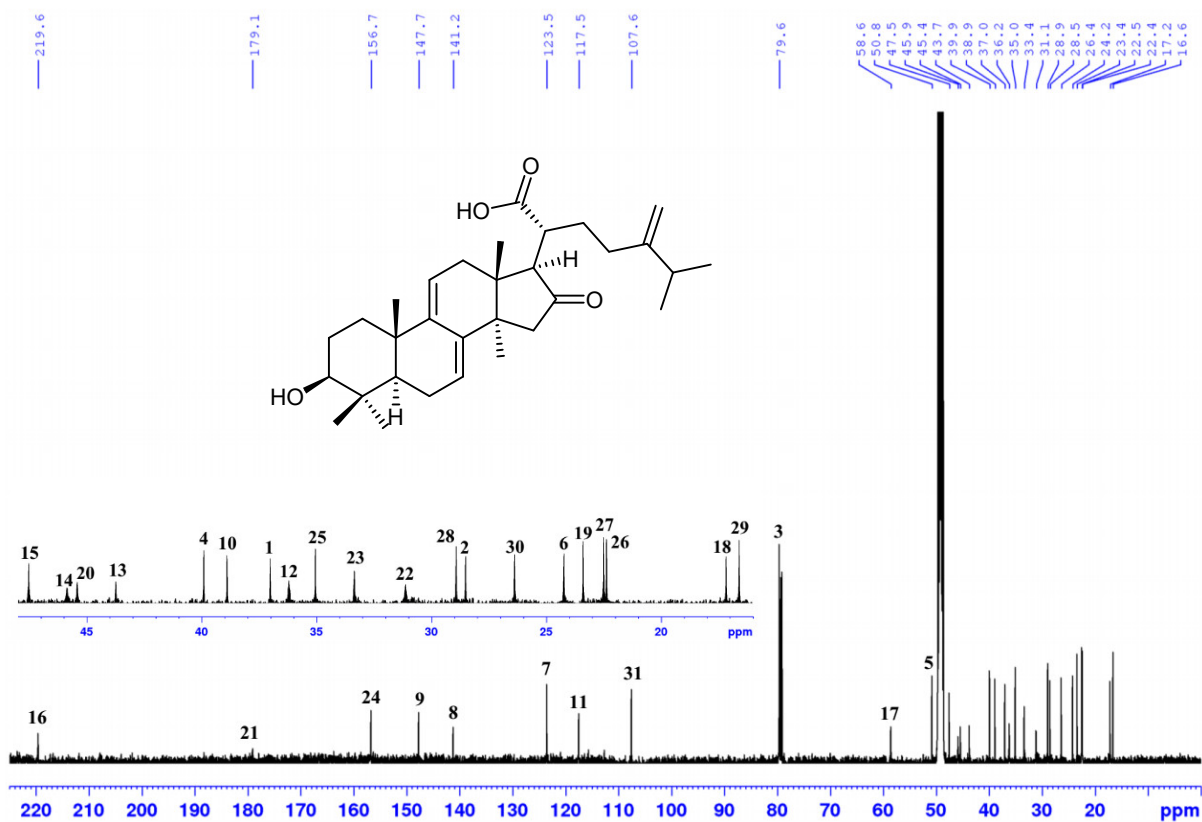
Jedinjenje 30 izolovano je kao bela kristalna supstanca. Molekulska formula  $C_{31}H_{46}O_4$ , dobijena na osnovu molekulskog jona  $[M]^-$  na  $m/z$  482,3378 vrednosti iz HR-ESI-MS spektra, identična je kao kod poliporenske kiseline C (jedinjenje 9), koja predstavlja jednu od najzastupljenijih kiselina u gljivi *F. betulina*.  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR podaci (Tabela 20) su dobijeni na osnovu analogije sa NMR podacima sličnih jedinjenja, kao i primenom 2D NMR tehnika (Slike 109-114). Konjugovani 7,9(11)-dienski sistem potvrđen je na osnovu signala dva olefinska protona ( $\delta_H$  5,47 i 5,56, oba d,  $J=8,1$  Hz, H-11 i H-6, redom) u  $^1H$  NMR spektru (Slika 109), kao i na osnovu korelacija H-6/C-5, C-7, C-8, C-10, H-11/C-8, C-10, C-12, C-13, C-19 i H-12/C-9, C-10, C-11, C-18 u HMBC spektru (Slika 113). Jedinjenje 30 ima  $\Delta^{24(31)}$  egzometilensku dvostruku vezu ( $\delta_H$  4,74 i 4,76, brs,  $\delta_C$  107,4, H<sub>2</sub>-31) i 21-karboksilnu kiselinu ( $\delta_C$  179,1), koje su identifikovane pomoću HSQC spektra (Slika 112), a položaj im je određen na osnovu HMBC korelacija H<sub>2</sub>-31/C-23, C-24, C-25, C-17 i H-22/C-

21 (**Slika 113**). U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru (**Slika 110**) uočava se signal keto grupe ( $\delta_{\text{C}}$  219,6) i oksigenovane metinske grupe ( $\delta_{\text{C}}$  79,6). Osnovna razlika između jedinjenja **30** i poliporenske kiseline **C (9)** je u položaju funkcionalnih grupa na lanostanskom skeletu. HMBC korelacija keto karbonila sa H-15, H-17 i H-20 ukazuje na 16-keto položaj, dok je položaj oksimetinske grupe C(3)H-OH određen na osnovu COSY korelacija H-3/H<sub>2</sub>-2 i HMBC korelacija H-3/C-28 i C-29 (**Slike 111 i 113**). Položaj funkcionalnih grupa je obrnut u odnosu na poliporensku kiselinu **C (9)**. Obrazac kuplovanja protona H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  3,18, dd,  $J_1=10,8$ ;  $J_2=5,6$  Hz) je tipičan za  $3\alpha$ -H relativnu konfiguraciju, što je potvrđeno i na osnovu NOESY korelacija H-3 sa  $\alpha$ -orijentisanim H-5 i H-29 (**Slika 114**). Hemijsko pomeranje C-20 ( $\delta_{\text{C}}$  45,4) je u saglasnosti sa pomeranjem istog atoma kod derivata 16-okso-lanosta-21-ske kiseline sa  $\alpha$ -orijentisanom karboksilnom grupom.<sup>43</sup> Prema tome, jedinjenje **30** je  $3\beta$ -hidroksi-24-metilen-16-okso-21-lanost-7,9(11)-dienska kiselina, jedinjenje koje do sada nije opisano u literaturi, nazvano poliporenska kiselina M.

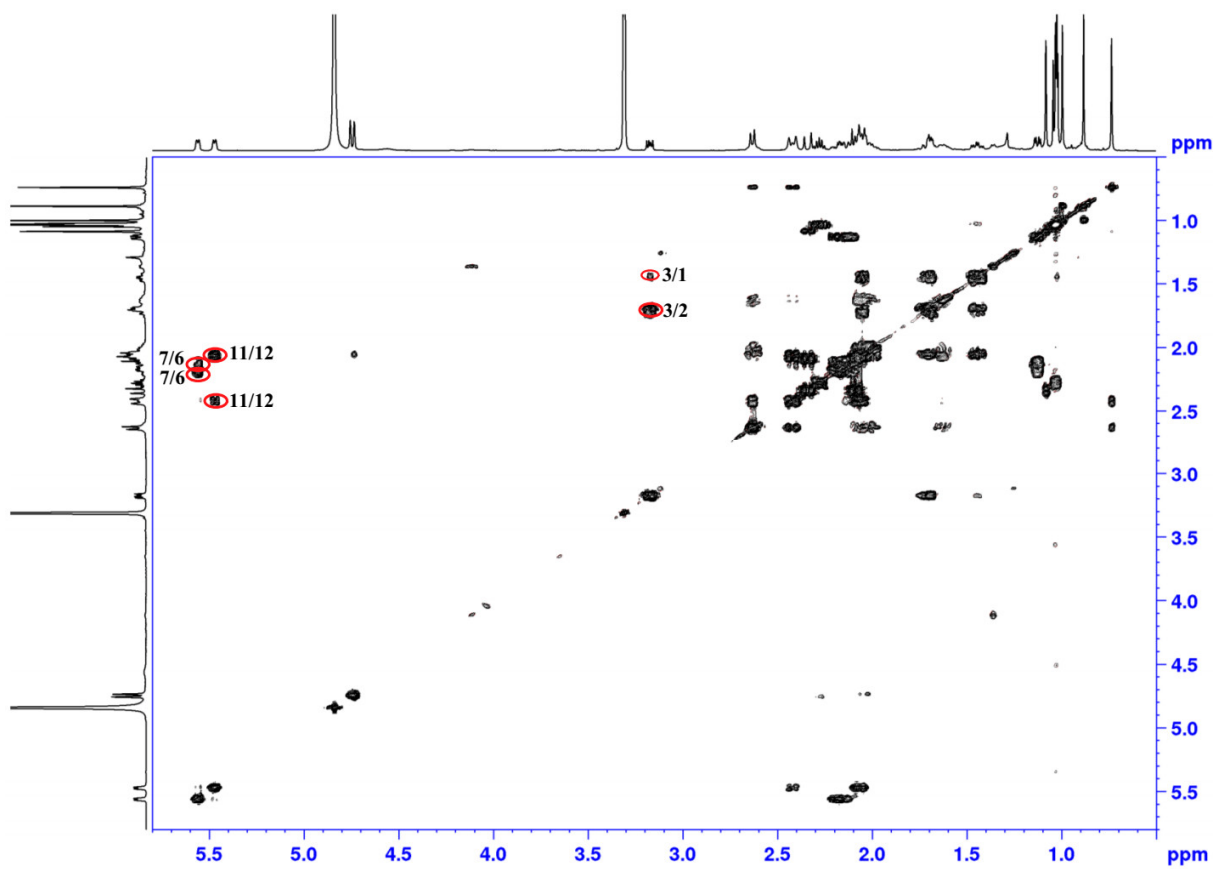


**Slika 109.**  $^1\text{H}$  NMR spektar (500 MHz, smeša metanol- $d_4$  i hloroform- $d$ ) jedinjenja **30**.

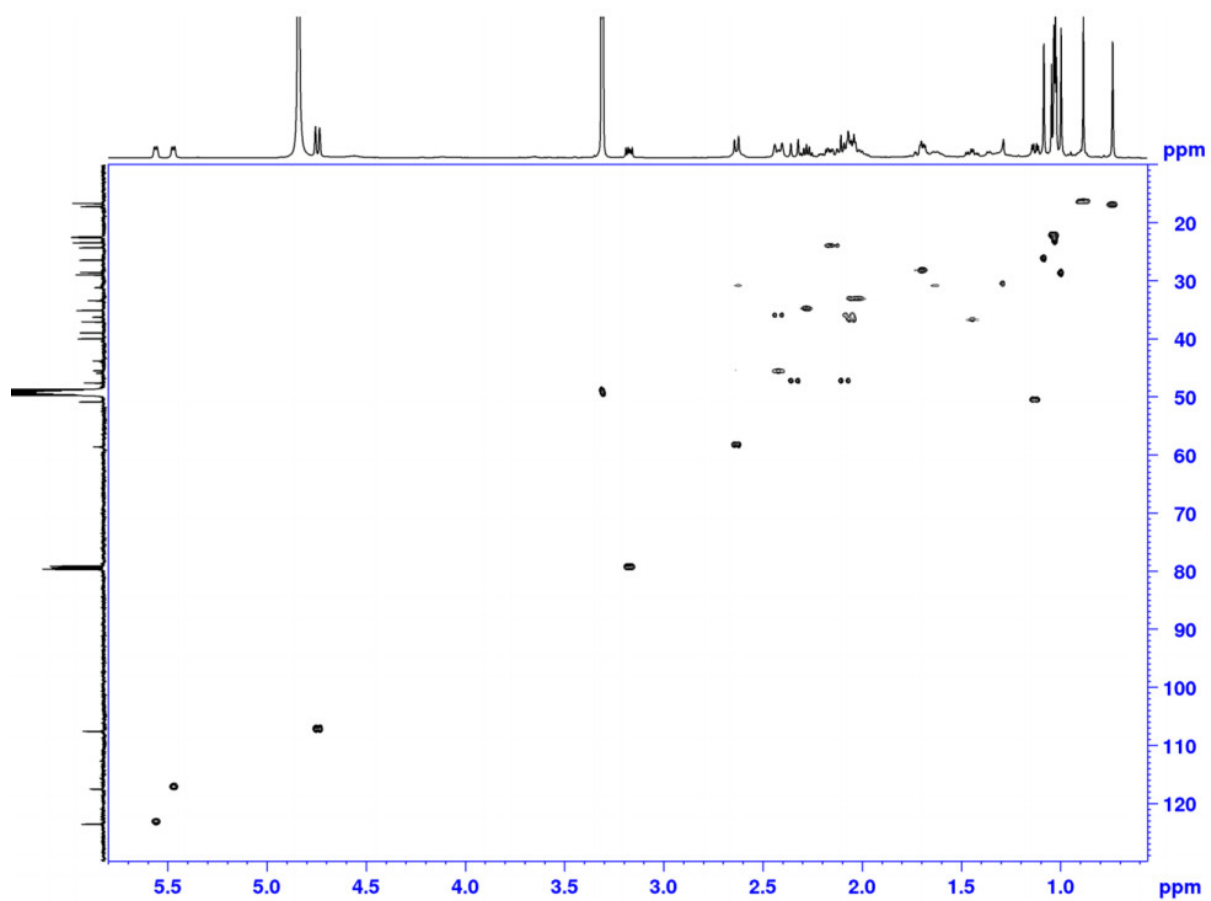




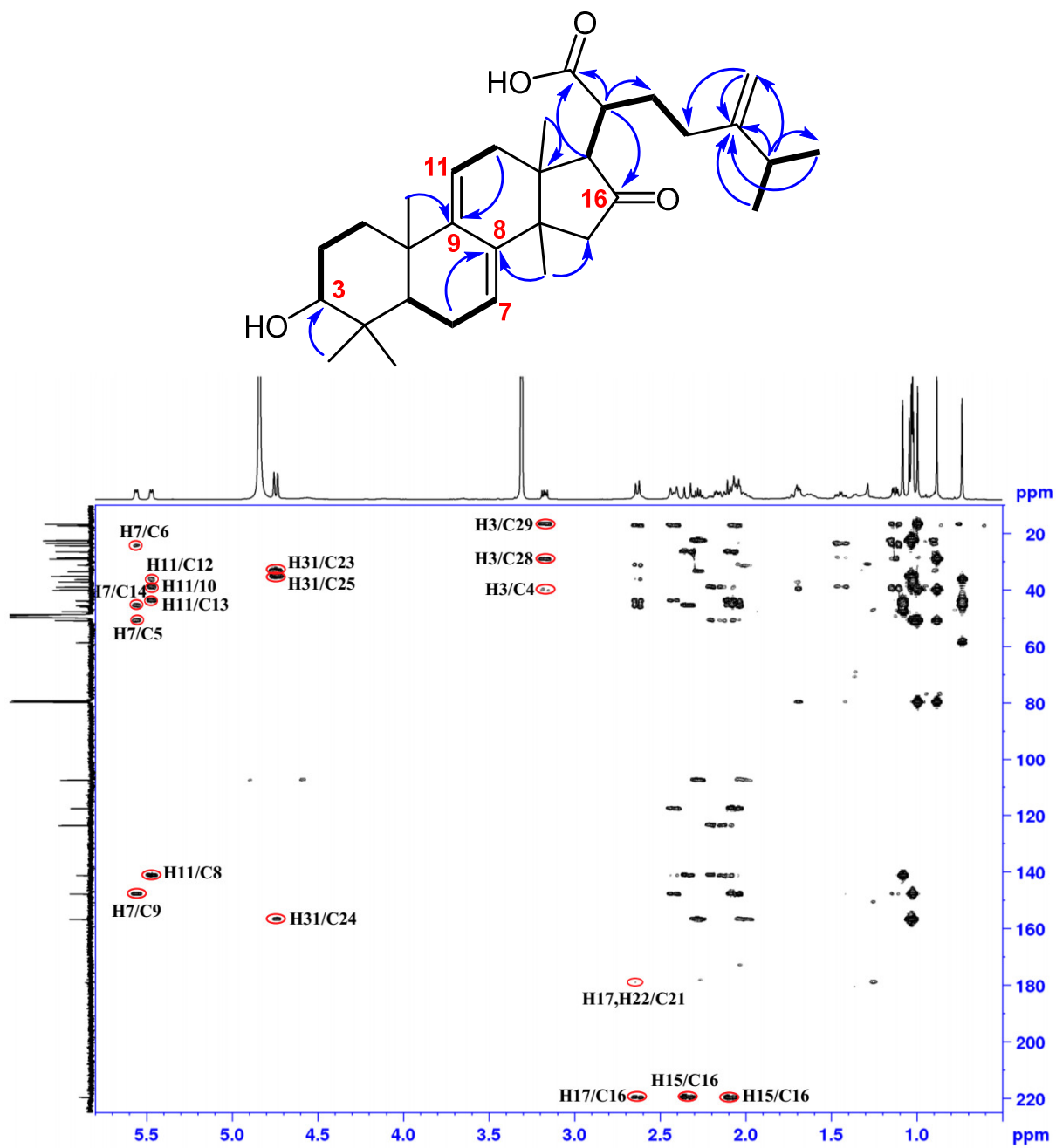
Slika 110.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (125 MHz, smeša metanol- $d_4$  i hloroform- $d$ ) jedinjenja 30.



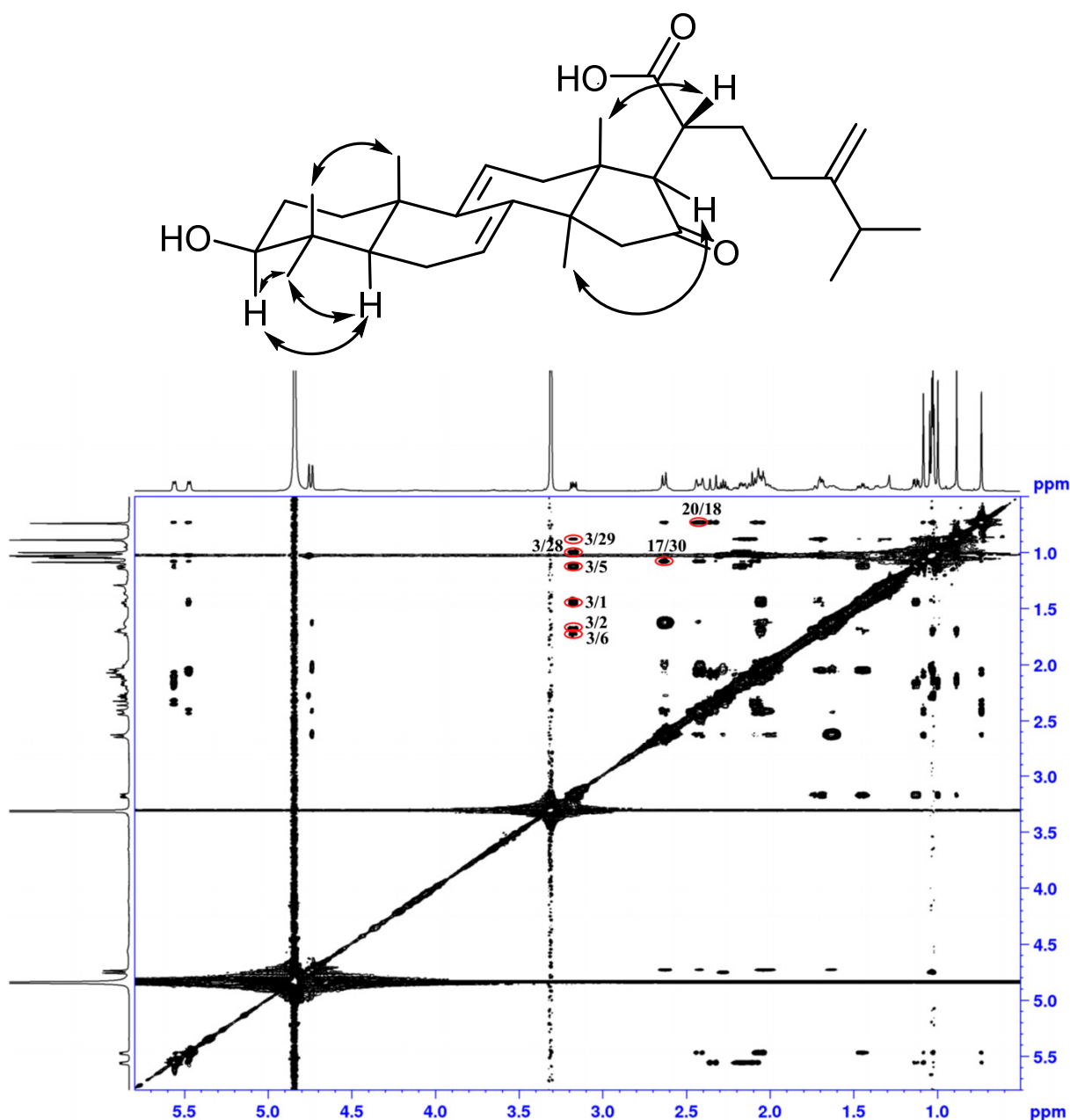
Slika 111. COSY spektar (smeša metanol- $d_4$  i hloroform- $d$ ) jedinjenja 30.



Slika 112. HSQC spektar (smeša metanol- $d_4$  i hloroform- $d$ ) jedinjenja 30.



Slika 113. HMBC korelacije i spektar (smeša metanol-*d*<sub>4</sub> i hloroform-*d*) jedinjenja 30.

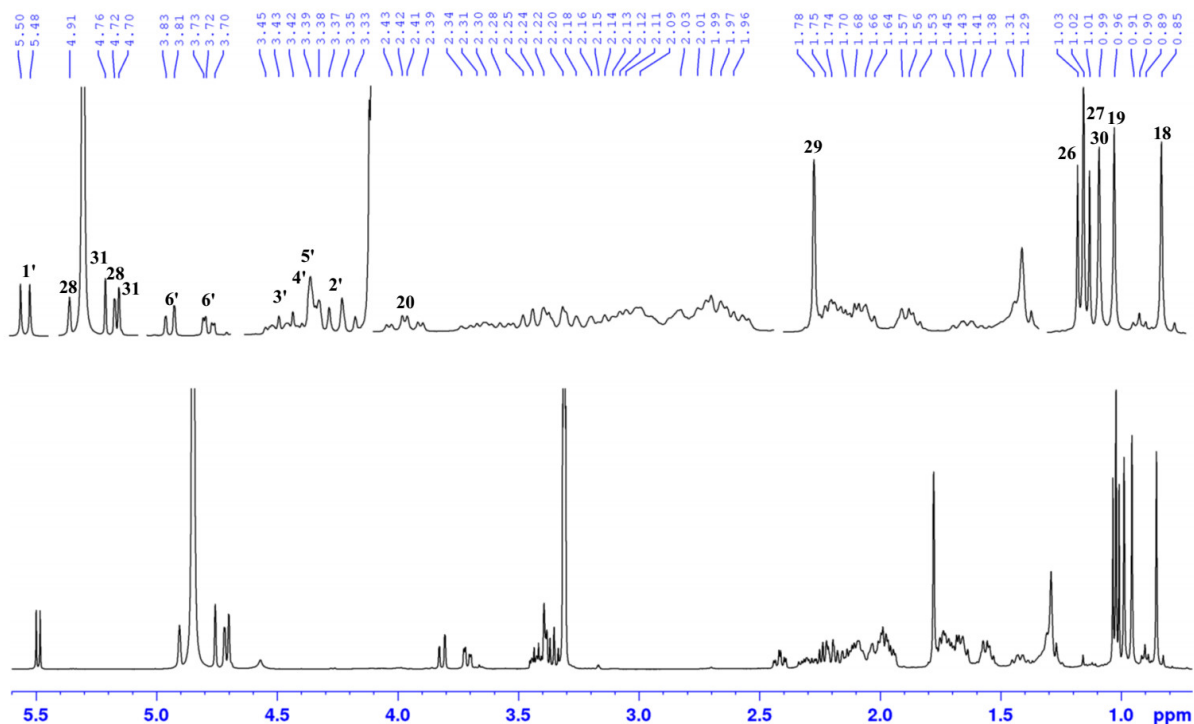


Slika 114. NOESY korelacije i spektar (smeša metanol- $d_4$  i hloroform- $d$ ) jedinjenja **30**.

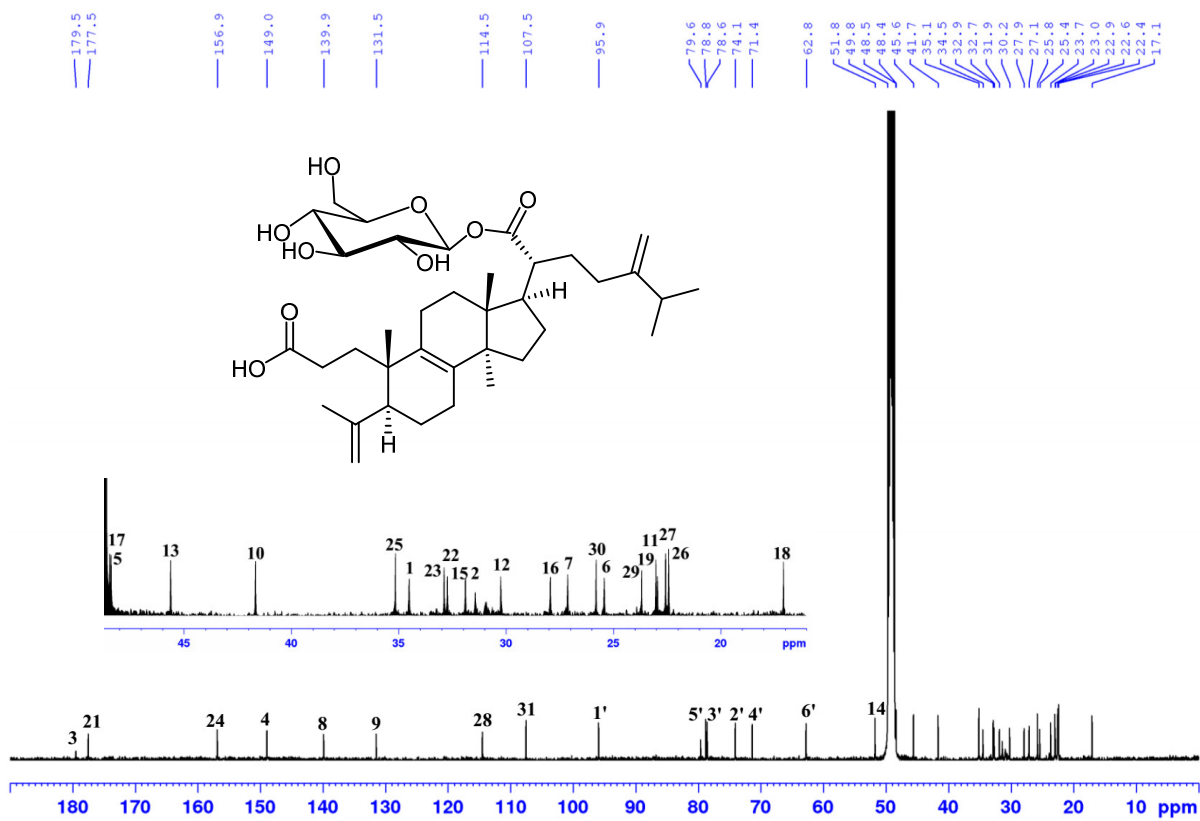
### 2.3.31. Određivanje strukture 21-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozida 3,4-*seco*-24-metilen-3,21-lanost-4(28),8-dijske dikeseline – fomitozida O (**31**)

Jedinjenje **31** izolovano je kao bela amorfná supstanca. Molekulska formula  $C_{37}H_{58}O_9$  dobijena je na osnovu deprotonovanog molekuskog jona  $[M-H]^-$  na  $m/z$  645,4006 vrednosti iz HR-ESI-MS spektra. U  $^{13}C$  NMR spektru (Slika 116) nalazi se 37 signala, od kojih 31, uključujući jedan estarski ( $\delta_C$  177,5, C-21), jedan karboksilni ( $\delta_C$  179,5, C-3), tetrasupstituisane olefinske ugljenike ( $\delta_C$  131,5 i 139,9) i ugljenike iz dve egzometilenske dvostruke veze ( $\delta_C$  156,9; 107,5 i 149,0; 114,5), pripada osnovnom lanostanskom skeletu. Preostali signali potiču od heksozne jedinice, identifikovane kao  $\beta$ -D-glukoza. Uočava se velika sličnost  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR podataka (Tabela 20) aglikonskog dela jedinjenja **31** sa NMR podacima prethodno opisanih poznatih jedinjenja **15** i **16**, na osnovu čega je zaključeno da se radi o 3,4-*seco*-24-metilen-lanostanskom triterpenu. Ovo je potvrđeno detaljnom analizom 1D i 2D NMR spektara (Slike 115-120). HMBC korelacije H-1, H-2/C-3 (Slika 119) ukazuju na C-3 položaj karboksilne grupe, na osnovu čega je potvrđeno da se radi o 3,4-*seco*-lanostanskoj strukturi. Položaj drugog (estarskog) karbonilnog ugljenika C-21 određen je na osnovu HMBC korelacija H-

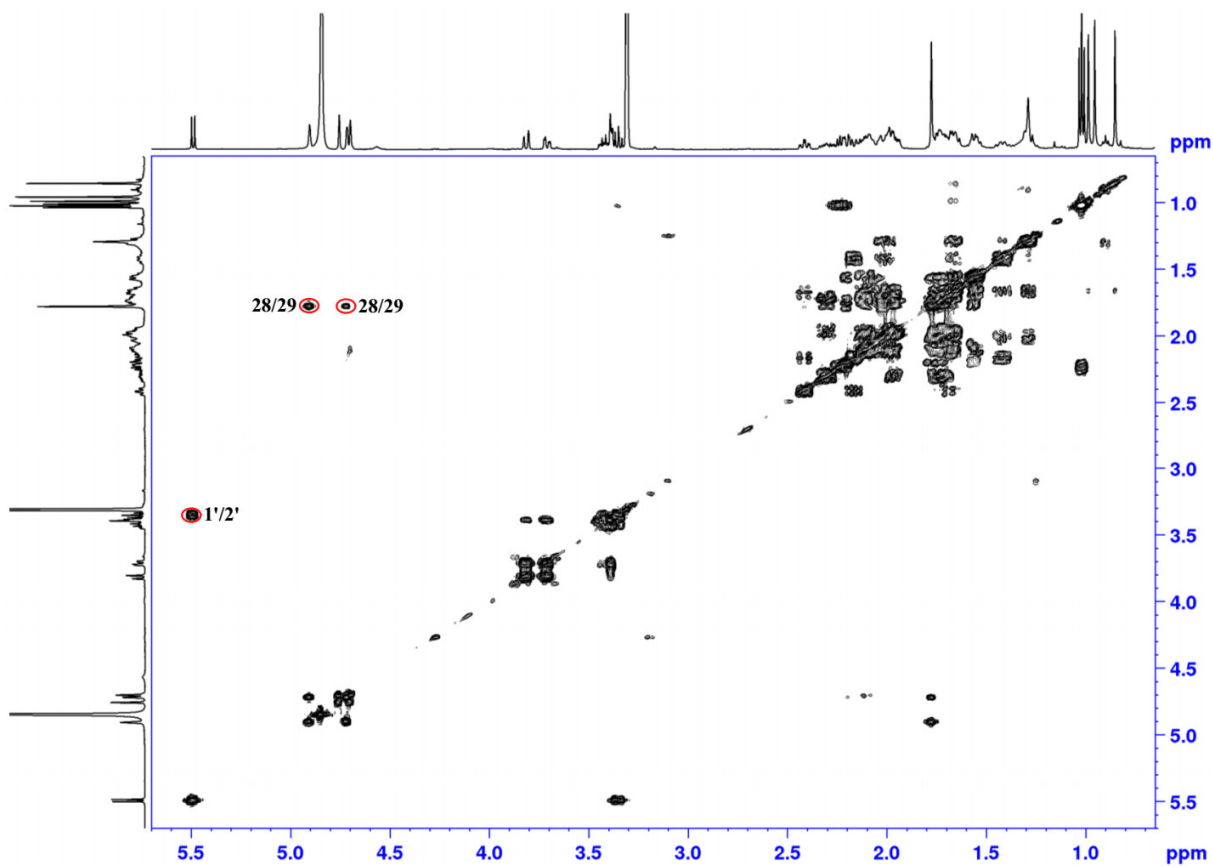
20/C-21. Većina signala iz glukoze u  $^1\text{H}$  NMR spektru (**Slika 115**) nalazi se u oblasti od  $\delta_{\text{H}}$  3,0-5,5 ppm, dok se signal anomernog protona (H-1'), tipičan za  $\beta$ -D-glukozu, nalazi na  $\delta_{\text{H}}$  5,50 ( $J=8,1$  Hz). Glukozna jedinica je estarskom vezom povezana za C-21 atom, identično kao kod jedinjenja **27** – **29**, što je utvrđeno na osnovu korealacije H-1' sa C-21 u HMBC spektru (**Slika 119**).  $\beta$ -D-glukoza je potvrđena HPLC analizom, nakon hidrolize jedinjenja **31** i poređenjem retencionih vremena dobijenog proizvoda sa standardom. Relativne konfiguracije C-17 i C-20 su iste kao kod jedinjenja **27-29**, što je zaključeno na osnovu korelacija H-17/H<sub>3</sub>-30 i H-20/H<sub>3</sub>-18 iz NOESY spektra (**Slika 120**). Na osnovu svega navedenog zaključuje se da jedinjenje **31** predstavlja 21-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozid 3,4-*seco*-24-metilen-3,21-lanost-4(28),8-dijske dikeseline, novi prirodni proizvod, nazvan fomitozid O. Jedinjenje **31** je prvi primer 21-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozida 3,4-*seco*-24-metilenlanostanskog triterpena opisanog u literaturi.



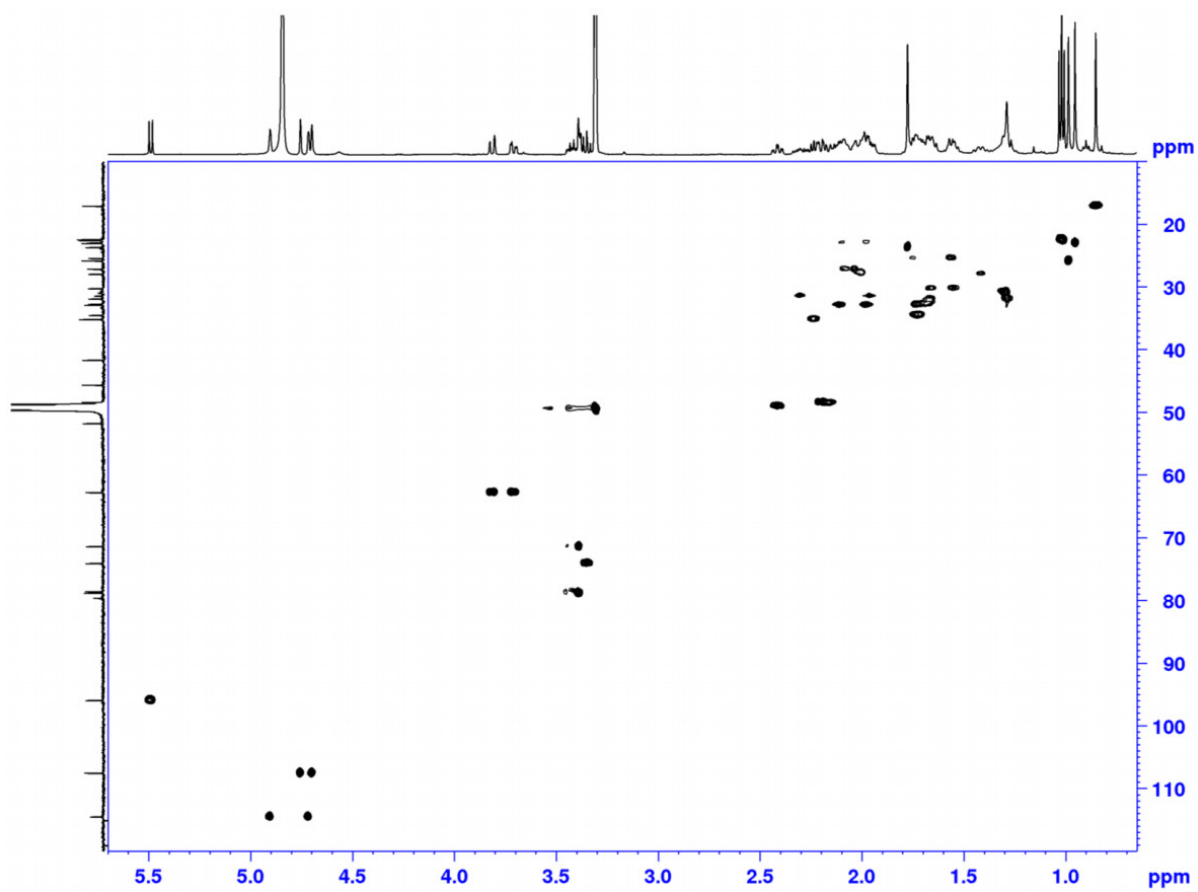
**Slika 115.**  $^1\text{H}$  NMR spektar (500 MHz, metanol- $d_4$ ) jedinjenja **31**.



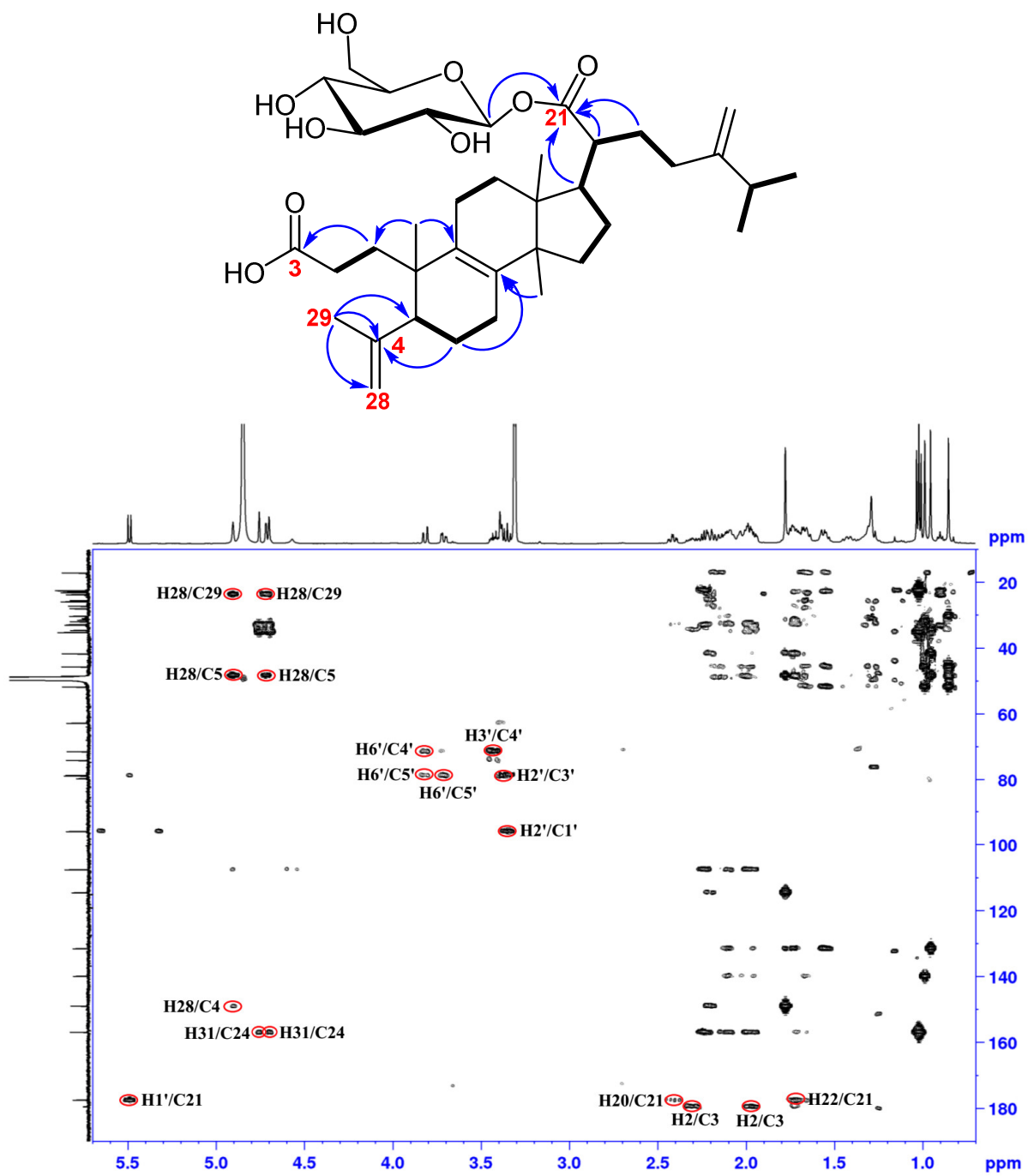
Slika 116.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (125 MHz, metanol- $d_4$ ) i struktura jedinjenja 31.



Slika 117. COSY spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 31.

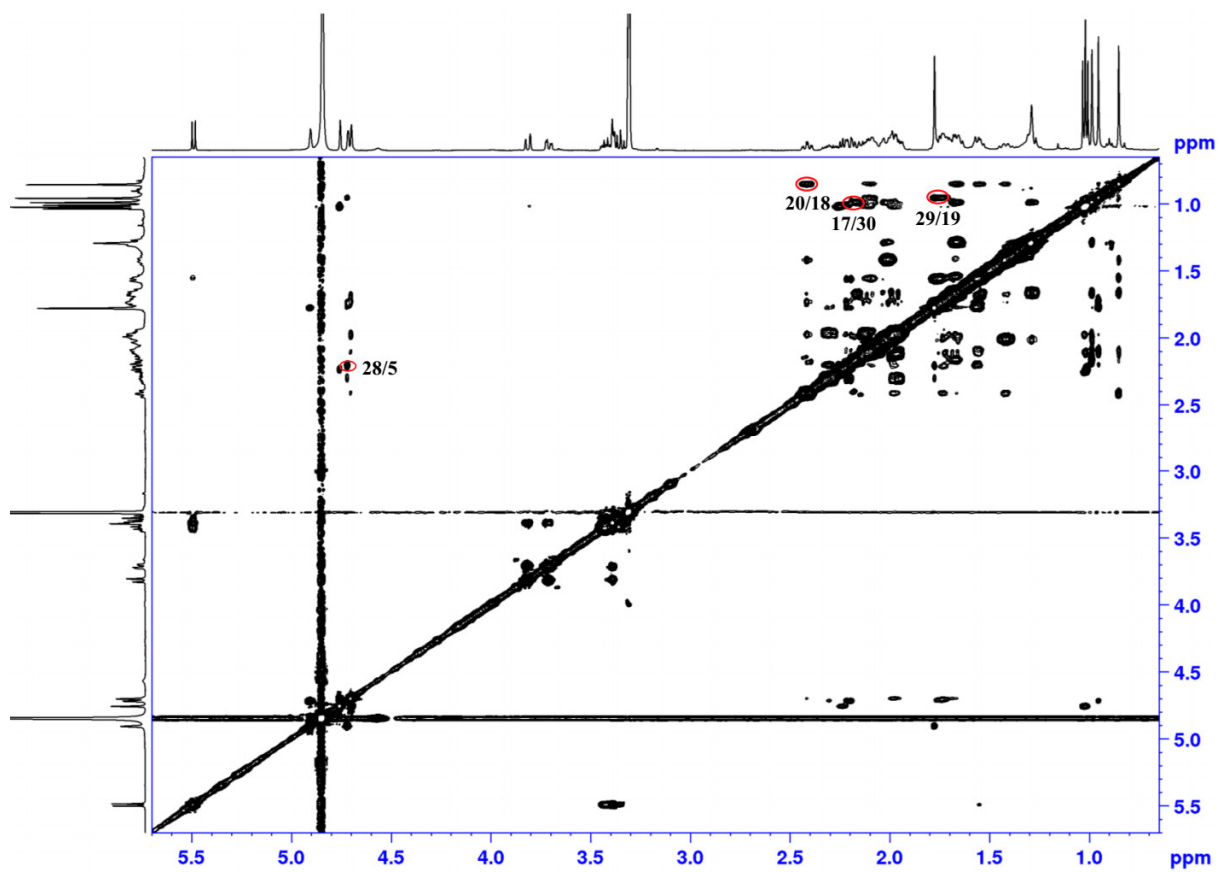
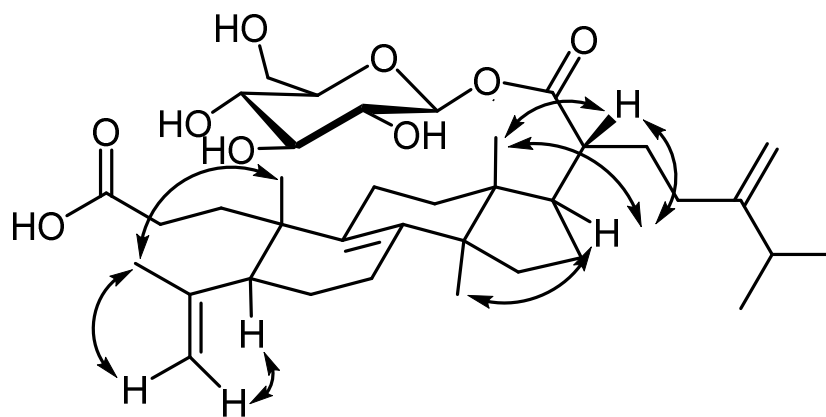


Slika 118. HSQC spektar (metanol- $d_4$ ) jedinjenja 31.



Slika 119. HMBC korelacije i spektar (metanol-*d*<sub>4</sub>) jedinjenja 31.





Slika 120. NOESY korelacije i spektar (metanol-*d*<sub>4</sub>) jedinjenja 31.

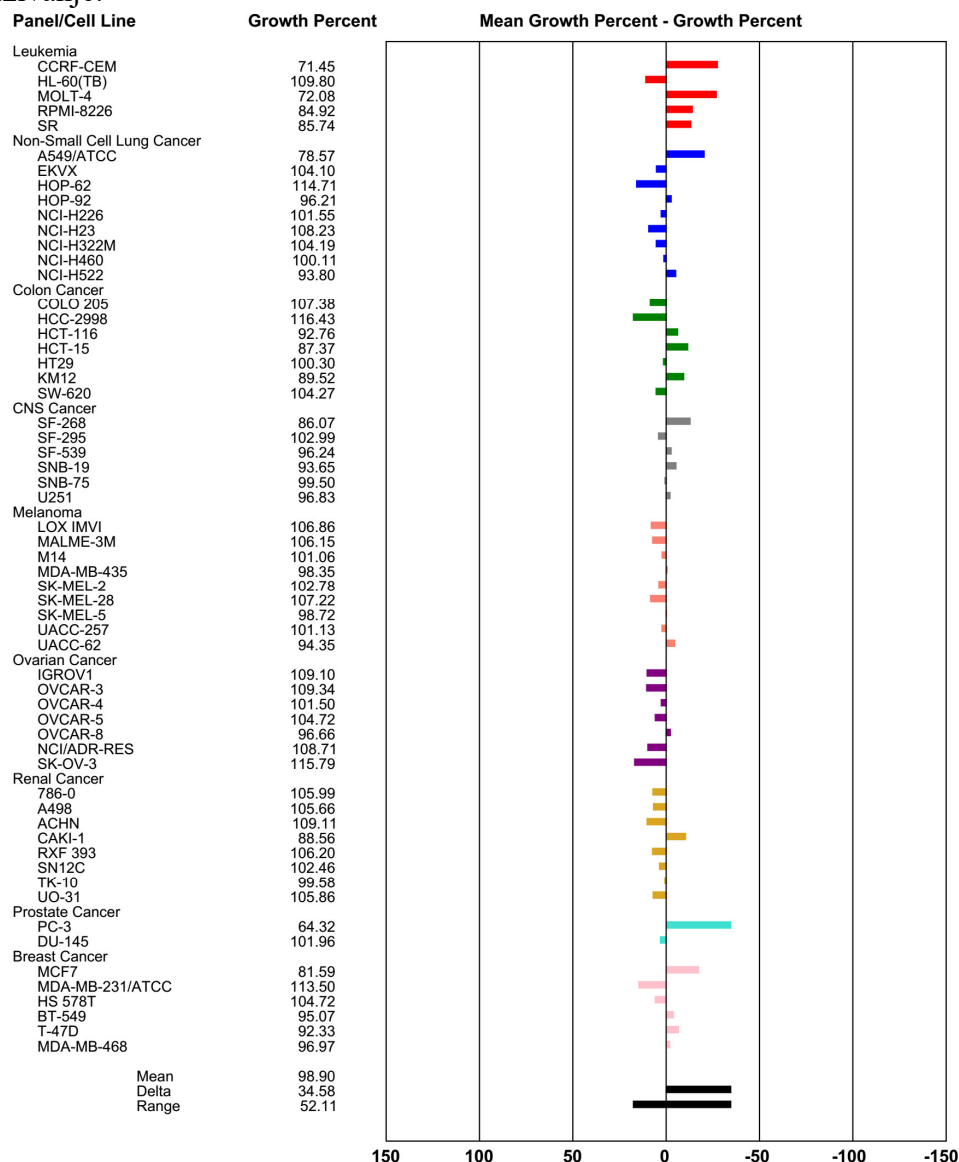
**Tabela 20.**  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) i  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) podaci za jedinjenja **28**, **29**, **30** i **31**.

| C/H         | <b>28<sup>a</sup></b> |   | <b>29<sup>a</sup></b> |                               | <b>30<sup>d</sup></b> |                               | <b>31<sup>a</sup></b> |   |
|-------------|-----------------------|---|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|---|
|             | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)           | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J in Hz) | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J in Hz) | $\delta_{\text{C}}$   | $\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)           |
| 1           | 36,6                  | 1,26m; 1,76 m                           | 32,2                  | 1,48-1,52 (2H) m              | 37,0                  | 1,45 m; 2,06 m                | 34,5                  | 1,70-1,74 (2H) m                        |
| 2           | 25,3                  | 1,64-1,68 (2H) m                        | 24,3                  | 1,65 m; 1,93 m                | 28,6                  | 1,68-1,72 (2H) m              | 31,9                  | 1,97 m; 2,31 m                          |
| 3           | 82,6                  | 4,45 dd (8,6; 7,5)                      | 80,0                  | 4,67 brs                      | 79,6                  | 3,18 dd (10,8; 5,6)           | 179,5                 | -                                       |
| 4           | 38,3                  | -                                       | 37,9                  | -                             | 39,9                  | -                             | 149,0                 | -                                       |
| 5           | 52,1                  | 1,16 m                                  | 47,0                  | 1,54 m                        | 50,8                  | 1,13 dd (11,5; 4,0)           | 48,4                  | 2,18 m                                  |
| 6           | 19,3                  | 1,55 m; 1,72 m                          | 19,2                  | 1,55 m; 1,66 m                | 24,2                  | 2,14-2,16 (2H) m              | 25,4                  | 1,56 m; 1,75 m                          |
| 7           | 27,7                  | 2,05-2,10 (2H) m                        | 27,3                  | 2,05 m; 2,09 m                | 123,5                 | 5,56 d (6,1)                  | 27,1                  | 2,04 m; 2,09 m                          |
| 8           | 135,9                 | -                                       | 135,7                 | -                             | 141,2                 | -                             | 139,9                 | -                                       |
| 9           | 135,9                 | -                                       | 136,3                 | -                             | 147,7                 | -                             | 131,5                 | -                                       |
| 10          | 39,0                  | -                                       | 38,2                  | -                             | 38,9                  | -                             | 41,7                  | -                                       |
| 11          | 21,7                  | 1,98-2,01 (2H) m                        | 21,7                  | 2,00-2,04 (2H) m              | 117,5                 | 5,47 d (6,1)                  | 22,9                  | 1,97 m; 2,10 m                          |
| 12          | 30,2                  | 1,44 m; 1,71 m                          | 30,2                  | 1,49 m; 1,71, m               | 36,2                  | 2,06 m; 2,42 m                | 30,2                  | 1,55 m; 1,66 m                          |
| 13          | 47,2                  | -                                       | 47,2                  | -                             | 43,7                  | -                             | 45,6                  | -                                       |
| 14*         | 49,2                  | -                                       | 49,3*                 | -                             | 45,8                  | -                             | 51,8                  | -                                       |
| 15          | 43,9                  | 1,29 m; 2,19 m                          | 43,9                  | 1,28 m; 2,19 m                | 47,5                  | 2,09 m; 2,34 m                | 31,9                  | 1,29 m; 1,66 m                          |
| 16          | 77,7                  | 4,06 dd (9,0; 6,4)                      | 77,7                  | 4,07 dd (8,8; 6,4)            | 219,6                 | -                             | 27,9                  | 1,42 m; 2,00 m                          |
| 17          | 57,4                  | 2,13 m                                  | 57,3                  | 2,14 m                        | 58,6                  | 2,63 m                        | 48,5                  | 2,16 m                                  |
| 18          | 18,1                  | 0,79 s                                  | 18,1                  | 0,80 s                        | 17,2                  | 0,74 s                        | 17,1                  | 0,85 s                                  |
| 19          | 17,1                  | 1,03 s                                  | 19,5                  | 1,02 s                        | 23,4                  | 1,03 s                        | 23,0                  | 0,96 s                                  |
| 20          | 48,3                  | 2,54 td (11,4; 3,0)                     | 48,3                  | 2,55 td (11,4; 3,0)           | 45,4                  | 2,42 m                        | 49,8*                 | 2,41 td (11,0; 3,2)                     |
| 21          | 177,2                 | -                                       | 177,3                 | -                             | 180,0                 | -                             | 177,5                 | -                                       |
| 22          | 32,2                  | 1,81 m; 2,08 m                          | 32,2                  | 1,81 m; 2,08 m                | 31,1                  | 1,63 m; 2,63 m                | 32,7                  | 1,67 m; 1,72 m                          |
| 23          | 33,2                  | 1,98 m; 2,14 m                          | 33,2                  | 1,99 m; 2,15 m                | 33,4                  | 2,01-2,05 (2H) m              | 32,9                  | 1,98 m; 2,12 m                          |
| 24          | 157,0                 | -                                       | 157,0                 | -                             | 156,7                 | -                             | 156,9                 | -                                       |
| 25          | 35,1                  | 2,26 m                                  | 35,1                  | 2,02 m                        | 35,1                  | 2,28 m                        | 35,1                  | 2,23 m                                  |
| 26          | 22,4                  | 1,03 d (6,4)                            | 22,4                  | 1,04 d (6,4)                  | 22,4                  | 1,04 d (6,4)                  | 22,4                  | 1,03 d (6,4)                            |
| 27          | 22,6                  | 1,02 d (6,4)                            | 22,6                  | 1,03 d (6,4)                  | 22,5                  | 1,03 d (6,4)                  | 22,6                  | 1,01 d (6,4)                            |
| 28          | 28,6                  | 0,89 s                                  | 28,5                  | 0,90 s                        | 28,9                  | 1,00 s                        | 114,5                 | 4,72 brs;<br>4,91 brd                   |
| 29          | 19,7                  | 0,91 s                                  | 22,4                  | 0,95 s                        | 16,6                  | 0,88 s                        | 23,7                  | 1,78 s                                  |
| 30          | 25,6                  | 1,12 s                                  | 25,7                  | 1,14 s                        | 26,2                  | 1,08 s                        | 25,8                  | 0,99 s                                  |
| 31          | 107,5                 | 4,74 brs;<br>4,75 brs                   | 107,5                 | 4,74 brs;<br>4,76 brs         | 107,4                 | 4,74 brs;<br>4,76 brs         | 107,5                 | 4,70 brs;<br>4,76 brs                   |
| 21-<br>OGlc |                       |   |                       |                               |                       |                               |                       |   |
| 1'          | 96,0                  | 5,48 d (8,1)                            | 96,0                  | 5,48 d (8,1)                  |                       |                               | 95,9                  | 5,50 d (8,1)                            |
| 2'          | 74,1                  | 3,35 m                                  | 74,0                  | 3,56 m                        |                       |                               | 74,1                  | 3,35 m                                  |
| 3'          | 78,6                  | 3,43 m                                  | 78,6                  | 3,41 m                        |                       |                               | 78,6                  | 3,42 m                                  |
| 4'          | 71,4                  | 3,39 m                                  | 71,4                  | 3,38 m                        |                       |                               | 71,4                  | 3,39 m                                  |
| 5'          | 78,8                  | 3,38 m                                  | 78,8                  | 3,89 m                        |                       |                               | 78,8                  | 3,39 m                                  |
| 6'          | 62,8                  | 3,70 dd<br>(11,8; 2,5)<br>3,81 d (11,8) | 62,8                  | 3,71 m<br>3,81 d (11,8)       |                       |                               | 62,8                  | 3,71 dd<br>(11,8; 2,8)<br>3,82 d (11,8) |
| 3-<br>1''   | 173,0                 | -                                       | 172,5                 | -                             |                       |                               |                       |   |
| 2''         | 21,3                  | 2,03 s                                  | 46,6                  | 2,66-2,70 (2H) m              |                       |                               |                       |   |
| 3''         |                       |   | 71,0                  | -                             |                       |                               |                       |   |
| 4''         |                       |   | 46,1                  | 2,68-2,72 (2H) m              |                       |                               |                       |   |
| 5''         |                       |   | 173,2                 | -                             |                       |                               |                       |   |
| 6''         |                       |   | 52,1                  | 3,66 s                        |                       |                               |                       |   |
| 7''         |                       |   | 28,2                  | 1,37 s                        |                       |                               |                       |   |

<sup>a</sup>Metanol-*d*<sub>4</sub>, <sup>b</sup>Metanol-*d*<sub>4</sub> i hloroform-*d*, \*očitan iz HSQC spektra

## 2.4. Biološke aktivnosti izolovanih jedinjenja

Triterpenske kiseline medicinskih gljiva imaju veliki potencijal kao mogući terapeutici, o čemu svedoči veliki broj naučnih radova povezanih sa biološkim aktivnostima ovih jedinjenja, kao i podaci o njihovoj upotrebi u tradicionalnoj medicini mnogih zemalja.<sup>13</sup> Detaljnim pregledom literature utvrđeno je da bi prvo izolovano jedinjenje (**3**) trebalo ispitati kao potencijalni antikancerogeni agens na velikom broju ćelijskih linija. Cilj eksperimenta je bio određivanje najosetljivije ćelijske linije na ovaj tip izolovanih triterpena sa lanostanskim skeletom (**Slika 121**). Na osnovu dobijenih rezultata, kao i prethodnog uvida u literaturne podatke, zaključeno je da neki od poznatih izolovanih derivata triterpena lanostanskog tipa pokazuju najbolju citotoksičnu aktivnost na ćelijama leukemije (HL-60) i adenokarcinoma pluća (A549) te su one poslužile kao model sistemi za dalje istraživanje.



**Slika 121.** Rezultati određivanja citotoksične aktivnosti jedinjenja **3** na različitim ćelijskim linijama.

### 2.4.1. Citotoksična aktivnost na ćelijama akutne promijelocitne leukemije

Citotoksična aktivnost izolovanih jedinjenja (**1-11** i **13-31**) ispitivana je na ćelijama promijelocitne leukemije HL-60. Jedinjenje **12** je naknadno izolovano i nije bilo deo ovog testa. Pored podatka o  $IC_{50}$  vrednosti za ispitivanje na određenom tipu ćelija, veoma je značajan i indeks selektivnosti, kojim se definiše razlika u delovanju nekog jedinjenja na bolesne i zdrave ćelije.

Ispitano je dejstvo izolovanih triterpena i na ćelijskim linijama MRC-5, kako bi se odredila njihova selektivnost prema zdravim ćelijama, preko indeksa selektivnosti (SI) testiranih jedinjenja. Cilj ovakvih istraživanja nije u pronalazanju jedinjenja koje je samo sposobno da ubije bolesne ćelije, već pronalazak jedinjenja koja će pokazati dobru aktivnost prema bolesnim ćelijama, a što manju na zdravim. Ovo je osnovni preduslov da bi se neko jedinjenje moglo razmatrati kao potencijalni lek.

**Tabela 21.** Citotoksična aktivnost izolovanih jedinjenja **1-31\*** (IC<sub>50</sub>, µM).

|                  | <b>HL-60</b>        | <b>A549</b>    | <b>MRC-5</b>   | <b>SI<sup>a</sup></b> |
|------------------|---------------------|----------------|----------------|-----------------------|
| <b>1</b>         | 31,53 ± 2,24        | 61,83 ± 2,13   | 41,91 ± 2,36   | 1,33                  |
| <b>2</b>         | 75,22 ± 0,31        | 134,95 ± 1,64  | 95,33 ± 8,13   | 1,27                  |
| <b>3</b>         | <b>19,23 ± 1,13</b> | 65,99 ± 3,60   | 41,70 ± 0,25   | <b>2,17</b>           |
| <b>4</b>         | 34,24 ± 1,52        | 69,08 ± 6,37   | 65,87 ± 3,93   | 1,92                  |
| <b>5</b>         | <b>10,90 ± 0,68</b> | 114,68 ± 11,69 | 93,71 ± 9,20   | <b>8,60</b>           |
| <b>6</b>         | 41,54 ± 2,18        | 142,59 ± 4,97  | 106,19 ± 4,19  | 2,56                  |
| <b>7</b>         | <b>19,93 ± 1,74</b> | 84,92 ± 5,54   | 115,43 ± 10,92 | <b>5,79</b>           |
| <b>8</b>         | 42,50 ± 3,28        | 119,03 ± 7,09  | 90,57 ± 2,53   | 2,13                  |
| <b>9</b>         | 40,90 ± 3,35        | 88,62 ± 3,33   | 124,72 ± 15,58 | 3,05                  |
| <b>10</b>        | <b>11,01 ± 0,52</b> | 84,66 ± 3,42   | 107,57 ± 9,36  | <b>9,77</b>           |
| <b>11</b>        | <b>27,51 ± 3,41</b> | 106,92 ± 9,54  | 127,61 ± 13,45 | <b>4,64</b>           |
| <b>13</b>        | 47,81 ± 2,60        | 81,27 ± 1,22   | 94,78 ± 5,40   | 1,98                  |
| <b>14</b>        | <b>19,56 ± 2,80</b> | 43,54 ± 1,27   | 35,45 ± 0,09   | <b>1,81</b>           |
| <b>15</b>        | 47,97 ± 2,19        | 107,80 ± 3,45  | 79,72 ± 4,74   | 1,66                  |
| <b>16</b>        | 31,68 ± 2,42        | 78,97 ± 8,15   | 74,41 ± 7,23   | 2,35                  |
| <b>17</b>        | 49,86 ± 2,37        | 138,97 ± 5,01  | 63,85 ± 2,83   | 1,28                  |
| <b>19</b>        | 72,28 ± 3,85        | 115,68 ± 14,56 | 109,18 ± 3,65  | 1,51                  |
| <b>20</b>        | 56,45 ± 3,71        | 72,86 ± 2,85   | 65,46 ± 2,63   | 1,16                  |
| <b>21</b>        | 93,79 ± 10,76       | 151,39 ± 4,16  | 101,04 ± 10,16 | 1,08                  |
| <b>22</b>        | 72,19 ± 3,79        | 126,80 ± 0,75  | 83,18 ± 4,67   | 1,15                  |
| <b>23</b>        | 26,00 ± 1,42        | 61,22 ± 5,71   | 51,37 ± 3,54   | 1,98                  |
| <b>24</b>        | 36,96 ± 1,80        | 102,75 ± 10,90 | 86,21 ± 7,23   | 2,35                  |
| <b>25</b>        | 33,04 ± 2,03        | 112,55 ± 0,04  | 86,72 ± 5,69   | 2,62                  |
| <b>26</b>        | 76,02 ± 3,14        | 146,71 ± 11,54 | 122,11 ± 11,22 | 1,61                  |
| <b>27</b>        | <b>15,80 ± 0,83</b> | ND             | ND             | -                     |
| <b>28</b>        | 37,01 ± 2,15        | 78,07 ± 0,91   | 59,03 ± 6,12   | 1,59                  |
| <b>29</b>        | 23,72 ± 2,57        | ND             | ND             | -                     |
| <b>30</b>        | 37,14 ± 0,85        | 77,56 ± 8,74   | 73,55 ± 4,62   | 1,98                  |
| <b>31</b>        | 32,37 ± 2,25        | 107,50 ± 9,66  | 68,01 ± 5,83   | 2,10                  |
| <b>Betulin</b>   | 61,90 ± 2,68        | 93,92 ± 1,44   | 57,94 ± 1,79   | 0,94                  |
| <b>cisplatin</b> | 2,07 ± 0,08         | 16,20 ± 0,24   | 5,74 ± 0,48    | 2,77                  |

<sup>a</sup>SI – indeks selektivnosti, IC<sub>50</sub>(MRC-5) / IC<sub>50</sub>(HL-60);

ND – nije detektovana usled male količine jedinjenja

Uzimajući u obzir jedinjenja koja do sada nisu opisana u literaturi, jedinjenja **27** i **29** su pokazala značajnu aktivnost (**Tabela 21**). Zbog male količine pomenutih jedinjenja nije bilo moguće odrediti njihov indeks selektivnosti (aktivnost jedinjenja na zdravim ćelijama). Jedinjenja **3**, **5**, **7**, **10** i **14**, ranije opisana u literaturi, pokazala su značajnu aktivnost na HL-60 ćelijskim linijama promijelocitne leukemije sa IC<sub>50</sub> vrednostima manjim od 20 µM. Pored toga, jedinjenja **5**, **7**, **10** i **11** pokazala su se selektivnim u odnosu na zdrave ćelije MRC-5, sa vrednostima SI indeksa 8,6; 5,8; 9,8 i 4,6, redom. Pored pomenutih lanostanskih triterpena testiran je i njihov prekursor pentaciklični

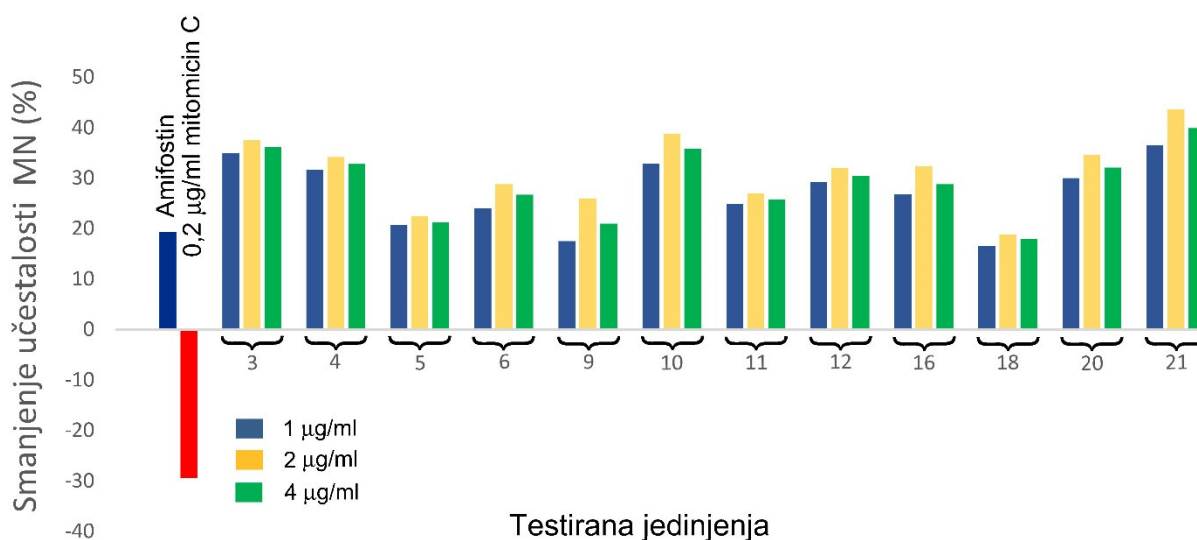
triterpen betulin. Sva pomenuta jedinjenja pokazuju 2,2 do 5 puta bolju aktivnost i 5 do 10 puta bolju selektivnost od betulina. Kao pozitivna kontrola korišćen je sintetički antikancerogeni agens cisplatin. Od ispitivanih lanostanskih triterpena, jedinjenja **5**, **7**, **10** i **11** pokazuju slabiju aktivnost, ali znatno bolju selektivnost u odnosu na cisplatin (**Tabela 21**). Poznata jedinjenja **5** i **10**, koja su po prvi put izolovana iz *F. betulina*, pokazuju citotoksičnu aktivnost sa IC<sub>50</sub> vrednošću 10,9 i 11,0 µM i značajan indeks selektivnosti 8,6 i 9,8, redom. Iako je citotoksična aktivnost cisplatin standarda pet puta veća od aktivnosti jedinjenja **5** i **10**, njihova selektivnost je pet puta veća od standarda, što ukazuje na njihov potencijal za dalja istraživanja.

#### 2.4.2. Citotoksična aktivnost na ćelijama adenokarcinoma pluća A549

Ćelijske linije A549 odabrane su kao drugi potencijalni kandidat za ispitivanje citotoksične aktivnosti. Na osnovu literaturnih podataka, utvrđeno je da pojedini lanostanski triterpeni pokazuju značajnu aktivnost na ovim ćelijskim linijama.<sup>124</sup> Rezultati naših testova prikazani su u **Tabeli 21**. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da izolovana jedinjenja **1-12** i **13-31** ne ispoljavaju značajnu citotoksičnu aktivnost na ovim ćelijskim linijama.

#### 2.4.3. Određivanje DNK protektivne aktivnosti na humanim limfocitima

Jedanaest lanostanskih triterpena, od kojih sedam derivata 21-lanostanske (**5**, **6**, **9**, **10**, **11**, **12** i **16**), četiri derivata 26-lanostanske kiseline (**3**, **4**, **20** i **21**) i pentaciklični triterpen betulin (**18**) odabrani su za *in vitro* testiranje zaštitnog efekta na aberacije hromozoma u perifernim humanim limfocitima. Pomenuta jedinjenja su izabrana na osnovu raznovrsnosti njihovih struktura, sa najvećim varijacijama u pogledu supstituenata i konfiguracija u određenim položajima. Za utvrđivanje DNK-a protektivne aktivnosti korišćen je test određivanja učestalosti mikronukleusa (MN) u binuklearnim ćelijama (BN).



**Slika 122.** Uticaj lanostanskih triterpena **3-6**; **9-12**; **16**; **18**; **20** i **21** na smanjenje frekvencije MN u odnosu na kontrolu.

Sva ispitivana jedinjenja dovela su do smanjenja broja ćelija sa formiranim mikronukleusima u odnosu na kontrolne ćelije limfocita (**Slika 122**). Na osnovu indeksa proliferacije (CBPI, cytokinesis-block proliferation index), koji se koristi u *in vitro* testovima za određivanje citotoksičnosti ispitivanih jedinjenja, utvrđeno je da nijedno od testiranih jedinjenja ne pokazuje značajno smanjenje broja tretiranih ćelija (**Tabela 22**). Poređenjem rezultata CBPI testa ispitivanih

jedinjenja sa rezultatima pozitivne i negativne kontrole utvrđen je inhibitorski efekat testiranih jedinjenja na limfocitnu proliferaciju. Kontrolne ćelije limfocita tretirane su mitomicinom C (MMC), mutagenim agensom koji uzrokuje pucanje hromozoma (klastogeni agens) i koji se koristi za proučavanje osetljivosti ćelija na hromozomska oštećenja i citotoksične efekte.<sup>125</sup> Tokom eksperimenta je analizirano 126000 binuklearnih ćelija. Rezultati testa ukazuju na zaštitni efekat testiranih jedinjenja, njihov citogenetski potencijal i smanjenje oštećenja na humanim limfocitima tokom *in vitro* testa. Pored toga zaključeno je da ispitivana jedinjenja utiču na smanjenje učestalosti mikronukleusa na dozno zavistan način, tako da su najefikasnija pri koncentraciji od 2,0 µg/ml (**Slika 122 i Tabela 22**).

**Tabela 22.** Učestalost mikronuleusa i njihova raspodela, CBPI i učestalost MN merenih u ćelijskim kulturama humanih limfocita tretiranih različitim koncentracijama odabranih triterpenskkih kiselina.

| Jedinjenje | Koncentracija<br>µg/ml | MN/1000<br>BN ćelija | % BN* ćelija<br>sa MN | MN/BN ćelije | CBPI*       | Učestalost<br>MN (%) |
|------------|------------------------|----------------------|-----------------------|--------------|-------------|----------------------|
| Kontrola   |                        | 26,33 ± 0,28         | 2,15 ± 0,07           | 1,19 ± 0,05  | 1,67 ± 0,03 | 100                  |
| Amifostin  | 1,0                    | 21,25 ± 0,45         | 1,74 ± 0,09           | 1,22 ± 0,06  | 1,66 ± 0,01 | 80,7                 |
| MMC        | 0,2                    | 34,06 ± 0,78         | 2,95 ± 0,13           | 1,16 ± 0,03  | 1,69 ± 0,06 | 129,4                |
| <b>3</b>   | 1,0                    | 17,13 ± 0,37         | 1,40 ± 0,05           | 1,21 ± 0,05  | 1,61 ± 0,01 | 65,1                 |
|            | 2,0                    | 16,42 ± 0,64         | 1,30 ± 0,05           | 1,26 ± 0,06  | 1,68 ± 0,03 | 62,4                 |
|            | 4,0                    | 16,81 ± 0,46         | 1,42 ± 0,03           | 1,18 ± 0,06  | 1,61 ± 0,02 | 63,8                 |
| <b>4</b>   | 1,0                    | 18,01 ± 0,52         | 1,57 ± 0,03           | 1,13 ± 0,01  | 1,65 ± 0,01 | 68,4                 |
|            | 2,0                    | 17,33 ± 0,45         | 1,59 ± 0,11           | 1,10 ± 0,06  | 1,69 ± 0,09 | 65,8                 |
|            | 4,0                    | 17,70 ± 0,80         | 1,53 ± 0,04           | 1,16 ± 0,02  | 1,70 ± 0,04 | 67,2                 |
| <b>5</b>   | 1,0                    | 20,88 ± 0,61         | 1,71 ± 0,12           | 1,22 ± 0,10  | 1,65 ± 0,01 | 79,3                 |
|            | 2,0                    | 20,44 ± 0,39         | 1,74 ± 0,06           | 1,17 ± 0,04  | 1,68 ± 0,03 | 77,6                 |
|            | 4,0                    | 20,74 ± 0,73         | 1,73 ± 0,02           | 1,19 ± 0,05  | 1,67 ± 0,01 | 78,8                 |
| <b>6</b>   | 1,0                    | 20,02 ± 0,39         | 1,66 ± 0,09           | 1,21 ± 0,04  | 1,97 ± 0,33 | 76,0                 |
|            | 2,0                    | 18,75 ± 0,83         | 1,57 ± 0,04           | 1,20 ± 0,04  | 1,64 ± 0,02 | 71,2                 |
|            | 4,0                    | 19,30 ± 0,72         | 1,71 ± 0,09           | 1,22 ± 0,04  | 1,63 ± 0,01 | 73,3                 |
| <b>9</b>   | 1,0                    | 21,73 ± 0,38         | 1,90 ± 0,04           | 1,14 ± 0,01  | 1,65 ± 0,02 | 82,5                 |
|            | 2,0                    | 19,48 ± 0,42         | 1,68 ± 0,06           | 1,17 ± 0,06  | 1,66 ± 0,03 | 74,0                 |
|            | 4,0                    | 20,79 ± 0,27         | 1,59 ± 0,06           | 1,31 ± 0,05  | 1,64 ± 0,02 | 79,0                 |
| <b>10</b>  | 1,0                    | 17,66 ± 0,63         | 1,50 ± 0,03           | 1,17 ± 0,03  | 1,71 ± 0,09 | 67,1                 |
|            | 2,0                    | 16,14 ± 0,56         | 1,40 ± 0,03           | 1,15 ± 0,05  | 1,65 ± 0,06 | 61,3                 |
|            | 4,0                    | 16,91 ± 0,60         | 1,50 ± 0,05           | 1,12 ± 0,03  | 1,64 ± 0,06 | 64,2                 |
| <b>11</b>  | 1,0                    | 19,78 ± 0,30         | 1,65 ± 0,01           | 1,13 ± 0,04  | 1,75 ± 0,07 | 75,1                 |
|            | 2,0                    | 19,23 ± 0,17         | 1,67 ± 0,06           | 1,16 ± 0,04  | 1,73 ± 0,08 | 73,0                 |
|            | 4,0                    | 19,54 ± 0,70         | 1,64 ± 0,07           | 1,20 ± 0,09  | 1,62 ± 0,03 | 74,2                 |
| <b>12</b>  | 1,0                    | 18,63 ± 0,49         | 1,54 ± 0,08           | 1,21 ± 0,03  | 1,90 ± 0,09 | 70,8                 |
|            | 2,0                    | 17,90 ± 0,51         | 1,58 ± 0,09           | 1,14 ± 0,05  | 1,62 ± 0,01 | 68,0                 |
|            | 4,0                    | 18,33 ± 0,57         | 1,51 ± 0,07           | 1,22 ± 0,03  | 1,72 ± 0,08 | 69,6                 |
| <b>16</b>  | 1,0                    | 19,28 ± 0,50         | 1,61 ± 0,06           | 1,20 ± 0,08  | 1,71 ± 0,09 | 73,2                 |
|            | 2,0                    | 17,83 ± 0,92         | 1,50 ± 0,06           | 1,19 ± 0,02  | 1,66 ± 0,02 | 67,7                 |
|            | 4,0                    | 18,76 ± 0,53         | 1,68 ± 0,09           | 1,12 ± 0,04  | 1,63 ± 0,02 | 71,2                 |
| <b>18</b>  | 1,0                    | 22,00 ± 0,63         | 1,78 ± 0,07           | 1,22 ± 0,01  | 1,67 ± 0,02 | 83,5                 |
|            | 2,0                    | 21,37 ± 0,40         | 1,77 ± 0,05           | 1,19 ± 0,02  | 1,66 ± 0,03 | 81,2                 |
|            | 4,0                    | 21,58 ± 0,45         | 1,79 ± 0,05           | 1,20 ± 0,02  | 1,62 ± 0,02 | 82,0                 |
| <b>20</b>  | 1,0                    | 18,43 ± 0,45         | 1,55 ± 0,04           | 1,19 ± 0,04  | 1,66 ± 0,03 | 70,0                 |
|            | 2,0                    | 17,22 ± 0,48         | 1,43 ± 0,02           | 1,20 ± 0,03  | 1,70 ± 0,05 | 65,4                 |
|            | 4,0                    | 17,89 ± 0,52         | 1,57 ± 0,07           | 1,14 ± 0,05  | 1,61 ± 0,02 | 67,9                 |
| <b>21</b>  | 1,0                    | 16,71 ± 0,76         | 1,42 ± 0,15           | 1,19 ± 0,09  | 1,60 ± 0,02 | 63,5                 |
|            | 2,0                    | 14,82 ± 1,33         | 1,27 ± 0,08           | 1,17 ± 0,06  | 1,65 ± 0,03 | 56,3                 |
|            | 4,0                    | 15,83 ± 0,79         | 1,32 ± 0,07           | 1,20 ± 0,03  | 1,66 ± 0,04 | 60,1                 |

\*MN – mikronukleus, BN – binuklearne ćelije, CBPI – proliferacioni indeks blokiranog citokina

Jedinjenja **5**, **6** i **9** pripadaju derivatima sa 24-metilen-lanosta-7,9(11)-dienskim sistemom i pokazuju manju aktivnost u odnosu na derivate 24-metilen-lanosta-8-enskih jedinjenja, **3**, **4**, **10**, **11**, **12**, **20** i **21**. Sa druge strane, ukoliko uporedimo rezultate citotoksične aktivnosti, jedinjenja sa

konjugovanim 7,9(11)-dienskim sistemom pokazuju značajno citotoksičnu aktivnost na HL-60 ćelijskim linijama. Pored toga, utvrđeno je da je DNK protektivna aktivnost derivata 24-metilen-26-lanost-8-enske kiseline, jedinjenja **3**, **4**, **20** i **21** (Slika 122), u direktnoj vezi sa supstitucionim modelom na lanostanskom skeletu. Jedinjenje **21**, koje ima 3-keto grupu, pokazuje nešto veću aktivnost u odnosu na jedinjenja sa 3-hidroksi (**4**) i 3-*O*-acil supstituentima (**3** i **20**). Kod derivata 24-metilen-21-lanost-8-enske kiseline (**10** i **11**), aktivnost je u direktnoj zavisnosti od relativne konfiguracije C-3. Jedinjenje **10** sa 3 $\beta$ -acetatnom grupom pokazuje značajno veću aktivnost u odnosu na jedinjenje **11**, epimer 3 $\alpha$ -acetat. Važno je napomenuti da jedinjenje **10** pokazuje i veću citotoksičnu aktivnost u poređenju sa jedinjenjem **11**.

Kod serije lanostana sa  $\Delta^{8,9}$  vezom, zaključeno je da oksigenacija položaja C-12 ili C-16, kao i prisustvo karboksilne grupe u položaju C-21 i C-26 ima povoljan uticaj na protektivni efekat kod hromozomskih aberacija. Betulin (**18**), pentaciklični triterpen, je pokazao najmanju aktivnost, najverovatnije usled nedostatka pomenutih funkcionalnih grupa. Jedinjenje **16** priprada derivatima 3,4-*seco*-lanostana, sa otvorenim A prstenom, dok je ostatak skeleta identičan kao kod jedinjenja **12**. Slična aktivnost jedinjenja **12** i **16** upućuje na zaključak da otvaranje prstena A nema uticaj na aktivnost.

U literaturi se DNK protektivni efekat prirodnih proizvoda najčešće povezuje sa njihovim antioksidativnim kapacitetom. Citotoksični i antioksidativni potencijal devet lanostanskih triterpena izolovanih iz *Poria cocos*, po prvi put su ispitali Zhou i saradnici.<sup>124</sup> Oni su kao izvor stabilinih radikala koristili 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). U poređenju sa vitaminom E, korišćenim kao pozitivna kontrola, ispitivana jedinjenja, nisu pokazala antioksidativnu aktivnost ( $p < 0.05$ ), koja se može smatrati statistički značajnom. Sekiya i saradnici su za ispitivanje antioksidativne aktivnosti triterpena izolovanih iz sklerocija gljive *P. cocos*, koristili 2,2-azo-bis-(2-amidinopropan)-dihlorid (AAPH), kao izvor indukovanih slobodnih radikala u antihemolitičkom testu na humanim eritrocitima. Ustanovili su da pojedine triterpenske kiseline lanostanskog tipa pokazuju inhibitornu aktivnost na idukovanu liazu crvenih krvnih zrnaca pomoću AAPH.<sup>126</sup>

Svi dobijeni rezultati upućuju na to da mehanizam delovanja ispitivanih jedinjenja, kao potencijalnih DNK protektivnih agenasa, nije baziran na njihovom antioksidativnom potencijalu. Pretpostavljeno je da se njihov uticaj ostvaruje putem drugog biohemijskog puta, regulisanog enzimima. Zhan i saradnici su ispitivali inhibitorno dejstvo triterpena inotodiola, izolovanog iz gljive *I. obliquus*, na HeLa ćelijsku migraciju, invaziju i idukciju apoptoze.<sup>127</sup> Rezultati „western blot“ analize pokazali su da inotodiol aktivira p53 i p21 ekspresiju proteina. Protein p53 je značajan za regulaciju ćelijskog ciklusa i u zavisnosti od oštećenja DNK, zaustavlja G1 fazu i aktivira regluatorne mehanizme povećavajući ekspresiju p21 ili uvodi ćeliju u proces apoptoze. Protein p21, koji je inhibitor enzima kinaza, povezan je sa tumorskom inhibicijom.<sup>128</sup> Smatra se da ispitivana jedinjenja imaju sličan regulatorni mehanizam delovanja na ćelijski ciklus, putem regulacije p53 proteina, što će svakako biti jedan od narednih predmeta istraživanja.

## 2.5. Kultivacija (gajenje) plodonosnih tela na različitim podlogama

Kultivacija gljiva radi dobijanja plodonosnih tela predstavlja pogodan način za prevazilaženje mnogih ograničenja koja se javljaju kada je objekat istraživanja fungalni materijal. Osim toga, utvrđen je uticaj supstrata na hemijski sastav plodonosnih tela tokom gajenja.<sup>129</sup> Usled svih navedenih činjenica, osmišljen je eksperiment za dobijanje plodonosnih tela na alternativnim supstratima na kojima do sada ova vrsta nije kultivisana. Kao supstrat korišćena je piljevina ruja (*Cotinus coggygria*), crne jove (*Alnus glutinosa*) i pečena unutrašnja ljuska lešnika (*Corylus avellana*). Piljevina breze (*Betula alba*) je korišćena kao supstrat na kome *F. betulina* raste u prirodi (Slika 123). Pečena ljuska lešnika je otpad prehrambene industrije za koji ne postoji ekološki prihvatljivo rešenje. Piljevina crne jove i ruja predstavljaju otpad iz drvne i tekstilne industrije. Visok antioksidativni potencijal je razlog njihovog odabira.



**Slika 123.** Fotografije plodonosnih tela *F. betulina* gajene na piljevini breze (A), ljusci lešnika (B), piljevini ruja (C) i crne jove (D) (fotografisao dr A. Knežević).

Plodonosna tela su uzorkovana u triplikatu, četiri puta u podjednakim vremenskim intervalima, sa svake od navedenih podloga, što je detaljno opisano u Eksperimentalnom delu (poglavlje 3.1.2.). Svako od uzorkovanja je pripisano odgovarajućoj fazi rasta, na osnovu morfoloških karakteristika. Prva i poslednja faza su okarakterisane kao granične, primordije odnosno zrela plodonosna tela, dok se preostale dve smatraju međufazama. Dobijena plodonosna tela su osušena, samlevena i dalje analizirana primenom FTIR i HR MAS NMR spektroskopskih tehnika. Primenom multivarijantne analize, dobijeni rezultati su analizirani kako bi se potvrdila starost svake od faza i ustanovile potencijalne promene u hemijskom sastavu plodonosnih tela *F. betulina*.

Prethodno predstavljene rezultati odnose se na nativna plodonosna tela *F. betulina*. Uloga i potencijal ove gljive je evidentan i na njemu se bazira primena u medicini i biotehnologiji. Osnovi preduslov za izolovanje bioaktivnih komponenata je velika količina početnog materijala. Dostupnost *F. betulina* u prirodi je ograničena, pošto se gljiva plodonosi sezonski, na severnoj hemisferi i samo na brezinom drveću. Usled toga, kultivacija *F. betulina* u kontrolisanim uslovima, može biti veoma značajan put za dobijanje potrebne količine ispitivanog materijala, bez biotičke i abiotičke kontaminacije, bez obzira na period godine i geografsku lokaciju.<sup>33</sup> Kultivacija plodonosnih tela gljiva u veštačkim uslovima predstavlja veliki izazov. Čilerdžić i saradnici ispitivali su uticaj supstrata za gajenje na hemijski sastav i biološku aktivnost ekstrakata plodonosnih tela *Ganoderma lucidum*. Studija je pokazala da supstrat na kome je gljiva gajena ima jako veliki uticaj na njen hemijski sastav, a samim tim i na biološku aktivnost. Ustanovili su da je pšenična slama najoptimalniji supstrat za gajenje i dobijanje plodonosnih tela. Etanolni ekstrakt plodonosnih tela dobijenih gajenjem na slami pokazao je najveći neuroprotektivni potencijal, u poređenju sa rezultatima dobijenim kada



se primenjuju mešani i komercijalni supstrati. Posebno je važno istaći značaj kultivacije na pšeničnoj slami, koja je široko rasprostranjena, dostupna i predstavlja otpad. Značaj ove studije ogleda se u poboljšanju neuroprotektivnog potencijala plodonosnih tela *G. lucidum*, koji se odlikuje gotovo identičnim vrednostima kao i standardnih jedinjenja, sintetičkih lekova galantamina i  $\alpha$ -kojične kiseline.<sup>129</sup>

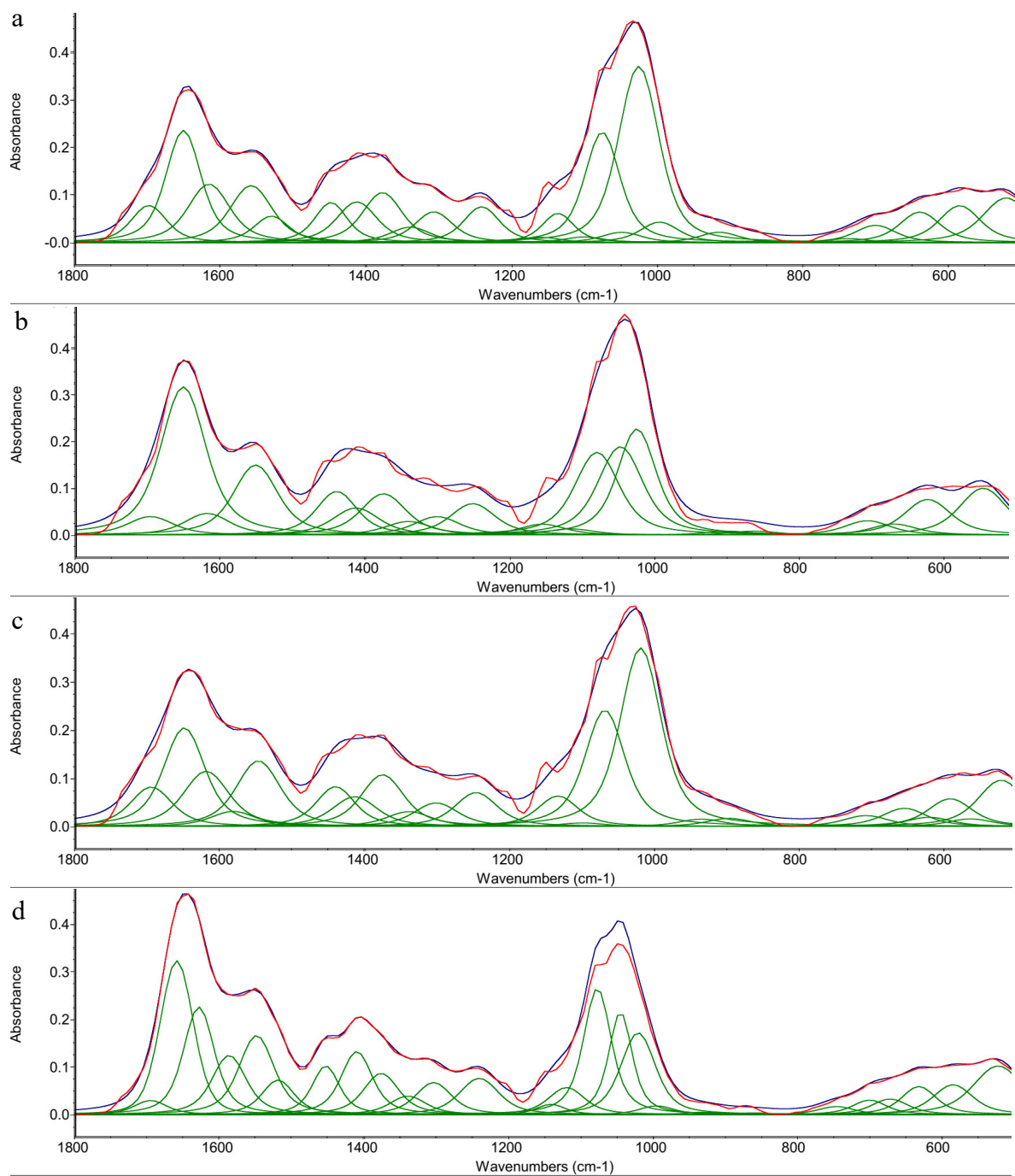
Do danas, micelija *F. betulina* je uspešno dobijana na hranljivim podlogama, dok je kultivacija gljive radi dobijanja plodonosnih tela znatno komplikovanija.<sup>130</sup> Prvi literaturni podatak potiče od Ke i saradnika, koji su nakon 18 meseci gajenja na Crnoj brezi (*Betula davurica*) uspeali da dobiju samo par plodonosna tela.<sup>131</sup> Prvo uspešno gajenje plodonosnih tela *F. betulina*, publikovano je od strane Pleszczynska i saradnika, koji su, u kontrolisanim uslovima, u gajilištu, uspeali da dobiju plodonosna tela koristeći kao supstrat piljevinu breze. Poređenja radi, testirani su etanolni ekstrakti nativnih i kultivisanih plodonosnih tela *F. betulina* na ćelijskim linijama karcinoma pluća (A549), karcinoma debelog creva (HT-29) i karcinoma dojke (T47D). Rezultati su pokazali da najveću aktivnost na ćelije karcinoma pluća pokazuje etanolni ekstrakt gajenih plodonosnih tela, dok je ekstrakt nativnih plodonosnih tela sakupljenih u brezovoj šumi, pokazao znatno nižu aktivnost.<sup>33</sup>

## 2.6. Metabolički profil kultivisanih plodonosnih tela *F. betulina*

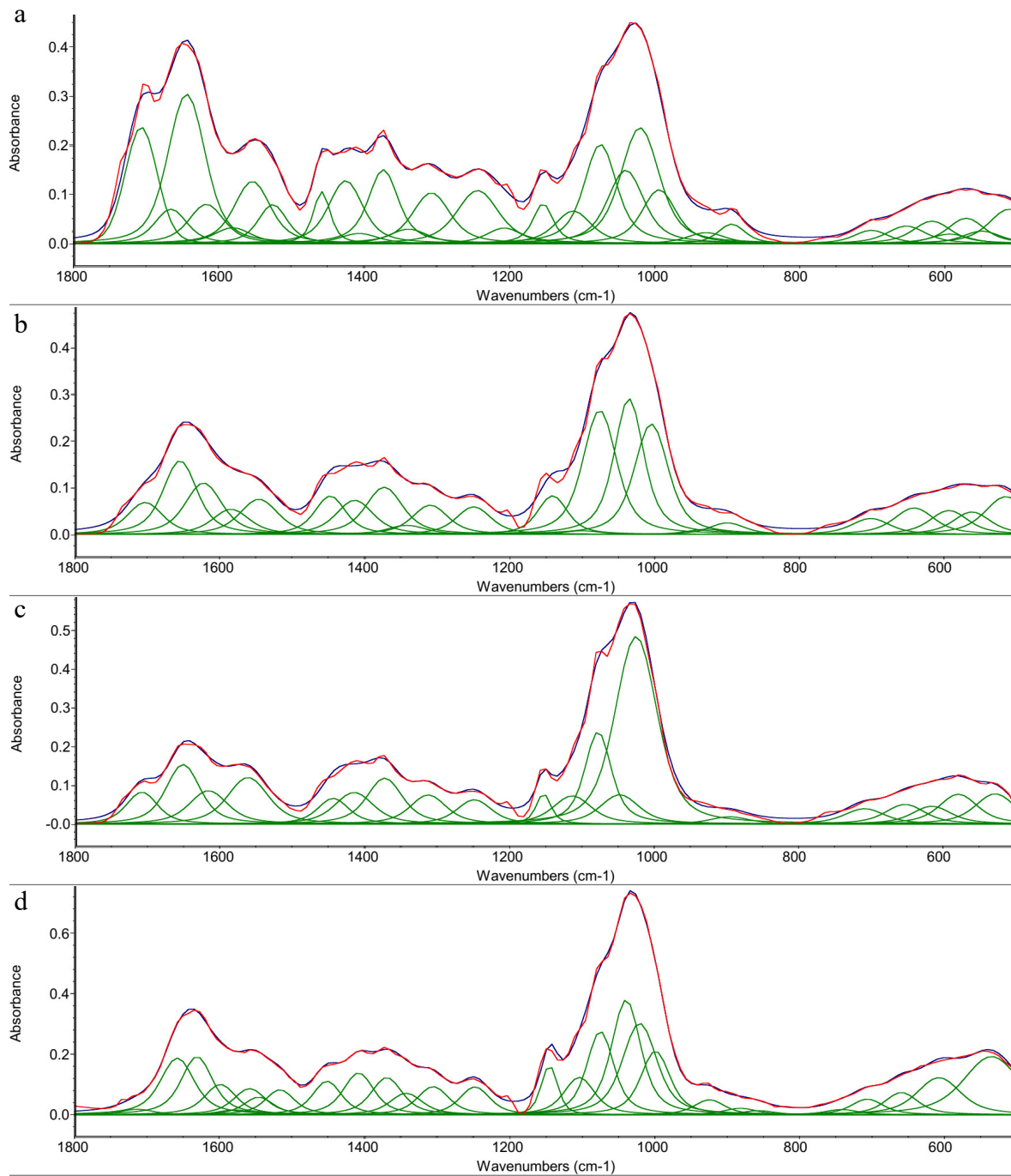
Metabolički profili kultivisanih plodonosnih tela na različitim supstratima praćeni su primenom FTIR i HR MAS NMR spektroskopskih tehnika kao komplementarnih metoda. Sa ciljem da se prouči ukupan metabolički profil izbegnut je korak ekstrakcije materijala, tokom koje bi došlo do gubitaka određenog dela uzorka. Odabrane metode su nedestruktivne i pogodne za analizu velikog broja uzoraka za relativno kratko vreme.

U gljivama dominiraju makromolekuli, mahom polisaharidi, dok su mali molekuli manje zastupljeni. Upravo zbog toga su odabrane prethodno navedene tehnike. <sup>1</sup>H NMR spektri snimljeni su sa modifikovanom *cpmg* pulsnom sekvencom (Eksperimentalni deo, poglavlje 3.1.), kako bi se video profil manjih molekula i FTIR spektri, u kojima su trake svih jedinjenja koja se nalaze u plodonosnim telima.

FTIR spektri snimani su u oblasti od 1800 do 500  $\text{cm}^{-1}$ . U spektrima ispitivanih uzoraka dominantne su deformacione trake amida, valencione trake karbonilne grupe, u oblasti od 1700 do 1400  $\text{cm}^{-1}$ , kao i različiti tipovi C-O valencionih vibracija, u oblasti od 1200 do 800  $\text{cm}^{-1}$ . Dekonvolucijom regije od 1800 do 500  $\text{cm}^{-1}$  reprezentativnih uzoraka različite starosti (mlada i stara) utvrđeni su položaju pojedinačnih traka, čija je asignacija predstavljena u **Tabeli 23** i na **Slikama 124** i **125**.



**Slika 124.** Proizvod dekonvolucije FTIR spektara plodnosnih tela različite starosti na različitim supstratima a) mlada plodnosna tela sa breze, b) stara plodnosna tela sa breze, c) mlada plodnosna tela sa crne jove i d) stara plodnosna tela sa crne jove. Plavom bojom prikazan je originalni spektar, crvenom rezultujući spektar proizvoda dekonvolucije i zelenom pojedinačni signali nakon dekonvolucije.

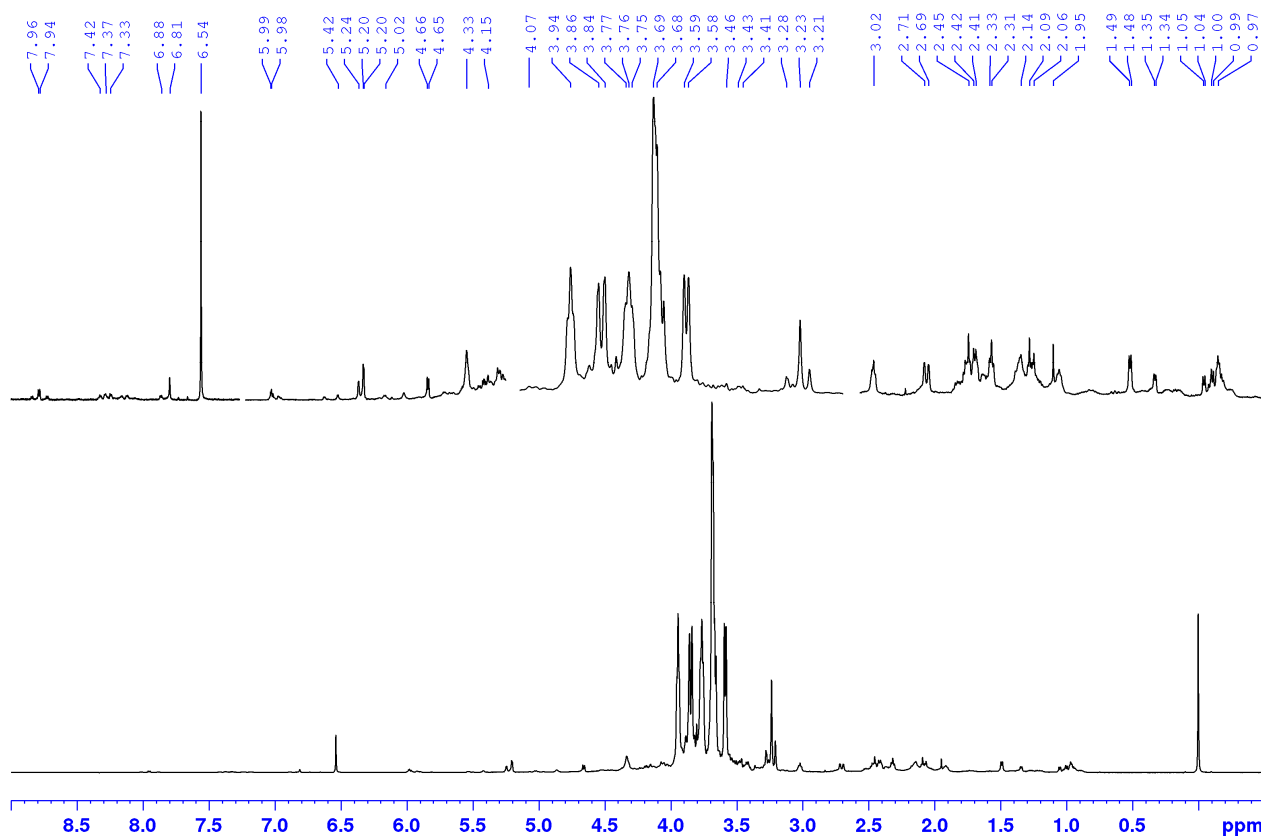


**Slika 125.** Proizvod dekonvolucije FTIR spektara plodnosnih tela različite starosti na različitim supstratima a) mlada plodnosna tela sa ljuske lešnika, b) stara plodnosna tela sa ljuske lešnika, c) mlada plodnosna tela sa ruja i d) stara plodnosna tela sa ruja. Plavom bojom prikazan je originalni spektar, crvenom rezultujući spektar proizvoda dekonvolucije i zelenom pojedinačni signali nakon dekonvolucije.

**Tabela 23.** Asignacija traka iz FTIR spektara plodonosnih tela sa različitim supstrata i starosti.

| Položaj trake u FTIR spektru (cm <sup>-1</sup> ) |       |           |       |       |       |                |       | Funkcionalna grupa  |
|--|-------|-----------|-------|-------|-------|----------------|-------|---|
| Breza  |       | Crna jova |       | Ruj   |       | Ljuska lešnika |       |   |
| mlada  | stara | mlada     | stara | mlada | stara | mlada          | stara |   |
| 1698   | 1697  | 1695      | 1695  | 1708  | 1714  | 1707           | 1704  | C=O st  |
| 1651   | 1651  | 1649      | 1659  | 1652  | 1659  | 1666           | 1655  | Amidna traka I  |
|  |       | 1628      | 1628  |       | 1631  | 1645           | 1623  |   |
| 1616   | 1618  | 1619      |       | 1616  |       | 1617           |       | $\delta_{sy}NH_2$   |
|  |       |           |       |       | 1599  |                |       | ArC=C st  |
|  |       | 1582      | 1587  |       | 1579  | 1581           | 1585  | COO <sup>-</sup> st as  |
|  |       |           |       |       | 1559  | 1554           |       | Amidna traka II   |
| 1558   | 1551  | 1547      | 1549  | 1562  | 1546  |                | 1546  |   |
| 1530   |       |           | 1519  |       | 1517  | 1526           |       | $\delta_{sy}NH_3^+$   |
| 1448   | 1439  | 1440      | 1453  | 1444  | 1452  | 1458           | 1448  | $\delta CH_2$ i $\delta CH_3$   |
|  |       |           |       |       |       | 1425           |       |   |
| 1413   | 1412  | 1413      | 1410  | 1415  | 1408  | 1407           | 1414  | COO <sup>-</sup> st sy  |
| 1377   | 1374  | 1375      | 1376  | 1373  | 1370  | 1374           | 1373  | $\delta_{sy}CH_3$   |
| 1339   | 1340  | 1339      | 1339  |       | 1343  | 1339           | 1342  | $\delta C-H$ ; $\delta C-OH$  |
| 1307   | 1300  | 1301      | 1304  | 1312  | 1306  | 1307           | 1310  | Amidna traka III  |
| 1241   | 1251  | 1246      | 1240  | 1249  | 1248  | 1244           | 1250  | C-O-C st as   |
|  |       |           |       |       |       |                |       | C-O st  |
| 1159   | 1155  |           |       | 1153  | 1145  | 1154           |       | C-O-C st sy<br>C-O st<br>$\delta C-O-C$ (od polisaharida)                       |
| 1136   |       | 1133      | 1141  |       |       |                | 1141  |   |
| 1100   | 1115  | 1099      | 1119  | 1113  | 1104  | 1112           | 1100  |   |
| 1075   | 1079  | 1068      | 1077  | 1077  | 1075  | 1075           | 1076  |   |
| 1049   | 1047  |           | 1045  | 1047  | 1039  | 1040           | 1035  |   |
| 1025   | 1024  | 1019      | 1020  | 1024  | 1021  | 1020           |       |   |
| 997  |       |           | 994   |       | 999   | 994            | 1004  |   |
|  |       | 935       |       |       | 924   | 929            | 928   |   |
| 914  | 898   | 897       |       | 895   | 882   | 894            | 899   |   |
|  | 861   |           |       |       | 857   |                |       |   |
| 737  |       |           | 746   |       | 742   |                |       | $\delta_{C-O} \delta$   |
| 700  | 705   | 708       | 700   | 708   | 706   | 701            | 701   | $\delta_{O-H}$  |
|  | 669   | 654       | 671   | 652   | 659   | 653            | 641   |   |
| 639  | 622   | 620       | 632   | 615   |       | 618            |       | $\delta N-H$ van ravni i<br>$\delta OCN$ van ravni<br>(amidne trake IV, V i VI) |
|  |       | 591       |       |       | 608   | 593            | 593   |   |
| 584  |       | 563       | 585   | 579   |       | 570            | 561   |   |
|  | 546   |           |       |       |       | 549            |       |   |
| 521  |       | 521       | 522   | 528   | 535   | 511            | 514   |   |

U <sup>1</sup>H NMR spektrima najintenzivniji su signali oksigenovanih protona šećernih komponenti u oblasti  $\delta_H$  3,5-4,0, anomerni protoni  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukopiranozil jedinica na  $\delta_H$  4,65 i 5,22, redom. Na hemijskom pomeranju  $\delta_H$  6,5 uočava se signal fumarne kiseline, dok su u oblasti oko  $\delta_H$  6,0 prisutni signali olefinskih protona, u oblasti  $\delta_H$  6,8-8,2 nalaze se signali aromata. Na  $\delta_H$  0,8-2,5, dominantni su signali metil i metilenskih grupa iz masnih kiselina i aminokiselina (**Slika 126**). Identifikacija pojedinačnih komponenti je urađena na osnovu 1D i 2D NMR spektara i njihovim poređenjem sa literaturnim podacima.



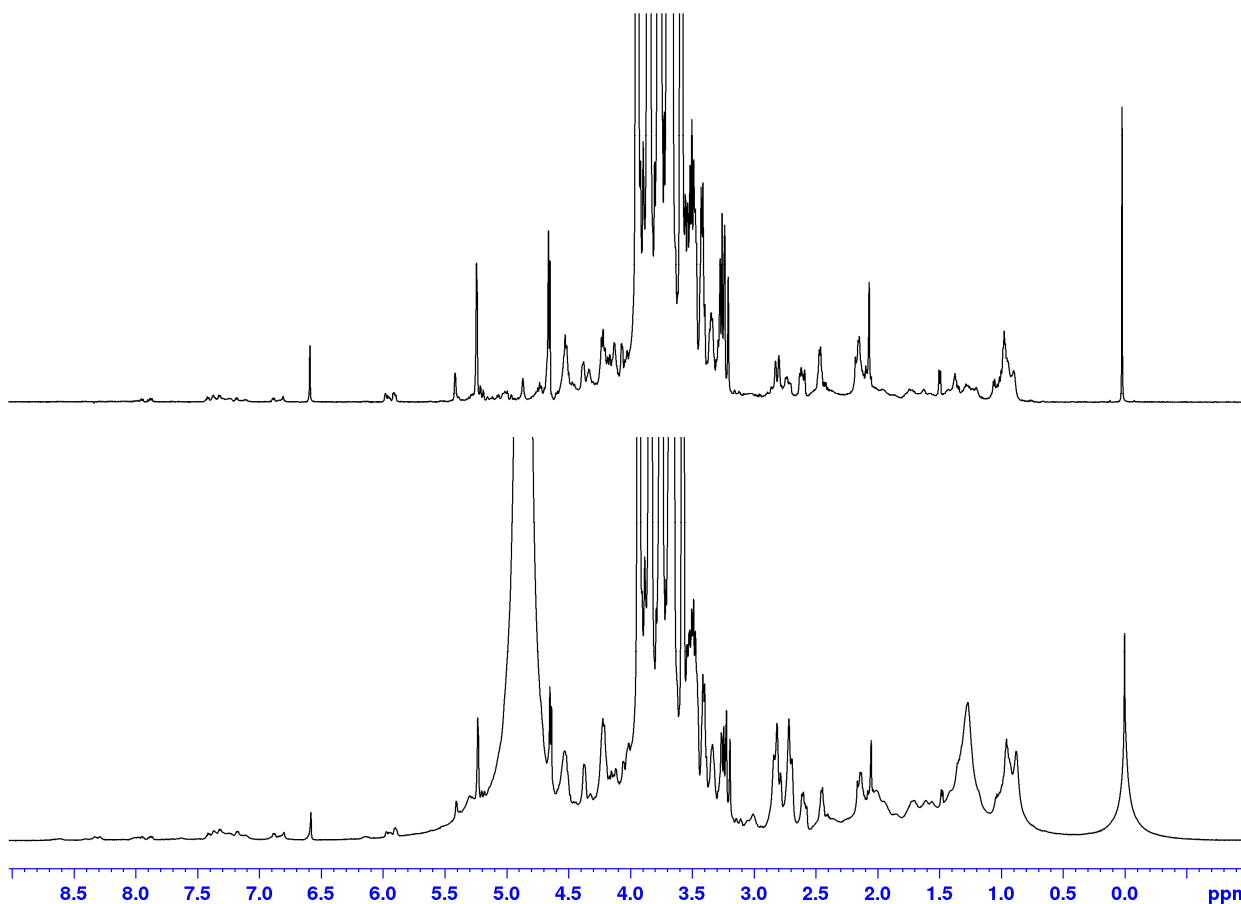
Slika 126. Reprezentativni *cpmg*  $^1\text{H}$  NMR spektar plodonosnog tela kultivisanog na supstratu crne jove.

### 2.6.1. Promena metaboličkih profila usled sazrevanja i gajenja plodonosnih tela na različitim podlogama

Za praćenje promena u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu metabolita gajenih plodonosnih tela *F. betulina*, neophodno je uočiti sve potencijalne promene, kako na makromolekulima, tako i kod ostalih metabolita, koje gljiva sintetiše. Jedan od glavnih nedostataka FTIR spektroskopije je prisustvo velikog broja širokih traka koje se međusobno preklapaju. Da bi se taj problem prevazišao urađen je drugi izvod za svaki od snimljenih uzoraka i dobijeni rezultati su iskorišćeni za multivarijantnu analizu i formiranje statističkih modela.

Kod snimanja  $^1\text{H}$  NMR spektara celih plodonosnih tela primenom standardne *zg30* pulsne sekvence, javljali su se signali vode i makromolekula, koji utiču na izgled bazne linije i prekrivaju signale malih molekula, te nije bilo moguće koristiti pomenutu pulsnu sekvencu. Supresija signala vode postignuta je primenom *zgpr* pulsne sekvence, ali su u spektru i dalje uočljivi signali koji potiču od makromolekula, pa nije postignut zadovoljavajući rezultat. Pomenuti problemi uspešno su prevaziđeni primenom *cpmg* pulsne sekvence sa modifikacijom spin eho dela, čime je uklonjen signal vode bez deformacije okolnih signala i filtrirani signali malih molekula oprimizacijom vremena relaksacije  $T_2$  (Slika 127).

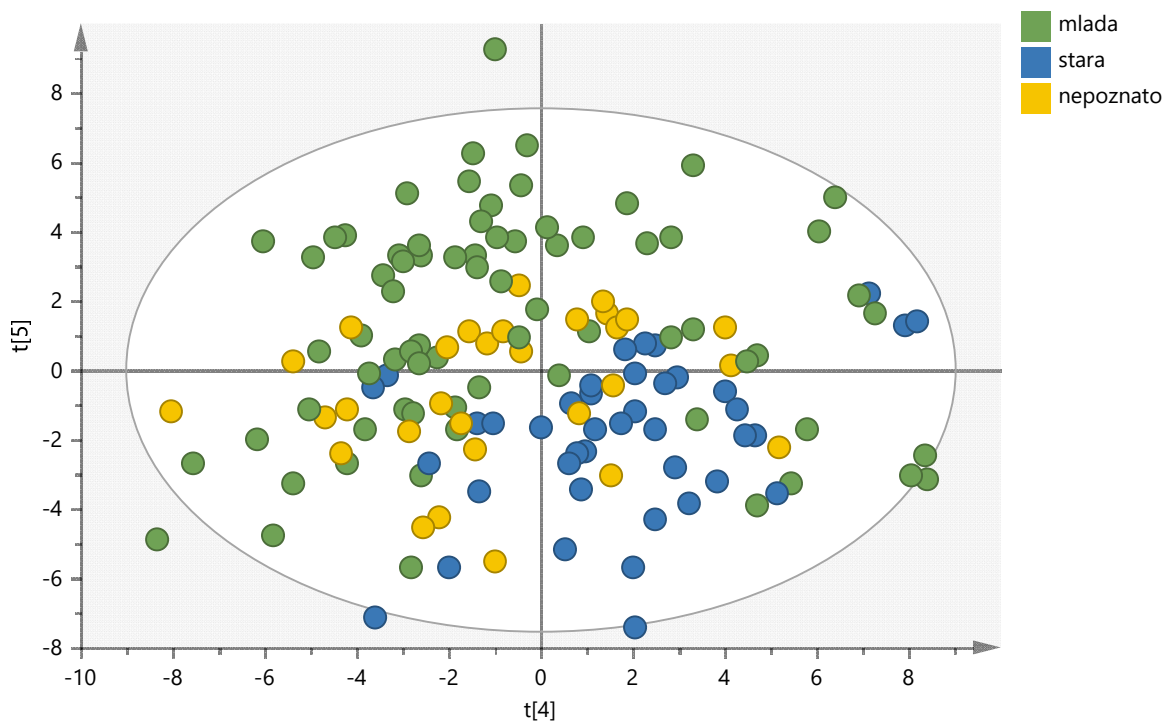
Dobijeni spektralni podaci iskorišćeni su za multivarijantnu analizu kako bi se formirali modeli za utvrđivanje metaboličkih promena u ispitivanim uzorcima. Dobijeni su modeli analize glavnih komponenti (PCA) i diskriminativne analize ortogonalne parcijalne regresije najmanjih kvadrata skrivenih struktura (OPLS-DA).



**Slika 127.**  $^1\text{H}$  NMR spektri uzorka plodonosnog tela *F. betulina* kultivisanog na brezi, snimljen modifikovanom *cpmg* pulsnom sekvencom (gore) i *zg30* pulsnom sekvencom (dole).

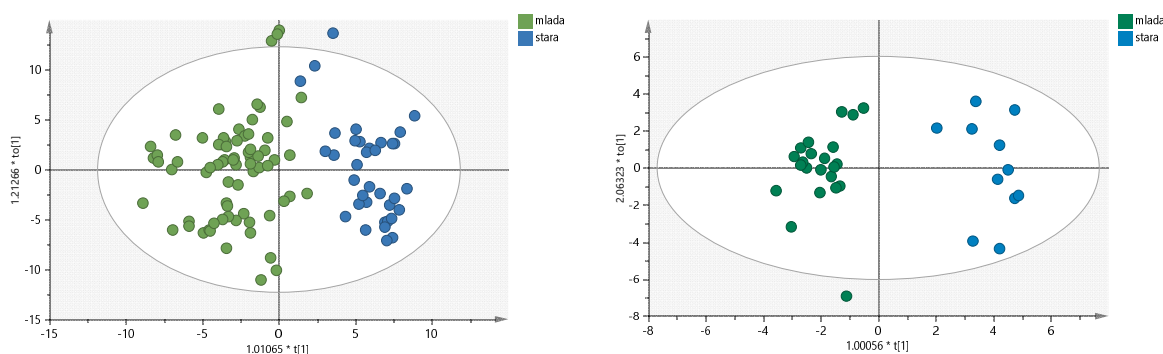
Tokom faze razvoja plodonosnih tela bilo je četiri uzorkovanja. Gajenje *F. betulina* na različitim podlogama uticalo je na dinamiku rasta i plodonošenja. Na osnovu morfoloških karakteristika, svi prikupljeni uzorci su podeljeni na tri starosne kategorije: mlada (prvo i drugo uzorkovanje), stara (četvrto uzorkovanje) i nepoznata starost (treće uzorkovanje).

Za praćenje promena metabolita usled različite starosti formiran je PCA model na osnovu podataka dobijenih iz FTIR spektara (**Slici 128**). U grafiku rezultata označeni su uzorci različite starosti, kako bi se uočila njihova distribucija i potencijalno grupisanje. Formirani PCA model na osnovu podataka dobijenih iz FTIR spektara, ima ukupno 17 predikcionih osa. Na osnovu distribucije uzoraka duž četvrte i pete predikcione ose, formiran je grafik rezultata, prikazan na **Slici 128**.

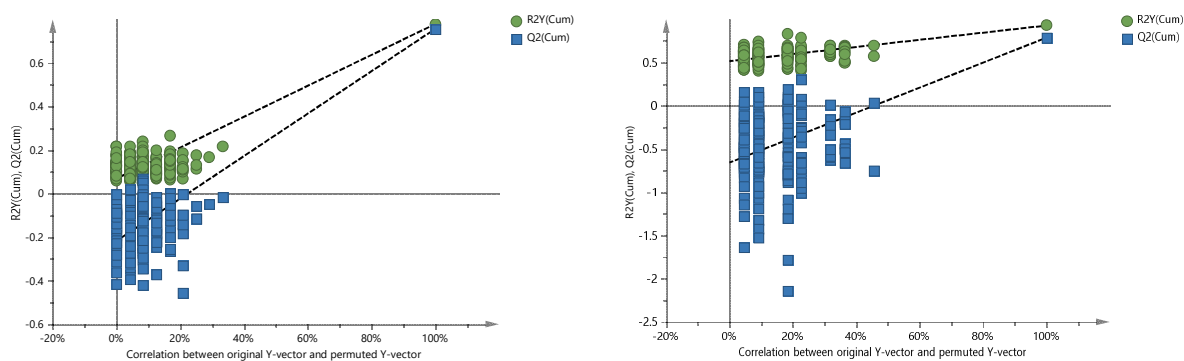


**Slika 128.** PCA model uzoraka plodonosnih tela *F. betulina* sminljenih na FTIR spektrofotometru u triplikatu. Koeficijent odredivosti za prikazani PCA model je  $R^2 = 0,989$  dok je valjanost predikcione sposobnosti  $Q^2=0,969$ .

U grafiku rezultata PCA modela je prisutan trend grupisanja uzoraka definisanih kao stara i mlada, ali i gotovo ravnomerna raspodela uzoraka nepoznate starosti. Kako bi se utvrdila pripadnost određenoj starosnoj kategoriji, FTIR i  $^1\text{H}$  NMR spektralni podaci (X promenljiva) i kategorija starih i mladih (Y promenljiva), bez podataka uzoraka nepoznate starosti, iskorišćeni su za dobijanje OPLS-DA modela. U prikazanom grafiku rezultata OPLS-DA modela (**Slika 129**) jasno su razdvojeni uzorci na osnovu njihove različite starosti. Iako su parametri dobijenog modela zadovoljavajući (**Tabela 24**) potrebno je utvrditi da dobijeni model nije posledica varijabilnosti između različitih grupa, već unapred definisanog statusa pojedinačnih uzoraka svakoj od grupa. Za potvrdu ispravnosti dobijenih modela korišćeni su permutacioni test i krosvalidacioni ANOVA test (CV-ANOVA) (**Slika 130** i **Tabela 24**).



**Slika 129.** Uporedni prikaz grafika rezultata OPLS-DA modela dobijenih na osnovu rezultata FTIR (levo) i HR MAS NMR analize (desno) u zavisnosti od stadijuma razvoja plodonosnog tela.

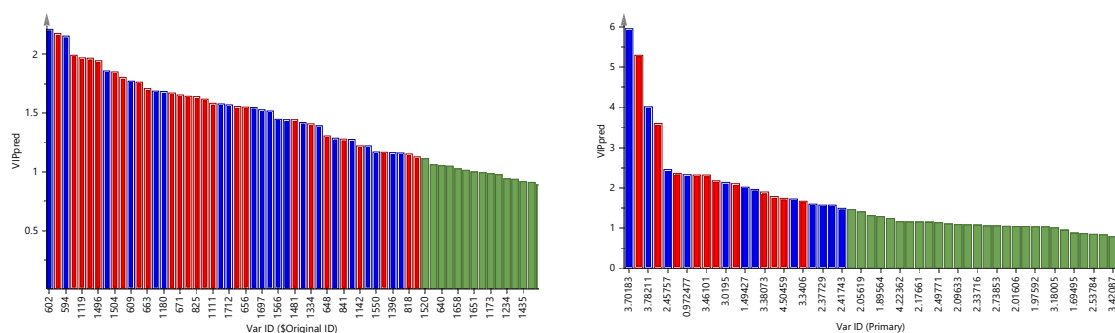


**Slika 130.** Permutacioni test za OPLS-DA modele dobijene na osnovu rezultata FTIR (levo) i HR MAS NMR analize (desno) u zavisnosti od stadijuma razvoja plodonosnog tela.

**Tabela 24.** Parametri validacije OPLS-DA modela dobijenih na osnovu različite starosti plodonosnih tela *F. betulina*.

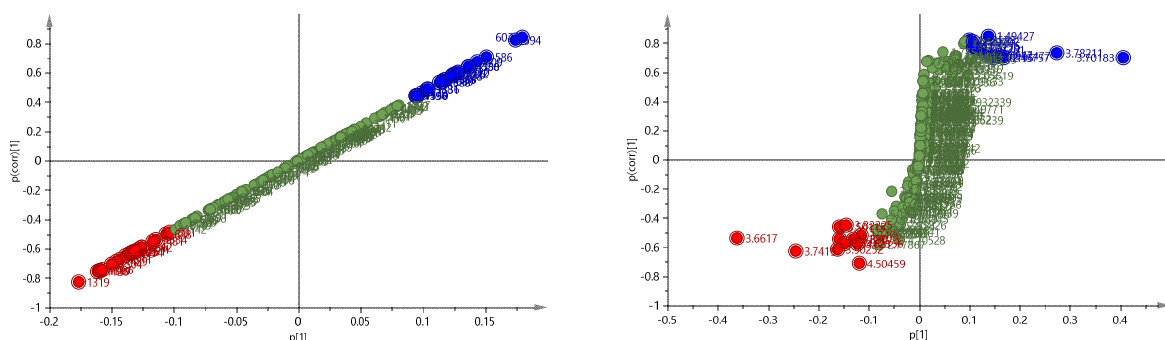
| Metoda        | Komponente<br>(predviđene + ortogonalne) | R <sup>2</sup> X<br>ortogonalna | R <sup>2</sup> Y<br>ukupna | Q <sup>2</sup> | p<br>(CV-ANOVA)        |
|---------------|--|---------------------------------|----------------------------|----------------|------------------------|
| FTIR          | 1+1                                      | 0,306                           | 0,731                      | 0,689          | 7,98*10 <sup>-29</sup> |
| HR MAS<br>NMR | 1+3                                      | 0,799                           | 0,927                      | 0,787          | 20,8*10 <sup>-6</sup>  |

Rezultati oba testa ukazuju na to da su modeli zasnovani na prirodnoj različitosti između analiziranih uzoraka, što je omogućilo da se analizom VIP (eng. Variable Influence on Projection) skorova predikcionih komponenti (VIP-pred) odrede signali koji su jedinstveni za svaku od grupa (**Slika 131**). Za objašnjavanje modela dodatno je korišćen S-grafik, a za vizuelni prikaz S-linije. U S-grafiku je predstavljena korelaciona zavisnost kovarijanse promenljive X (signala u spektru) i predikcionog skora  $t[1]$  (**Slika 132**).

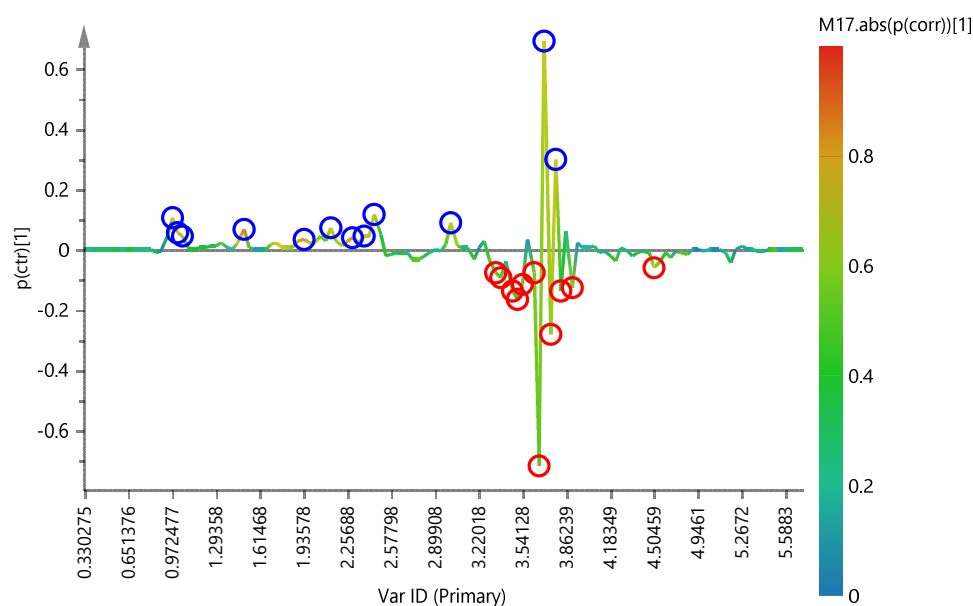


**Slika 131.** Prikaz vrednosti VIP-pred promenljivih za rezultate FTIR (levo) i NMR (desno) OPLS-DA modela. Crvenom i plavom bojom su označene promenljive iz VIP-pred koje su markeri sazrevanja.

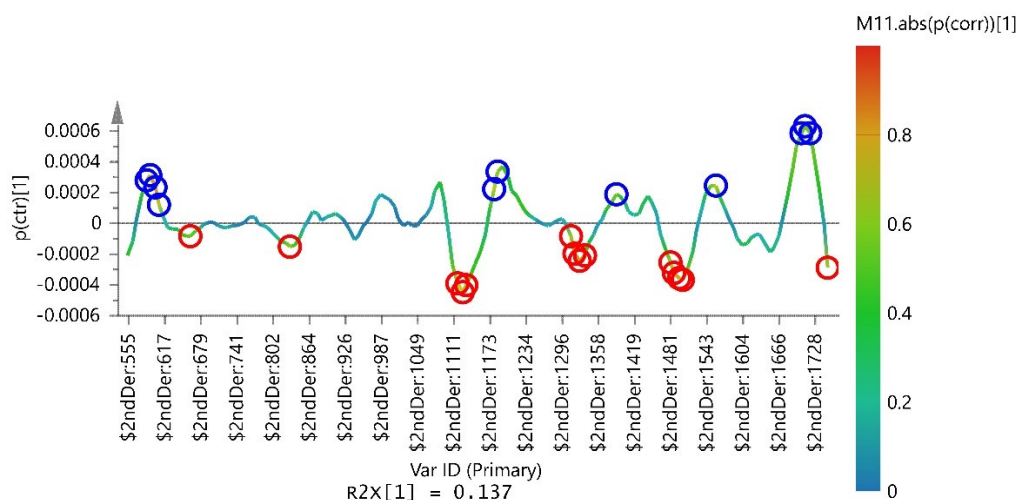




**Slika 132.** S-grafik promenljivih za rezultate FTIR (levo) i NMR (desno) OPLS-DA modele. Crvenom i plavom bojom su označene promenjljive, koje predstavljaju potencijalne markere sazrevanja.



**Slika 133.** S-linija OPLS-DA modela dobijenog na osnovu  $^1\text{H}$  NMR spektralnih podataka. Plavom bojom su zaokružene promenjljive koje su karakteristične za stara, a crvenom za mlada plodona tela.



**Slika 134.** S-linija OPLS-DA modela dobijenog na osnovu FTIR spektralnih podataka. Plavom bojom su zaokružene promenjljive koje su karakteristične za stara, a crvenom za mlada plodona tela.

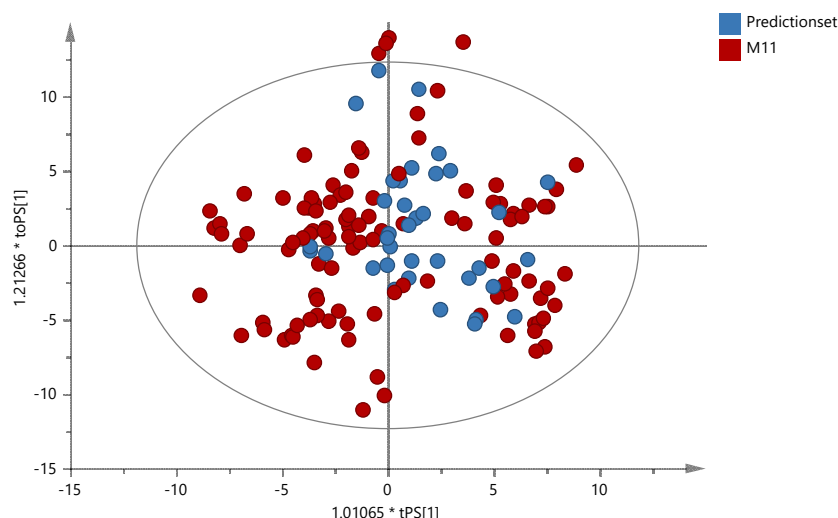
Kombinacijom VIP-pred skorova i promenljivih iz S-plota, iz modela dobijenog na osnovu rezultata NMR spektroskopije, utvrđeno je da su signali u oblasti  $\delta_H$  0,5-5,0 zaslužni za razlikovanje uzoraka na osnovu starosti. U uzorcima mladih plodonosnih tela dominiraju signali šećernih komponenti, prikazani kao negativni signali na S-liniji (**Slika 133**), dok su kod uzoraka starih plodonosnih tela *F. betulina* u nešto većoj koncentraciji zastupljene aminokiseline i lipidi. Analizom S-linije modela dobijenog na osnovu rezultata FTIR spektroskopije (**Slika 134**) u saglasnosti su sa rezultatima OPLS-DA modela dobijenog na osnovu  $^1H$  NMR spektralnih podataka. Analizom VIP-pred skorova i S-linije OPLS-DA modela dobijenog na osnovu FTIR spektralnih podataka, kao markeri sazrevanja prepoznate su trake na sledećim vrednostima talasnih brojeva: 1710, 1558, 1388, 1184 i 596 kod starih i trake 1750, 1492, 1322, 1126, 832 i 662  $cm^{-1}$  kod mladih. Detaljna asignacija traka iz FTIR spektara predstavljena je u **Tabeli 23**.

Kako bi se odredila starost nedefinisanih uzoraka, generisan je SIMCA predikcioni model na osnovu podataka iz prethodno prikazanog modela baziranog na rezultatima FTIR spektroskopije. Na osnovu rezultata SIMCA predikcionog modela generisana je kvalifikaciona tabela (**Tabela 25**). Utvrđeno je da su svi uzorci prikupljeni kao mlada plodonosna tela ispravno klasifikovani, i da 35 od ukupno 36 uzoraka starih plodonosnih tela sa visokim stepenom poverenja pripada klasi stara, osim jednog uzorka za koji je upitan starosni stadijum. Uzorci nedefinisane starosti predstavljaju prelazne forme kod kojih nije moguća jasna klasifikacija usled niskog stepena poverenja (žuto obojena polja u **Tabeli 25**).

**Tabela 25.** Klasifikacija uzoraka plodonosnih tela na osnovu različite starosti.

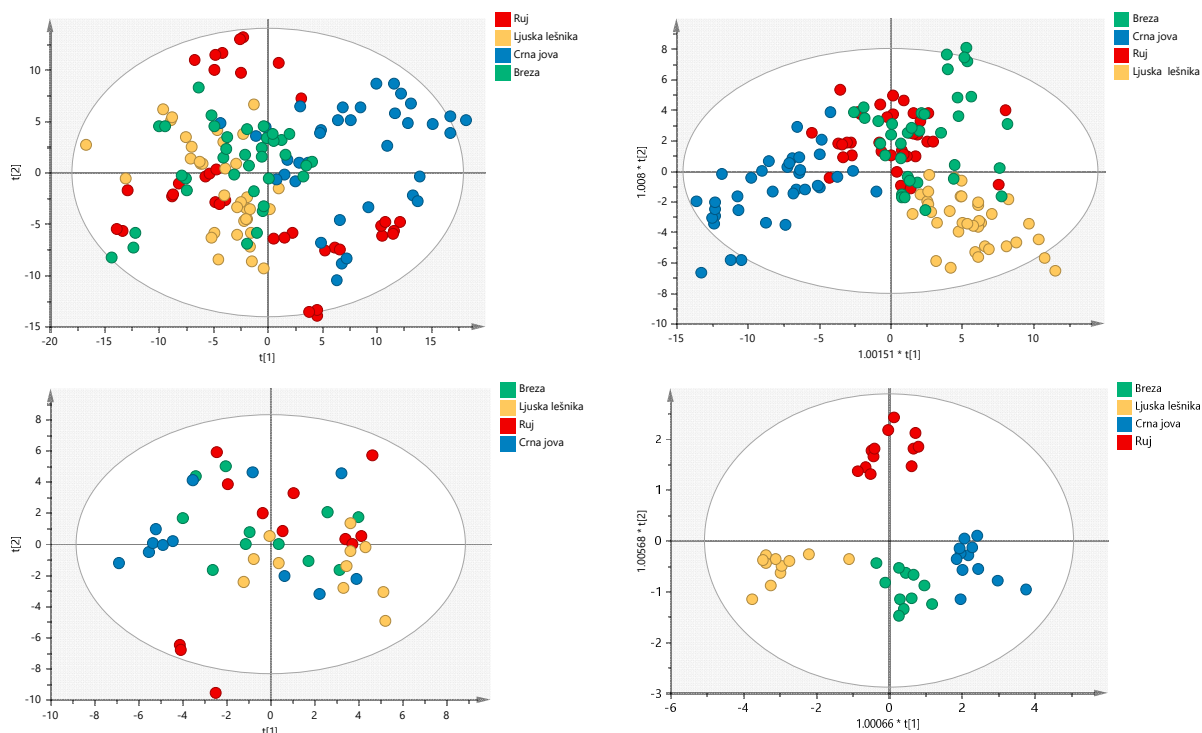
|                             | Members | Correct | Mlada | Stara | No class (YPred <= 0) |
|-----------------------------|---------|---------|-------|-------|-----------------------|
| <b>Mlada</b>                | 72      | 100%    | 72    | 0     | 0                     |
| <b>Stara</b>                | 36      | 97.22%  | 1     | 35    | 0                     |
| <b>Nedefinisana starost</b> | 36      |         | 22    | 14    | 0                     |
| Total                       | 144     | 99.07%  | 95    | 49    | 0                     |
| Fisher's prob.              | 1.3e-27 |         |       |       |                       |

Ukoliko bismo primenili formirani SIMCA model na uzorke nepoznate starosti, bili bi podjednako raspoređeni između dve klase, kao što je to prikazano na **Slici 135**. Na osnovu prikazanog predikcionog modela se zaključuje da uzorci nepoznate starosti predstavljaju uzorke među kojim ima onih koji bi se potencijalno mogli svrstati kao mlada, onih koji po modelu pripadaju starim, ali i onih koji su u prelaznom stadijumu.



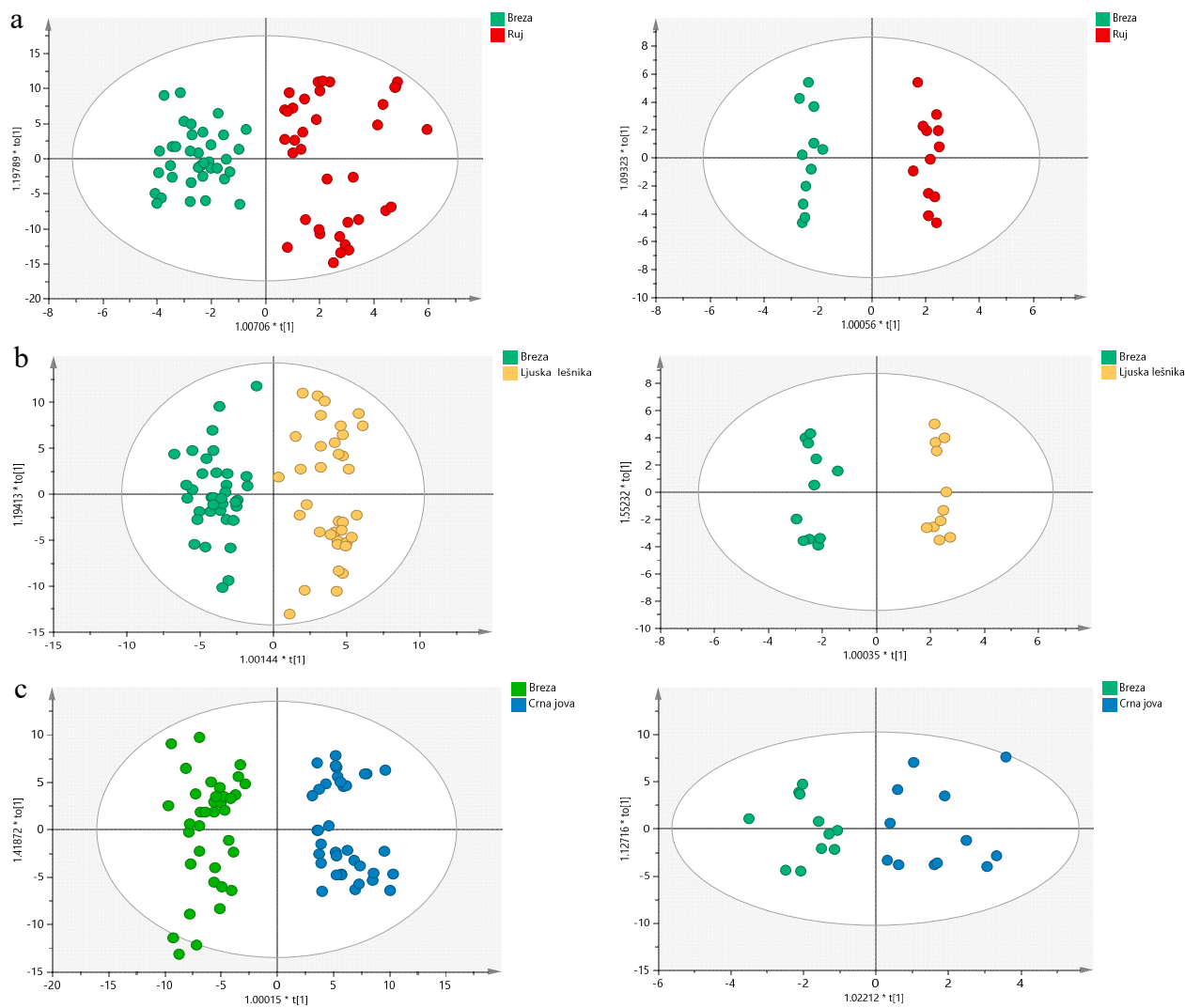
**Slika 135.** Prikaz grafika rezultata SIMCA predikcionog modela za neklasifikovane uzorake (plavo bojeni) u modelu klasifikacije na osnovu različite starosti prikazanom na **Slici 129**.

Analiziran je uticaj različitih podloga (supstrata) na kojima su plodonosna tela kultivisana. Formirani su PCA i OPLS-DA modeli na osnovu FTIR i NMR spektralnih podataka, prikazani na **Slici 136**. U PCA modelima uočava se određeni stepen grupisanja uzoraka pojedinačnih podloga u podskupove. Formirani su grupni OPLS-DA modeli u kojima su jasnije definisani pojedinačni podskupovi zasnovani na različitosti podloga, na kojima su analizirani uzorci gajeni.



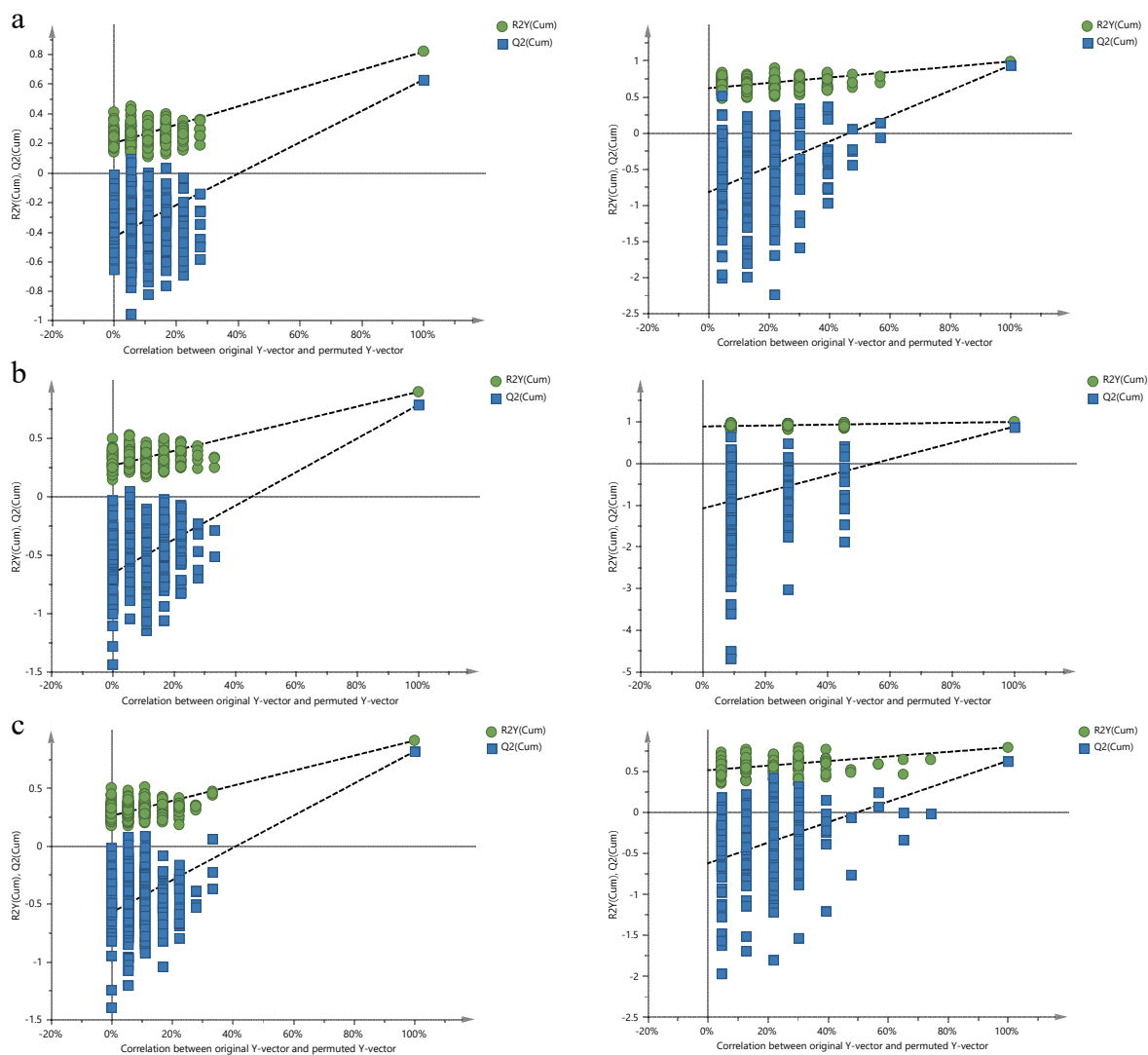
**Slika 136.** PCA (levo) i OPLS-DA (desno) modeli na osnovu rezultata FTIR (gore) i HR MAS NMR-a (dole).

Pored postojanja velikog broja klasa, uočava se jasno grupisanje analiziranih uzoraka u zavisnosti od podloge na kojoj su gajeni. Radi lakše analize, formirani su pojedinačni modeli metaboličkih profila plodonosnih tela uzoraka gajenih na brezi, supstratu na kome se javlja *F. betulina* u prirodi, sa plodonosnim telima gajenim na ruju, ljusci lešnika i crnoj jovi.



**Slika 137.** Uporedni prikaz grafika rezultata OPLS-DA modela dobijenih na osnovu FTIR (levo) i HR MAS NMR analize (desno) u zavisnosti od podloge za gajenje i dobijanje plodonosnih tela a) breza i ruj, b) breza i ljuska lešnika i c) breza i crna jova.

Za validaciju OPLS-DA modela (**Slika 137**) primenjeni su permutacioni i CV-ANOVA testovi (**Slika 138** i **Tabela 26**).

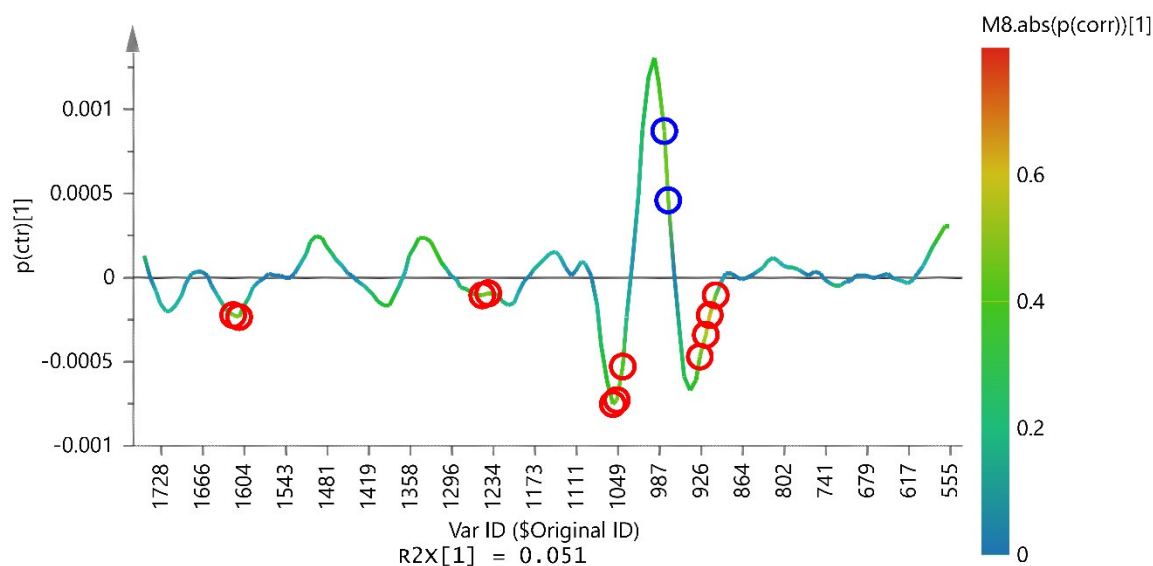


**Slika 138.** Permutacioni test za OPLS-DA modele dobijene na osnovu FTIR (levo) i HR MAS NMR analize (desno) u zavisnosti od podloge za gajenje i dobijanje plodnosnih tela a) breza i ruj, b) breza i ljuska lešnika i c) breza i crna jova.

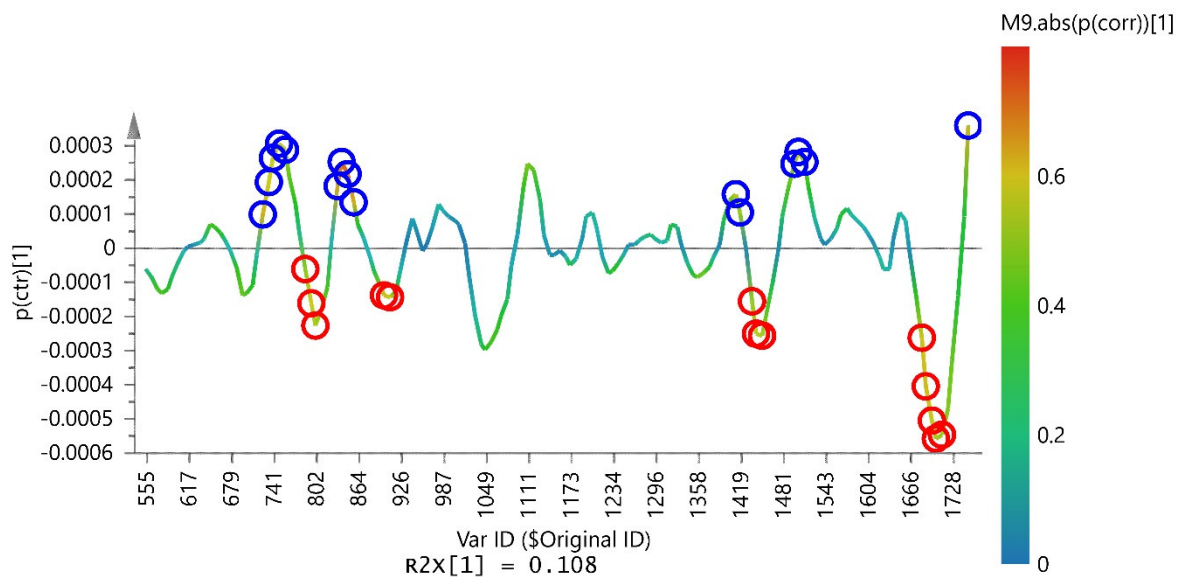
**Tabela 26.** Statistički parametri prikazanih modela.

|               | Metoda                    | Komponente<br>(predviđene +<br>ortogonalne) | R <sup>2</sup> X<br>ortogonalna | R <sup>2</sup> Y<br>ukupna | Q <sup>2</sup> | p<br>(CV-ANOVA)        |
|---------------|---------------------------|---|---------------------------------|----------------------------|----------------|------------------------|
| FTIR          | breza i ruj               | 1+5   | 0,820                           | 0,817                      | 0,628          | 6,97*10 <sup>-9</sup>  |
|               | breza i ljuska<br>lešnika | 1+8   | 0,878                           | 0,894                      | 0,782          | 9,46*10 <sup>-12</sup> |
|               | breza i crna<br>jova      | 1+7   | 0,936                           | 0,908                      | 0,815          | 1,07*10 <sup>-14</sup> |
| HR MAS<br>NMR | breza i ruj               | 1+3   | 0,797                           | 0,985                      | 0,931          | 7,24*10 <sup>-7</sup>  |
|               | breza i ljuska<br>lešnika | 1+5   | 0,831                           | 0,982                      | 0,867          | 0,00156                |
|               | breza i crna<br>jova      | 1+2   | 0,748                           | 0,788                      | 0,623          | 0,00813                |

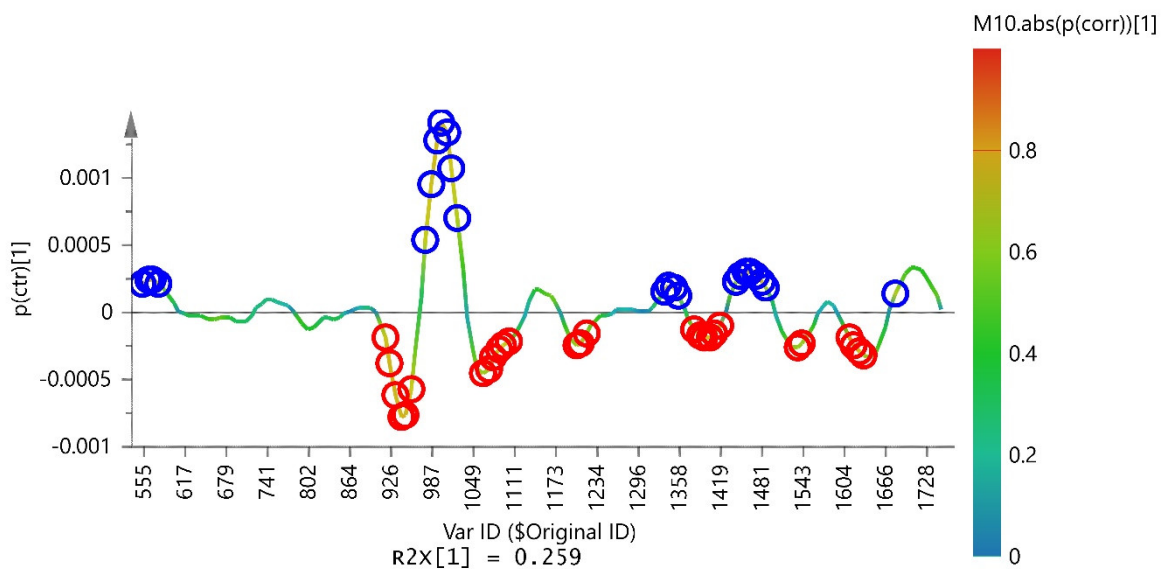
Gotovo u svim slučajevima dobijeni su OPLS-DA modeli sa pogodnim R<sup>2</sup> i Q<sup>2</sup> vrednostima. Kod modela dobijenog na osnovu HR MAS NMR spektroskopskih podataka uzorka gajenih na brezi i crnoj jovi, dobijen je model sa parametrima i rezultatom validacionih testova bliskim granicama prihvatljivosti, te je izuzet iz dalje analize. Za određivanje karakterističnih promenljivih, za svaku od podloga, primenjeni su isti kriterijumi kao i za određivanje markera sazrevanja plodonosnih tela. Dobijeni rezultati predstavljeni su S-linijama za svaki od analiziranih modela (**Slike 139 – 141**). Na ovaj način su određene karakteristične promenljive za određeni tip podloge.



**Slika 139.** Grafički prikaz, u formi S-linije, karakterističnih promenljivih za uzorke gajene na brezi (negativno orijentisane) i na ruju (pozitivno orijentisane). Crveno i plavo su obeležene promenljive karakteristične za uzorke gajene na određenoj podlozi.

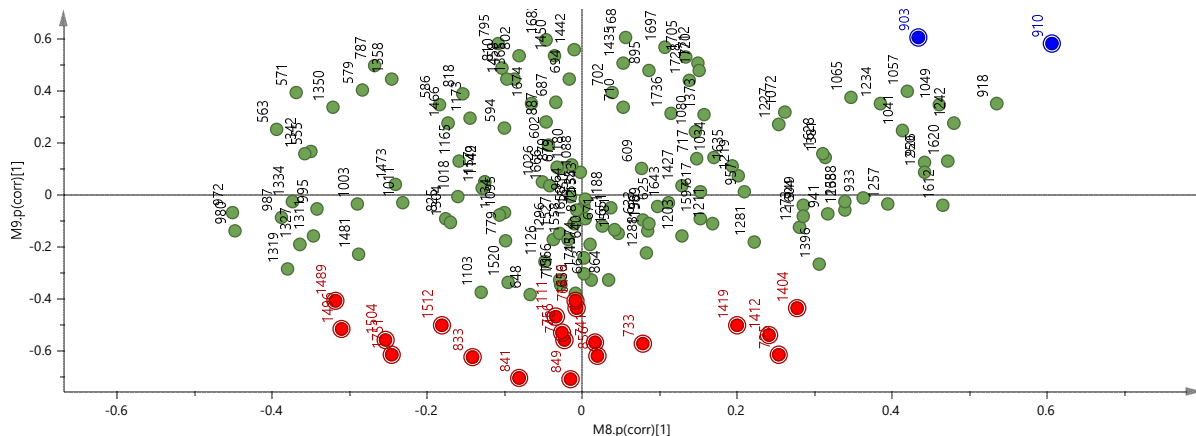


**Slika 140.** Grafički prikaz, u formi S-linije, karakterističnih promjenljivih za uzorke gajene na brezi (negativno orijentisane) i na ljsuci lešnjaka (pozitivno orijentisane). Crveno i plavo su obeležene promjenljive karakteristične za uzorke gajene na određenoj podlozi.

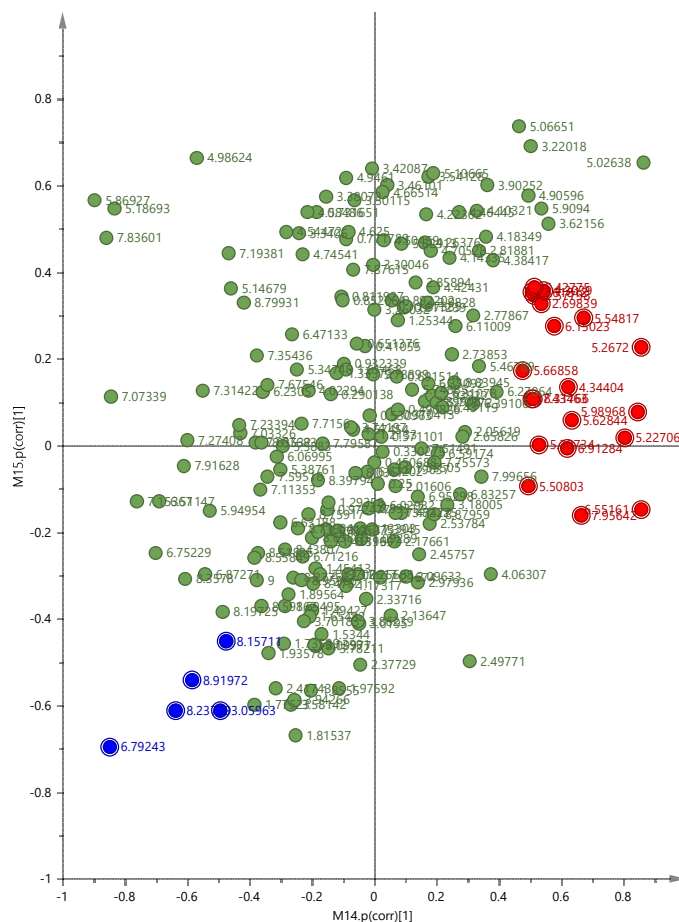


**Slika 141.** Grafički prikaz, u formi S-linije, karakterističnih promjenljivih za uzorke gajene na brezi (negativno orijentisane) i na crnoj jovi (pozitivno orijentisane). Crveno i plavo su obeležene promjenljive karakteristične za uzorke gajene na određenoj podlozi.

Dodatna potvrda dobijena je iz SUS grafika (eng. Shared and Unique Structures) koji predstavlja grafičku distribuciju promjenljivih baziranu na rezultatima poređenja dva nezavisna modela sa jednim zajedničkim setom podataka (**Slike 142 – 146**). U ovom slučaju to su spektralni podaci za plodnosna tela dobijena gajenjem na brezi.

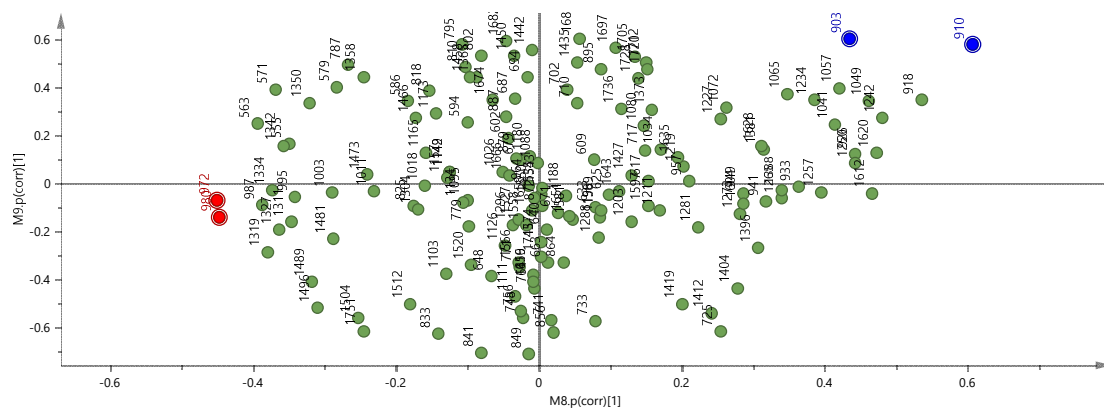


**Slika 142.** SUS grafik OPLS-DA modela breze i ruja i modela breze i ljeske dobijenih na osnovu FTIR rezultata. Plavom bojom su označene promenljive karakteristične za plodnosna tela dobijena gajenjem na brezi, a crvenom, gajenjem na ruju.

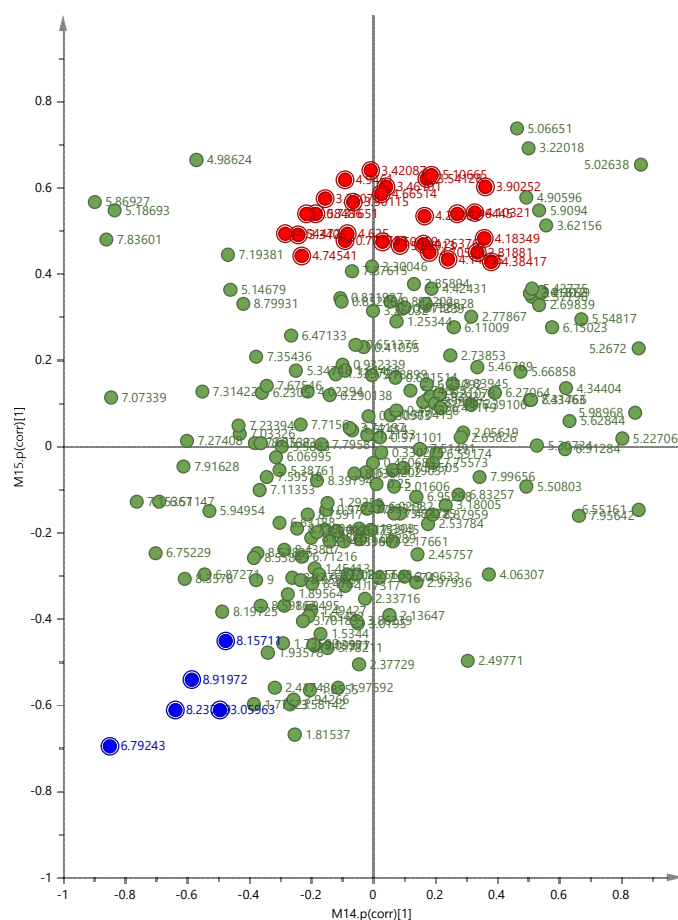


**Slika 143.** SUS grafik OPLS-DA modela breze i ruja i modela breze i ljeske dobijenih na osnovu HR MAS NMR rezultata. Plavom bojom su označene promenljive karakteristične za plodnosna tela dobijena gajenjem na brezi, a crvenom, gajenjem na ruju.

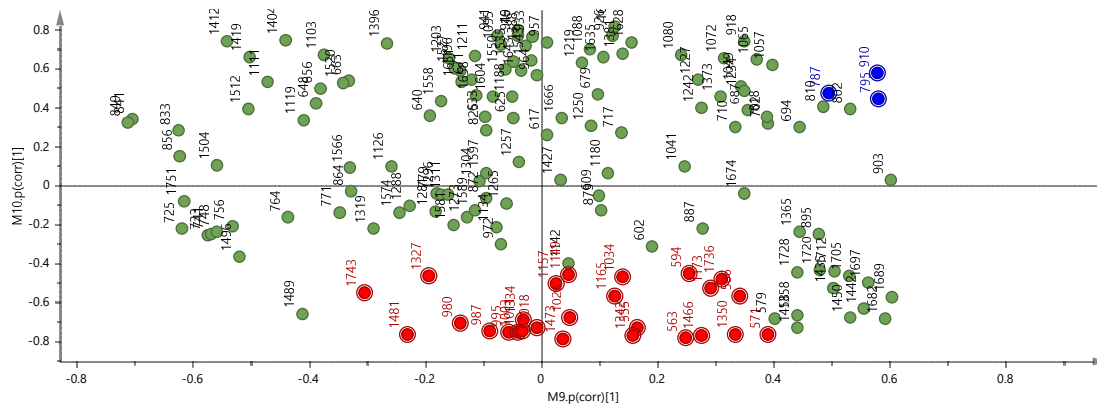




**Slika 144.** SUS grafik OPLS-DA modela breze i ruja i modela breze i ljuske lešnika dobijenih na osnovu FTIR rezultata. Plavom bojom su označene promenljive karakteristične za plodnosna tela dobijena gajenjem na brezi, a crvenom, gajenjem na ljusci od lešnika.



**Slika 145.** SUS grafik OPLS-DA modela breze i ruja i modela breze i ljuske lešnika dobijenih na osnovu HR MAS NMR rezultata. Plavom bojom su označene promenljive karakteristične za plodnosna tela dobijena gajenjem na brezi, a crvenom, gajenjem na ljusci od lešnika.



**Slika 146.** SUS grafik OPLS-DA modela breze i ruja i modela breze i crne jove dobijenih na osnovu FTIR rezultata. Plavom bojom su označene promenljive karakteristične za plodnosna tela dobijena gajenjem na brezi, a crvenom, gajenjem na crnoj jovi.

Na osnovu analize dobijenih rezultata, utvrđeno je da su FTIR i HR MAS NMR spektroskopske tehnike pogodne za praćenje promena u hemijskom sastavu gljiva, nastalih promenom supstrata za kultivaciju. Za određene supstrate moguće je identifikovati promenljive, koje karakterišu plodnosna tela kultivisana na istim. U slučaju modela dobijenih za uzorke gajene na brezi, ruju i ljusci lešnika iz SUS grafika se izdvajaju promenljive  $\delta_H$  6,79 i 3,06, karakteristične za plodnosna tela dobijena gajenjem na brezi. Promenljive koje odgovaraju signalima na u oblastima  $\delta_H$  3,25-3,55, 4,10-4,30 i 4,40-4,70, najverovatnije potiču od šećernih komponenti kao što su  $\beta$ -glukopiranoza i  $\beta$ -fruktofuranosa. Kod plodnosnih tela dobijenih gajenjem na ruju, kao značajne promenljive za klasifikaciju izdvojeni su signali fumarne kiseline na  $\delta_H$  6,55, aromatični signali na  $\delta_H$  6,0, 6,9 i 7,4, signali olefinskih protona u oblasti  $\delta_H$  5,20-5,50, kao i signali na  $\delta_H$  2,65 i 4,35 iz jabučne kiseline.<sup>132</sup> Nešto bolji rezultati validacionih testova dobijeni su za modele na osnovu FTIR spektralnih podataka. Potencijalni uzrok za to leži u činjenici da većina promenljivih, koje su identifikovane kao markeri za pojedinačne podloge, potiče od makromolekula. Pulsna sekvenca primenjena u NMR eksperimentu eliminiše signale makromolekula.

U prikazanim SUS graphicima kao i S-linjama promenljive na talasnim brojevima 903 i 910  $\text{cm}^{-1}$  su označene kao markeri za uzorke gajane na brezi. Navedene trake potiču od  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukana. Kada se uporede markeri karakteristični za uzorke gajene na ljusci lešnika u odnosu na uzorke sa breze, izdvajaju se promenljive na 1751 i 725-764  $\text{cm}^{-1}$ , koje odgovaraju estrima masnih kiselina. Promenljive karakteristične za uzorke gajene na crnoj jovi su 987-1011, 1342-1350 i 1466-1481  $\text{cm}^{-1}$  i pripadaju trakama karakterističnim za polisaharide. Kod uzoraka gajenih na ruju, izdvajaju se dve promenljive na 972 i 980  $\text{cm}^{-1}$ , koje odgovaraju C–O valnecionim trakama ugljenih hidrata (**Tabela 23**).<sup>133</sup>

### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1. Instrumenti i rastvarači

IR spektri izolovanih jedinjenja snimani su na uređaju Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR ATR tehnikom sa dijamantom. Snimanje i obrada spektara urađena je u OMNIC 7.0 programu. Spektri su snimljeni u srednjoj infracrvenoj oblasti od 400 do 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

Za potrebe metabolomičke studije osušeni i sprašeni uzorci plodonosnih tela, nakon četiri uzorkovanja sa svake od podloga, snimani su u triplikatu u oblasti od 500 do 1800  $\text{cm}^{-1}$  na uređaju Thermo Scientific Nicolet SUMIT FT-IR ATR tehnikom sa dijamantom. Za snimanje je korišćen program Paradigma 1.0, a obrada je vršena u OMNIC programu.

U okviru ove doktorske disertacije korišćene su dve različite NMR tehnike, NMR tečnog i polučvrstog stanja (HR MAS - High resolution-magic angle spinning nuclear magnetic resonance). Za snimanje NMR spektara rastvora korišćen je Bruker 500 Avance III (500 MHz za  $^1\text{H}$  i 125 MHz za  $^{13}\text{C}$ ) NMR spektrometar i deuterisani rastvarači: hloroform- $d$ , metanol- $d_4$  i piridin- $d_5$ . Za snimanje su korišćene BBI i BBO Bruker probe širokih opsega za kivete prečnika 5 mm. Kao interni standard korišćen je tetrametilsilan (TMS). Spektri su snimani na temperaturi od 298 K.

Za potrebe metabolomičke studije snimljeni su NMR spektri polučvrstog stanja na Bruker 600MHz Avance II+ NMR spektrometru (600 MHz za  $^1\text{H}$  i 150 MHz za  $^{13}\text{C}$ ) na Institutu za organsku hemiju sa centrom za fitohemiju, Bugarske akademije nauka u Sofiji. Kao medijum je korišćena deuterisana voda ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Natirjumova so 3-trimetilsilil propanske kiseline-2,2,3,3- $d_4$  (TSP- $d_4$ ), korišćena je kao interni standard. Uzorci su snimani na Bruker probi za polučvrsto stanje sa rotacijom pod magičnim uglom. Korišćena je četvoromilimetarska proba i cirkonijumski rotori zapremine 50  $\mu\text{l}$  sa silikonskim turbinama. Odmereno je po 100 mg od svakog uzorka koji je prethodno osušen pod strujom vazduha na temperaturi od 55  $^\circ\text{C}$  i usitnjen do finog praha. U svaki uzorak dodato je 300  $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$  sa dodatim standardom TSP- $d_4$ , koncentracije 9,94 mg/ml. Natopljeni uzorci su mehanički izmešani do forme paste i kao takvi korišćeni za punjenje rotora. Spektri su snimani na temperaturi od 298 K pri rotaciji uzorka od 5 kHz. Za podešavanje magičnog ugla korišćen je KBr ( $^{79}\text{Br}$ ). Snimani su  $^1\text{H}$  NMR eksperimenti, primenom standardne pulsne sekvence *zg30* za određivanje tačne frekvencije signala vode i modifikovana *cpmg* pulsna sekvenca za metabolomičku studiju. U *cpmg* sekvenci je izvršena modifikacija *spin echo* dela kako bi se izbegla distorzija signala usled *J* modulacije.

Za određivanje specifične rotacije,  $[\alpha]^{22}_{\text{D}}$  korišćen je polarimetar AUTOPOL®IV, Rudolph Research Analytical, a kao rastvarač korišćen je metanol.

Kolonska hromatografija (korišćena za frakcionisanje etilacetatnog ekstrakta) je rađena na silika gelu 60, CC (Silica gel 60, 0,063–0,200 mm, 70–230 mesh, ASTM, Merck), korišćena za frakcionisanje etilacetatnog ekstrakta.

Prečišćavanje frakcija sa kolonske hromatografije i izolovanje čistih jedinjenja izvršeno je primenom reverzno fazne visokoefikasne tečne hromatografije, RP-HPLC na tečnom hromatografu Agilent Technologies 1100 Series opremljenom DAD detektorom i autosemplerom. Korišćena je Zorbax Eclipse XDB-C18 (i.d. 9,4 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ , veličina pora 80 Å) kolona.

Za praćenje toka hromatografije na koloni i izbor najpogodnijeg eluenta korišćena je analitička tankoslojna hromatografija (aluminijumske ploče Al TLC silica gel 60, UV aktivne F<sub>254</sub>, Merck). Pločice su analizirane pod UV lampom, a zatim izazivane koncentrovanom sumpornom kiselinom i cerijum-molibdatom (CAM reagensom) uz zagrevanje.

Tečno-masene hromatografske analize (LC/MS) urađene su na Agilent Technologies 1200 Series tečnom hromatografu opremljenom DAD detektorom i autosemplerom povezanim sa Agilent Technologies 6210 Time-of-Flight LC/MS sistemom. Za hromatografisanje je korišćena mobilna faza: 0,2 % HCOOH/CH<sub>3</sub>CN 1:1, pri protoku od 0,2 ml/min. Maseni spektri visoke rezolucije su dobijeni snimanjem pozitivno i/ili negativno naelektrisanih jona elektrosprej jonizacionom tehnikom (ESI). Maseni spektri su snimani pri sledećim uslovima: napon na kapilari 4000 V, temperatura i protok gasa za sušenje 350 °C, 12 l/min, pritisak na raspršivaču 45 psi, napon fragmentora 140 V. Maseni spektri su snimljeni u opsegu masa od 100 do 3200 *m/z*. Za snimanje i obradu podataka korišćen je program MassHunter Workstation.

Za dobijanje frakcija bogatih triterpenima korišćeni su rastvarači analitičke čistoće, dodatno prečišćeni destilacijom i osušeni sa anhidrovanim kalcijum-hloridom ili natrijum-sulfatom.

Za HPLC i LC/MS korišćeni su rastvarači HPLC odnosno HPLC-MS čistoće.

Kao standard D-glukoze korišćen je komercijalni proizvod (Tokyo Chemical Industry, TCI, Belgium).

Pri određivanju citiotoksične aktivnosti korišćene su ćelijske linije humane akutne promijelocitne leukemije (HL-60), adenokarcinoma pluća (A549) i fibroblasti pluća humanih fetusa (MRC-5), komercijalni proizvodi American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, SAD; MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) komercijalni proizvod Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD i Multiskan EX Thermo Labsystems plate reader, Waltham, MA, SAD.

Za određivanje protektivnog efekta na DNK humanih limfocita korišćeni su: amifostin WR-2721 (S-2[3-aminopropilamino]-etilfosfotionska kiselina (98 %)), komercijalni proizvod kompanije Marligen-Biosciences, USA. Mitomicin C, RPMI 1640 medium, Fitohemaglutinin i Citohalasin B su komercijalni proizvodi kompanije Invitrogen-Gibco-BRL, Beč, Austrija. Sredstvo za bojenje slajdova alkalni Giemsa (2 %) je komercijalni proizvod kompanije Sigma-Aldrich, Beč, Austrija i natrijum-hlorid je komercijalni proizvod kompanije Merck Sharp & Dohme GmbH, Wien, Austrija.

## 3.2. Fungalni materijal

### 3.2.1. Plodonosna tela *F. betulina* iz prirode

Plodonosna tela su sakupljena u okolini Valjeva u ataru sela Ogladenovac u novembru 2016. godine. Geografske koordinate lokacije su 44 24'10.4 N, 19 46'16.3 E. Plodonosna tela su identifikovana od strane dr Aleksandra Kneževića i vaučer br. BEOFB1011 je deponovan u Botaničkoj bašti „Jevremovac“, Univerziteta u Beogradu – Biološkog fakulteta. Prikupljeni materijal (2 kg) je korišćen za izolovanje sekundarnih metabolita triterpenskog tipa.

Izolovanje genetičkog materijala i analiza genske sekvence urađeno je u Ebersbergu (Nemačka) primenom ITS metode (interni transkribovani region, eng. Internal Transcribed Spacer).<sup>134</sup> Za ITS sekvencionisanje korišćeni su ITS1/ITS4 prajmeri. Pomoću mini kita (DNeasy Plant Mini Kit Qiagen, Valencia, CA, SAD) izolovan je DNK materijal iz 50 mg suvog micelijuma, sedam dana stare kulture. Umnožavanje PCR-om izvršeno je u 35 amplifikacionih ciklusa: početna denaturacija na 95 °C tokom četiri minuta, zatim u svakom od ciklusa umnožavanja denaturacija umnoženih segmenata na 95 °C tokom 30 sekundi, vezivanje prajmera na 52 °C tokom jednog minuta i umnožavanje DNK segmenata na 72 °C tokom jednog minuta sa finalnim produžetkom na 72 °C tokom sedam minuta.<sup>135</sup> Nakon toga, PCR proizvodi su elektroforetski razdvojeni i prečišćeni za sekvenciranje. Dobijena sekvencija je upoređena sa sekvencama koje se nalaze u GenBank NCBI bazi

sekvenci (eng. National Center for Biotechnology Information GenBank – Banka gena nacionalnog centar za biotehnoške informacije, SAD) radi identifikacije. Dobijena sekvenca je deponovana u GenBank NCBI bazi sekvenci.

### 3.2.2. Gajenje (kultivacija) plodonosnih tela *F. betulina* na različitim podlogama

Kultivacija *F. betulina* u cilju dobijanja plodonosnih tela vršena je u laboratorijskim uslovima po metodi Pleszczyńska i saradnika, uz male modifikacije.<sup>33</sup>

Supstrat od cerealiya za kultivaciju micelije i inokulaciju (eng. spawn) je pripreman korišćenjem pšeničnih zrna kao podloge. Priprema je obuhvatila: imbibiciju u destilovanoj vodi tokom 24 h, kuvanje na 100 °C tokom 20 min i sterilizaciju ocedenog materijala u staklenim teglama za kultivaciju na 114 °C tokom 60 min. Nakon toga usledila je inokulacija sa 25 micelijskih diskova (Ø 0,5 cm, sa sedam dana stare culture *F. betulina* na MEA) i inkubacija u mraku na 25 °C tokom 14 dana.

Supstrat za kultivaciju plodonosnih tela je pripreman mešanjem osnovne supstratne komponente (80 %) i organske smeše (20 %). Za osnovnu supstratnu komponentu zasebno su korišćene mlevene unutrašnje ljuske lešnika (*Corylus avellana*) i piljevina stabla ruja (*Cotinus coggygria*), crne jove (*Alnus glutinosa*) i breze (*Betula alba*), potapani u ključalu vodu tokom 12 h, a zatim ceđeni pre pravljenja supstrata. Organska smeša je napravljena od pšeničnih mekinja, ražanih mekinja, ovsenih mekinja, kukuruznog griza, prosa i saharoze, u odnosu 30:30:15:15:5:5. Radi postizanja optimalne pH vrednosti supstratu je dodavan kalcijum-karbonat (10 g/kg). Nakon pripreme supstrata, usledilo je punjenje polipropilenskih kesa za gajenje plodonosnih tela sa mikroporoznim filterom (SaCO<sub>2</sub>) supstratom (1000 g) relativne vlažnosti oko 60 %. Zatim, usledila je sterilizacija na 114 °C tokom 120 min, hlađenje supstrata na sobnoj temperature u sterilnoj komori preko noći i inokulacija sa 10 g micelijom obraslih zrna pšenice.

Kese su inkubirane na 22 ± 2 °C u mraku 14 dana, nakon čega su izlagane temperaturnom šoku (2-4 °C, 48 h). Po završetku temperaturnog šoka kese su perforirane laboratorijskim bušaćem, a kultivacija je nastavljena na 16-18 °C uz relativnu vlažnost vazduha od 80-85 % i odgovarajuću ventilaciju, radi održavanja koncentracije CO<sub>2</sub> (<1000 ppm). U toku fruktifikacije obezbeđen je dnevno-noćni režim svetlosti (1000 lux, 10 h dnevno). Plodonosna tela su sakupljana periodično (10, 20, 30 i 60 dana nakon izlaganja temperaturnom šoku), od faze primordije do faze zrelih bazidiokarpa.

Kultivisana plodonosna tela *F. betulina* su bila predmet metabolomičke studije određivanja metaboličkih profila usled različite starosti i supstrata na kojima su gajena, primenom FTIR i HR MAS NMR spektroskopskih tehnika.

### 3.3. Priprema ekstrakata i izolovanje čistih jedinjenja

#### 3.3.1. Ekstrakcija plodonosnih tela *F. betulina*

Plodonosna tela *F. betulina* su osušena na vazduhu. Usitnjeno je 200 g suvog materijala, a zatim ekstrahovano smešom rastvarača hloroform/metanol (v/v 2:1), postupkom maceracije na sobnoj temperaturi tokom tri dana. Ekstrakcija je ponovljena još dva puta, nakon spajanja i uparavanja ekstrakata, dobijeno je 22,4 g čvrstog ostatka. Čvrsti ekstrakt je suspendovan u vodi (200 ml) i postupkom tečno-tečne ekstrakcije, ekstrahovan sa etil-acetatom (5 × 200 ml). Etil-acetatni ekstrakt je spojen, osušen sa anhidrovanim natrijum-sulfatom i uparen na rotacionom vakuum uparivaču. Dobijeno je 11,4 g etil-acetatnog ekstrakta.

#### 3.3.2. Frakcionisanje ekstrakta hromatografijom na koloni

Etil-acetatni ekstrakt (7,6 g) je frakcionisan hromatografijom na koloni silika gela dimenzija 53 × 4,7 cm, kombinacijom gradijentnog i izokratnog eluiranja. Početni sistem za eluiranje je bio 100 % n-heksan, a nakon toga je povećavana polarnost do 100 % etil-acetata, pa nastavljeno sa sistemom metanol/etil-acetat. Tok hromatografije dat je u **Tabeli 27**. Dobijene su ukupno 1092 frakcije od po 20 ml. Tok hromatografije je praćen analitičkom tankoslojnom hromatografijom (TLC), na osnovu koje su, na kraju, spojene frakcije sa sličnim  $R_f$  vrednostima. Na ovaj način, dobijeno je 68 finalnih frakcija (**Tabela 28**).

**Tabela 27.** Tok gravitacione hromatografije na koloni prilikom razdvajanja etil-acetatnog ekstrakta *F. betulina*.

| Broj frakcije | n-Heksan | Etil-acetat | Broj frakcije | Etil-acetat | Metanol |
|---------------|----------|-------------|---------------|-------------|---------|
|               | %        |             |               | %           |         |
| 0-30          | 100      | -           | 713-731       | 97          | 3       |
| 31-55         | 85       | 15          | 732-763       | 95          | 5       |
| 56-73         | 82       | 18          | 764-825       | 93          | 7       |
| 74-96         | 80       | 20          | 826-832       | 90          | 10      |
| 97-128        | 77       | 23          | 833-844       | 88          | 12      |
| 129-154       | 75       | 25          | 845-886       | 85          | 15      |
| 155-218       | 73       | 27          | 887-895       | 83          | 17      |
| 219-247       | 70       | 30          | 896-907       | 80          | 20      |
| 248-273       | 67       | 33          | 908-929       | 77          | 23      |
| 274-285       | 65       | 35          | 930-941       | 75          | 25      |
| 286-304       | 62       | 38          | 942-951       | 70          | 30      |
| 305-335       | 60       | 40          | 952-966       | 65          | 35      |
| 336-369       | 57       | 43          | 967-972       | 60          | 40      |
| 370-382       | 55       | 45          | 973-989       | 55          | 45      |
| 383-405       | 53       | 47          | 990-1004      | 50          | 50      |
| 406-468       | 50       | 50          | 1005-1016     | 45          | 55      |
| 469-480       | 47       | 53          | 1017-1043     | 40          | 60      |
| 481-503       | 45       | 55          | 1044-1080     | 30          | 70      |
| 504-517       | 40       | 60          | 1081-1086     | 20          | 80      |
| 518-533       | 37       | 63          | 1087-1090     | 10          | 90      |
| 534-550       | 35       | 65          | 1091-1092     | -           | 100     |
| 551-563       | 32       | 68          |               |             |         |
| 564-575       | 30       | 70          |               |             |         |
| 576-587       | 25       | 75          |               |             |         |
| 588-617       | 22       | 78          |               |             |         |
| 618-631       | 20       | 80          |               |             |         |
| 632-640       | 17       | 83          |               |             |         |
| 641-650       | 15       | 85          |               |             |         |
| 651-661       | 13       | 87          |               |             |         |
| 662-669       | 10       | 90          |               |             |         |
| 670-680       | 7        | 93          |               |             |         |
| 681-691       | 5        | 95          |               |             |         |
| 692-697       | 3        | 97          |               |             |         |
| 698-712       |          | 100         |               |             |         |

**Tabela 28.** Spojene frakcije nakon prečišćavanja gravitacionom hromatografijom na koloni.

| Spojene frakcije | Oznaka spojenih frakcija | Spojene frakcije | Oznaka spojenih frakcija |
|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|
| 1-29             | F. <sub>1</sub>          | 431-442          | F. <sub>35</sub>         |
| 30-48            | F. <sub>2</sub>          | 443-467          | F. <sub>36</sub>         |
| 49-58            | F. <sub>3</sub>          | 468-480          | F. <sub>37</sub>         |
| 59-63            | F. <sub>4</sub>          | 481-516          | F. <sub>38</sub>         |
| 64-79            | F. <sub>5</sub>          | 517-536          | F. <sub>39</sub>         |
| 80-100           | F. <sub>6</sub>          | 537-544          | F. <sub>40</sub>         |
| 101-106          | F. <sub>7</sub>          | 545-566          | F. <sub>41</sub>         |
| 107-123          | F. <sub>8</sub>          | 567-594          | F. <sub>42</sub>         |
| 124-130          | F. <sub>9</sub>          | 595-598          | F. <sub>43</sub>         |
| 131-139          | F. <sub>10</sub>         | 599-630          | F. <sub>44</sub>         |
| 140-147          | F. <sub>11</sub>         | 631-652          | F. <sub>45</sub>         |
| 148-170          | F. <sub>12</sub>         | 653-654          | F. <sub>46</sub>         |
| 171-193          | F. <sub>13</sub>         | 655-695          | F. <sub>47</sub>         |
| 194-202          | F. <sub>14</sub>         | 696-716          | F. <sub>48</sub>         |
| 203-214          | F. <sub>15</sub>         | 717-740          | F. <sub>49</sub>         |
| 215-220          | F. <sub>16</sub>         | 741-758          | F. <sub>50</sub>         |
| 221-225          | F. <sub>17</sub>         | 759-777          | F. <sub>51</sub>         |
| 226-228          | F. <sub>18</sub>         | 778-795          | F. <sub>52</sub>         |
| 229-233          | F. <sub>19</sub>         | 796-811          | F. <sub>53</sub>         |
| 234-259          | F. <sub>20</sub>         | 812-849          | F. <sub>54</sub>         |
| 260-272          | F. <sub>21</sub>         | 850-863          | F. <sub>55</sub>         |
| 273-289          | F. <sub>22</sub>         | 864-874          | F. <sub>56</sub>         |
| 290-311          | F. <sub>23</sub>         | 875-890          | F. <sub>57</sub>         |
| 312-318          | F. <sub>24</sub>         | 891-930          | F. <sub>58</sub>         |
| 319-328          | F. <sub>25</sub>         | 931-947          | F. <sub>59</sub>         |
| 329-332          | F. <sub>26</sub>         | 948-975          | F. <sub>60</sub>         |
| 333-336          | F. <sub>27</sub>         | 976-983          | F. <sub>61</sub>         |
| 337-340          | F. <sub>28</sub>         | 984-992          | F. <sub>62</sub>         |
| 341-354          | F. <sub>29</sub>         | 993-1005         | F. <sub>63</sub>         |
| 355-369          | F. <sub>30</sub>         | 1006-1017        | F. <sub>64</sub>         |
| 370-375          | F. <sub>31</sub>         | 1018-1042        | F. <sub>65</sub>         |
| 376-400          | F. <sub>32</sub>         | 1043-1090        | F. <sub>66</sub>         |
| 401-420          | F. <sub>33</sub>         | 1091             | F. <sub>67</sub>         |
| 421-430          | F. <sub>34</sub>         | 1092             | F. <sub>68</sub>         |

### 3.3.3. Preparativna tankoslojna hromatografija (TLC)

Preparativna tankoslojna hromatografija je korišćena za izolovanje jedinjenja iz jednostavnijih smeša. Korišćene su aluminijumske TLC ploče sa slojem silika gela 60 F<sub>254</sub>. Razdvajana je frakcija 65 sa sistemom za razdvajanje hloroform/metanol/voda u odnosu 20:10:0,5. Nakon razdvajanja, krajnji deo ploče je izazvan sumpornom kiselinom i zagrejan, kako bi se uočile i obeležile trake na različitim R<sub>F</sub> vrednostima (0,56, jedinjenje **2** i 0,48, jedinjenje **19**), pošto jedinjenja koja su izolovana nisu UV aktivna i ne bi se videla na UV detektoru. Nakon toga na osnovu dela traka koji su se pojavili izazivanjem sumpornom kiselinom ekstrapolirane su linije duž celih ploča. Tako su obeležene dve trake, koje su zatim odvojene od nosača i ekstrahovane metanolom tokom 15 minuta na ultrazvučnom kupatilu. Dobijeni ekstrakti su procedeni i upareni na rotacionom vakuum uparivaču. U cilju izolovana jedinjenja visoke čistoće za finalno prečišćavanje korišćena je semipreparativna visokoefikasna tečna hromatografija (HPLC). Iz frakcije 65 izolovana su jedinjenja **2** i **19**.



### 3.3.4. Semipreparativna visokoefikasna tečna hromatografija

Prečišćavanje frakcija rađeno je semipreparativnom visokoefikasnom tečnom hromatografijom na HPLC sistemu Agilent Technologies 1100 na koloni Zorbax XDB-C18 (250 × 9,4 mm; 5 μm), pri konstantnom protoku od 4 ml/min i temperaturi 25 °C. Detekcija je vršena na dve talasne dužine 210 i 254 nm. Korišćeno je osam različitih programa sa mobilnom fazom koja se sastojala od sistema voda (A) i acetonitril (B). Hromatografski uslovi, broj frakcija koje su prečišćene i izolovana jedinjenja dati su u **Tabeli 29**.

**Tabela 29.** Hromatografski uslovi za semipreparativno prečišćavanje i mase izolovanih jedinjenja.

| Frakcija              | Mobilna faza  | Izolovana jedinjenja (mg) R <sub>t</sub>   |
|-----------------------|---|--|
| F <sub>.18</sub>      | 70-100 % B (0-20 min), 100 % B (20-25 min), 100-70 % B (25-26 min)                        | <b>18</b> (88,1) 17,8  |
| F <sub>.20</sub>      | 70-100 % B (0-15 min), 100 % B (15-20 min), 100-70 % B (20-22 min)                        | <b>12</b> (10,8) 21,0  |
| F <sub>.24 – 29</sub> | 70-100 % B (0-20 min), 100 % B (20-25 min), 100-70 % B (25-26 min)                        | <b>5</b> (7,1) 14,1; <b>6</b> (5,1) 12,5; <b>11</b> (6,4) 13,4   |
| F <sub>.30 – 31</sub> | 58-68 % B (0-20 min), 68-100 % B (20-22 min), 100 % B (22-23 min), 100-68 % B (23-24 min) | <b>9</b> (22,2) 21,0; <b>10</b> (7,4) 26,4   |
| F <sub>.35 – 37</sub> | 60-100 % B (0-25 min), 100 % B (25-30 min), 100-60 % B (30-31 min)                        | <b>7</b> (4,3) 10,8; <b>8</b> (3,7) 14,5; <b>9</b> (21,8) 13,5; <b>13</b> (2,2) 14,0; <b>30</b> (1,8) 15,8   |
| F <sub>.41 – 44</sub> | 60-100 % B (0-20 min), 100 % B (20-25 min), 100-60 % B (25-26 min)                        | <b>1</b> (3,3) 18,9; <b>3</b> (147,0) 20,8; <b>16</b> (27,7) 23,9; <b>20</b> (8,3) 20,8; <b>21</b> (4,4) 18,3; <b>22</b> (2,6) 17,2;   |
| F <sub>.47 – 49</sub> | 60-100 % B (0-25 min), 100 % B (25-30 min), 100-60 % B (30-31 min)                        | <b>3</b> (24,5) 24,1; <b>4</b> (29,1) 22,1; <b>24</b> (2,5) 6,3; <b>25</b> (2,5) 10,8  |
| F <sub>.50 – 52</sub> | 40-80 % B (0-25 min), 80-100 % B (25-35 min), 100 % B (35-37 min)                         | <b>14</b> (2,4) 30,5; <b>15</b> (2,6) 24,5; <b>17</b> (1,0) 35,3; <b>23</b> (2,1) 32,9; <b>26</b> (3,5) 14,4; <b>27</b> (1,1) 31,7; <b>28</b> (2,3) 21,4; <b>29</b> (1,4) 18,9 |
| F <sub>.57</sub>      | 80-100 % B (0-15 min), 100 % B (15-17 min), 100-80 % B (17-19 min)                        | <b>31</b> (2,8) 9,3  |
| F <sub>.65</sub>      | 60-68 % B (0-5 min), 68-100 % B (5-7 min), 100-60 % B (7-9 min)                           | <b>2</b> (1,9) 3,2; <b>19</b> (1,7) 3,4  |

Injekciona zapremina, 200 μl (konc. 10 mg/ml, MeOH); (DAD; λ = 210 nm i 254 nm), Temperatura kolone, 25 °C; protok (4 ml/min), H<sub>2</sub>O (A) + CH<sub>3</sub>CN (B).

R<sub>t</sub> – retenciono vreme (min)

### 3.3.5. Kisela hidroliza triterpenskih glikozida

Jedinjenja **27**, **28**, **29** i **31** (**Slika 3**), 0,5 mg od svakog su posebno hidrolizovana sa 2M HCl (1,0 ml), tokom 30 min, uz zagrevanje na 100 °C. Nakon hlađenja, svaka reakciona smeša je neutralisana sa zasićenim rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata (NaHCO<sub>3</sub>) do pH 7, procedena kroz HPLC 0,45 μm filter i analizirana na Dionex ICS 3000 DP LC uređaju sa elektrohemijjskim detektorom, radnom elektrodom od zlata i referentnom Ag/AgCl. Standardni rastvori D-glukoze je pripremljen rastvaranjem u ultračistoj vodi u koncentraciji od 20 μg/ml sa dodatkom 70 mg natrijum-hlorida, pošto je ta količina natrijum-hlorida prisutna u uzorcima, nakon neutralizacije. Program za analizu monosaharida: 15 % A i 85 % C (0-5,0 min); 15 % A, 2 % B i 83 % C (5,0-5,1 min); 15 % A, 2 % B i 83 % C (5,1-12,0 min); 15 % A, 4 % B i 81 % C (12,0-12,1 min); 15 % A, 4 % B i 81 % C (12,1-20,0 min); 20 % A, 20 % B i 60 % C (20,0-20,1 min); 20 % A, 20 % B i 60 % C (20,1-30,0 min). Kao mobilna faza korišćena je smeša rastvarača - 600 mM rastvor natrijum-hidorkside (A), 600

mM rastvor natrijum-acetata (B) i ultračista voda (C), brzina protoka je 0,7 ml/min. Pre analize, sistem je kondicioniran mobilnom fazom 15 % A i 85 % C, tokom 30 min. Retenciono vreme D-glukoze bilo je 5,78 min.

Kisela hidroliza frakcija 50-52 i 57 (100 mg) u kojima dominiraju jedinjenja **27**, **28**, **29** i **31** je urađena sa 1M HCl (10 ml) tokom 3 h na temperaturi od 100 °C. Nakon hlađenja, reakciona smeša je ekstrahovana etil-acetatom (3 × 10 ml) i vodeni sloj je neutralizovan zasićenim rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata. Identifikacija monosaharida je potvrđena poređenjem retencionog vremena na tankoslojnoj hromatografiji sa standardom D-glukoze, koristeći kao mobilnu fazu smešu EtOAc-*i*-PrOH-Me<sub>2</sub>CO-H<sub>2</sub>O u odnosu 20:10:7:6. Koristeći istu mobilnu fazu, urađena je preparativna tankoslojna hromatografija, nakon koje je dobijeno 2,4 mg monosaharida. Optička rotacija izolovanog monosaharida je izmerena i upoređena sa optičkom rotacijom komercijalnog standarda: D-glukoza [ $\alpha$ ]<sup>21</sup><sub>D</sub>+57 (c 0,2, H<sub>2</sub>O); standard +61 (c 0,2, H<sub>2</sub>O).

### 3.3.6. Spektroskopski podaci za nova jedinjenja

U ovom delu nalaze se spektroskopski podaci za jedinjenja **19-31**.

**Poliporenska kiselina E (19)**: bela čvrsta supstanca, [ $\alpha$ ]<sup>22</sup><sub>D</sub>+16 (c 1,0 CH<sub>3</sub>OH); IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3397, 3087, 2927, 2872, 1718, 1597, 1458, 1390, 1311, 1240, 1162, 1076, 990, 893, 684, 603 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR podaci dati u **Tabeli 16.**; HR-ESI-MS  $m/z$  557,3484 [M-H]<sup>-</sup> (izračunato C<sub>33</sub>H<sub>50</sub>O<sub>7</sub>-H, 557,3471).

**Poliporenska kiselina F (20)**: bela čvrsta supstanca, [ $\alpha$ ]<sup>22</sup><sub>D</sub>+25 (c 1,0 CH<sub>3</sub>OH); IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3503, 3083, 2946, 2875, 1745sh, 1733, 1645, 1560, 1457, 1373, 1317, 1263, 1206, 1154, 1072, 1032, 989, 894 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR podaci dati u **Tabeli 16.**; HR-ESI-MS  $m/z$  571,3640 [M-H]<sup>-</sup> (izračunato C<sub>48</sub>H<sub>60</sub>O<sub>10</sub>+HCOO, 617,3689).

**Poliporenska kiselina G (21)**: bela čvrsta supstanca, [ $\alpha$ ]<sup>22</sup><sub>D</sub>+30 (c 1,0 CH<sub>3</sub>OH); IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3364, sh 3085, 2952, 2926, 2871, 1731, 1704, 1643, 1459, 1377, 1258, 1182, 1084, 1034, 603 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR podaci dati u **Tabeli 16.**; HR-ESI-MS  $m/z$  483,3480 [M-H]<sup>-</sup> (izračunato C<sub>31</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub>-H, 483,3479).

**Poliporenska kiselina H (22)**: bela čvrsta supstanca, [ $\alpha$ ]<sup>22</sup><sub>D</sub>+35 (c 1,0 CH<sub>3</sub>OH); IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3389, sh 3082, 2925, 2869, 1707, 1644, 1563, 1457, 1453, 1379, 1256, 1204, 1071, 1035, 893, 799, 663, 599, 512, 451 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR podaci dati u **Tabeli 17.**; HR-ESI-MS  $m/z$  485,3625 [M+H]<sup>+</sup> (izračunato C<sub>31</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub>+H, 485,3643).

**Poliporenska kiselina I (23)**: bela čvrsta supstanca, [ $\alpha$ ]<sup>22</sup><sub>D</sub>+10 (c 1,0 CH<sub>3</sub>OH); IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3397, 3084, 2950, 2931, 2874, 1729, 1646, 1573, 1457, 1375, 1205, 1178, 1118, 1087, 1032, 978, 893 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR podaci dati u **Tabeli 17.**; HR-ESI-MS  $m/z$  645,4374 [M+H]<sup>+</sup> (izračunato C<sub>38</sub>H<sub>60</sub>O<sub>8</sub>+H, 644,4301).

**Poliporenska kiselina J (24)**: beli amorfnih prah, [ $\alpha$ ]<sup>22</sup><sub>D</sub>+51 (c 1,0 CH<sub>3</sub>OH); IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3405, 3087, 2959, 2878, 2821, 2741, 1702, 1638, 1594, 1457, 1381, 1355, 1248, 1207, 1110, 1078, 1024, 889, 771 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR podaci dati u **Tabeli 17.**; HR-ESI-MS  $m/z$  499,3441 [M-H]<sup>-</sup> (izračunato C<sub>31</sub>H<sub>48</sub>O<sub>5</sub>-H, 499,3441).

**Poliporenska kiselina K (25)**: beli amorfnih prah, [ $\alpha$ ]<sup>22</sup><sub>D</sub>+18 (c 1,0 CH<sub>3</sub>OH); IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3439, 3090, 2960, 2878, 1704, 1643, 1594, 1457, 1380, 1249, 1206, 1078, 1018, 893 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR podaci dati u **Tabeli 18.**; HR-ESI-MS  $m/z$  513,3597 [M-H]<sup>-</sup> (izračunato C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>O<sub>5</sub>-H, 513,3597).

**Poliporenska kiselina L (26):** bela čvrsta supstanca,  $[\alpha]^{22}_{\text{D}} + 44$  (c 1,0 CH<sub>3</sub>OH); IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  3362, 3080, 2945, 2921, 2876, 1706, 1645, 1562, 1456, 1412, 1379, 1251, 1203, 1110, 1028, 896, 671 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR podaci dati u **Tabeli 18.**; HR-ESI-MS  $m/z$  501,3592 [M+H]<sup>+</sup> (izračunato C<sub>31</sub>H<sub>48</sub>O<sub>5</sub>+H, 501,3575).

**Fomitozid L (27):** bela čvrsta supstanca,  $[\alpha]^{22}_{\text{D}} + 18$  (c 1,0 CH<sub>3</sub>OH); IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  3388, 3081, 2954, 2926, 2872, 1744, 1704, 1644, 1576, 1458, 1378, 1259, 1154, 1075, 1028, 890, 801 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR podaci dati u **Tabeli 18.**; HR-ESI-MS  $m/z$  633,37989 [M-H]<sup>-</sup> (izračunato C<sub>39</sub>H<sub>54</sub>O<sub>7</sub>-H, 633,3797).

**Fomitozid M (28):** bela čvrsta supstanca,  $[\alpha]^{22}_{\text{D}} - 10$  (c 1,0 CH<sub>3</sub>OH); IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  3379, 3081, 2959, 2926, 2874, 1734, 1645, 1573, 1458, 1374, 1254, 1075, 1028, 891, 802 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR podaci dati u **Tabeli 19.**; HR-ESI-MS  $m/z$  691,4416 [M+H]<sup>+</sup> (izračunato C<sub>39</sub>H<sub>62</sub>O<sub>10</sub>-H, 691,4287).

**Fomitozid N (29):** bela čvrsta supstanca,  $[\alpha]^{22}_{\text{D}} - 11$  (c 1,0 CH<sub>3</sub>OH); IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  3379, 3081, 2959, 2926, 2874, 1734, 1645, 1573, 1458, 1374, 1254, 1075, 1028, 891, 802 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR podaci dati u **Tabeli 19.**; HR-ESI-MS  $m/z$  829,4746 [M+Na]<sup>+</sup> (izračunato C<sub>44</sub>H<sub>70</sub>O<sub>13</sub>+Na, 829,4889).

**Poliporenska kiselina M (30):** bela čvrsta supstanca,  $[\alpha]^{22}_{\text{D}} + 12$  (c 1,0 CH<sub>3</sub>OH); IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  3397, 3081, 3031, 2959, 2929, 2874, 1737, 1698, 1580, 1457, 1382, 1247, 1211, 1091, 1069, 1030, 884 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR podaci dati u **Tabeli 19.**; HR-ESI-MS  $m/z$  482,3378 [M-H]<sup>-</sup> (izračunato C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>-H, 482,3396).

**Fomitozid O (31):** bela čvrsta supstanca,  $[\alpha]^{22}_{\text{D}} - 19$  (c 1,0 CH<sub>3</sub>OH); IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  3361, 3078, 2958, 2927, 2872, 1742, 1642, 1558, 1457, 1375, 1258, 1076, 1028, 891, 802 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR podaci dati u **Tabeli 19.**; HR-ESI-MS  $m/z$  645,4008 [M-H]<sup>-</sup> (izračunato C<sub>37</sub>H<sub>58</sub>O<sub>9</sub>-H, 645,4006).

### 3.4. Biološki testovi

#### 3.4.1. Citotoksična aktivnost

##### *Ćelijske linije*

Ćelije HL-60, A549 i MRC-5 gajene su u RPMI-1640 medijumu na 37 °C. U medijum je dodato 10% fetalnog goveđeg seruma, L-glutamina i penicilin/streptomycin (Sigma).

##### *Analiza citotoksičnosti*

DMSO štok rastvor (2 ili 5 mM) ispitivanih jedinjenja (**1-11** i **13-31**) rastvoren je u odgovarajućem hranljivom medijumu do finalnih koncentracija od 3,125 do 50 µM za ćelije kancera i od 12,5 do 200 µM za normalne ćelije MRC-5. Finalna koncentracija rastvarača (DMSO) nije prelazila 2,5 %, što je netoksična doza za ćelije. Ispitivane ćelijske linije HL-60 ( $7 \times 10^3$  ćelija/bunarić), A549 i MRC-5 ( $5 \times 10^3$  ćelija/bunarić) su tretirane tokom 72 h. Nakon toga 10 µl MMT rastvorenog u puferisanom fiziološkom rastvoru, koncentracije 5 mg/ml je dodato u svaki bunarić, koji su potom inkubirani tokom 4 h. Za rastvaranje formazana, nastalog konverzijom MMTa od strane živih ćelija, dodato je 100 µl natrijumdodecilsulfata, koncentracije 100 g/l. Nakon 24 h izmerena je apsorbancija na 570 nm uz pomoć Multiskan EX Thermo Labsystems plate readera kako bi se odredio broj živih ćelija u svakom od bunarića. Svi eksperimenti su rađeni u triplicatu.

#### 3.4.2. DNK protektivna aktivnost

Uzorci venske krvi su prikupljeni u sterilnim vakutajnerima sa heparizidom od 6 zdravih muškaraca koji nisu bili izloženi hemikalijama, lekovima, ili nekim drugim supstancama. Svi dobrovoljci su dali pismenu saglasnost za korišćenje njihovih uzoraka za potrebe istraživanja. Od svakog je prikupljeno dva puta po 5 ml krvi.

Istraživanje je sprovedeno u skladu sa etičkim kodom Svetske zdravstvene organizacije (Deklaracija iz Helsinkija iz 1964. godine, revidirana 2002. godine). Uzorci su prikupljeni u medicinskoj jedinici Instituta Vinča, a u skladu sa aktuelnim zdravstvenim i etičkim propisima Republike Srbije (2005. godine).

##### *Analiza mikronukleusa*

Prikupljeni uzorci krvi su centrifugirani kako bi se izdvojile limfocitne ćelije od ostalih elemenata krvi. Približno  $2 \times 10^6$  krvnih limfocita je zasejano u 5 ml RPMI-1640 medijuma sa dodatkom 15 % telećeg seruma i 2,4 µg/ml fitohemaglutinina. Jedan sat nakon ćelijske stimulacije, dodata je vodena suspenzija ispitivanih jedinjenja. Ćelijske kulture izolovanih limfocita su tretirane lanostanskim triterpenima (**3-6**, **9-12**, **16**, **20** i **21**) u koncentracijama 1, 2 or 4 µg/ml.

Tri kontrolna seta uzoraka su korišćena u ovom eksperimentu:

1. Netretirana ćelijska kultura (nulta kontrolna grupa),
2. Ćelijska kultura tretirana amifostinom (koncentracije 1 µg/ml), jedinjenjem koje ima DNK protektivnu ulogu (pozitivna kontrola),
3. Ćelijska kultura tretirana mitomicinom C u fosfatnom puferu (0,2 µg/ml), jedinjenjem koje izaziva pojavu mikronukleusa (negativna kontrola).

Ćelijske kulture su tokom čitavog eksperimenta inkubirane u termostatu na 37 °C. Vreme inkubacije je određeno na osnovu procene vremena potrebnog za unos, metalisanje i ekskreciju ispitivanih jedinjenja iz organizma i procenjeno je na 19 h. Nakon tretmana testiranim jedinjenjima, sve ćelijske kulture su isprane hranljivim medijumom, premeštene u 5 ml svežeg RPMI 1640 medijuma i inkubirane dodatnih 72 h.

Određena je učestalost spontanog formiranja mikronukleusa. Za produkciju mikronukleusa korišćena je modifikovana metoda.<sup>136</sup> Citohalasin B koncentracije 6 µg/mL je dodavan u ćeijske kulture, nakon 44 h od početka gajenja i tako tretirani limfociti su inkubirani tokom 24 h. Nakon

inicijalne inkubacije ćelije su isprane sa 0,9 % rastvorom natrijum-hlorida, centrifugirane i tretirane hipotoničnim rastvorom na 37 °C. Hipotonični rastvor je napravljen od 0,56 % rastvora kalijum-hlorida i 0,9 % rastvora natrijum-hlorida pomešanih u zapreminskom odnosu 1:1. Prethodno je ćelijska suspenzija potopljena u smešu metanola i sirćetne kiseline (v/v 3:1), isprana tri puta i premeštena u bunariće koji su osušeni na vazduhu i obojeni 2 % alkalnim rastvorom Gimsa.

Najmanje 1000 binuklearnih ćelija po bunariću je detektovano, dok su MN određivani po kriterijumima datim od strane.<sup>137,138</sup>

Efekat testiranih jedinjenja na ćelijsku deobu je određen preko indeksa proliferacije blokirane citokineze (CBPI) izraženog po Surralles i saradnicima.<sup>139</sup>

#### *Statistika obrada i preračunavanje indeksa*

Statistička analiza je urađena u Origin 7.0 programu. Statistička značajnost između analiziranih setova podataka određena je analizom varijanse (ANOVA) primenom T testa. Razlike između ispitivanih setova podataka za  $p < 0,01$  i  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim. Izračunavanje indeksa je predstavljeno kao promena između različitih grupa izražena u procentima.

### **3.5. Metabolomička analiza plodonosnih tela *F. betulina***

Statistička obrada podataka za potrebe metabolomičke studije izvršena je u SIMCA 14.0 programu. Spektralni podaci su normalizovani na ukupnu površinu, centrirani (mean centered) i skalirani (unit variance). Kod analize IR podataka dodatno je primenjen drugi izvod. Za <sup>1</sup>H NMR spektre urađeno je centriranje signala (eng. alignment) kako bi se korigovale promene nastale usled promene pH vrednosti i bining (0,04) u MestReNova 12.0 programu. Iz analize je isključena oblast  $\delta_H$  4,70 – 4,90 zbog prisustva rezidualnih signala vode.

Kriterijumi validacije CV-ANOVA testa su  $p < 0,05$ , dok kod permutacionog testa regresione linije ( $Q^2$ ) treba da seku vertikalnu osu ispod vrednosti nula, kao i da su sve  $Q^2$  i  $R^2$  vrednosti permutovanih Y vektora niže nego u ispitivanom modelu.

Za analizu promenljivih zaslužnih za razdvajanje u VIP-pred, značajnim su smatrane promenljive sa VIP-pred  $\geq 1,5$ , dok su kao kriterijum za analizu u S-grafiku korišćene apsolutne vrednosti veće od  $|p[cor]| \geq 0,4$ .

## 4. ZAKLJUČAK

U okviru ove disertacije ispitivani su sekundarni metaboliti triterpenskog tipa nativnih plodonosnih tela *Fomitopsis betulina*. Izolovano je i okarakterisano 31 jedinjenje (Slika 4) od kojih je 13 jedinjenja (19-31) po prvi put opisano u literaturi. Jedinjenja 19-29 poseduju 24-metilen-lanost-8-enski skelet karboksilne kiseline i podeljena su na dve grupe: 26-lanostanske (19 – 23) i 21-lanostanske (24 – 29) kiseline. Jedinjenje 30 sadrži  $\Delta^{7,9(11)}$  dienski sistem, a jedinjenje 31 predstavlja derivat 3,4-*seco*-lanostana.

Posmatrano iz ugla hemijskih struktura, najzanimljivija su jedinjenja 31 i 19, kao i triterpenski glikozidi (27-29 i 31) koji su prvi put izolovani iz *F. betulina*. Jedinjenje 31 je prvi primer glikozida sa 24-metilen-3,4-*seco*-lanostanskim skeletom, a jedinjenje 19 poseduje jedinstven tip supstituenta na triterpenskom skeletu, koji ranije nije opisan u literaturi.

Za izolovana jedinjenja ispitana je citotoksična aktivnost na ćelijskim linijama promijelocitne leukemije (HL-60) i adenokarcinoma pluća (A549), za jedinjenja 1-11 i 13-31. Od jedinjenja koja do sada nisu bila opisana u literaturi, jedinjenja 27 ( $IC_{50} = 15,80 \pm 0,83$ ) i 29 ( $IC_{50} = 23,72 \pm 2,57$ ) su pokazala značajnu aktivnost, ali zbog male količine nije bilo moguće odrediti indeks njihove selektivnosti. Za jedinjenja 3, 5, 7, 10 i 14 određene  $IC_{50}$  vrednosti su manje od 20  $\mu M$  na HL-60 ćelijskim linijama pri čemu jedinjenja 5, 7, 10 i 11 imaju visok indeks selektivnosti u odnosu na zdrave ćelije (MRC-5), sa vrednostima indeksa od 8,6; 5,8; 9,8 i 4,6, redom. Komercijalni standard cisplatin je imao pet puta veću aktivnost u odnosu na jedinjenja 5 i 10, ali je selektivnost izolovanih jedinjenja bila pet puta veća. Jedinjenja 1-11 i 13-31 nisu pokazala značajnu citotoksičnu aktivnost na A549 ćelijskim linijama.

DNK protektivna aktivnost je testirana za jedinjenja 3-6, 9-12, 16, 18, 20 i 21 na humanim limfocitima periferne krvi i upoređena sa komercijalnim standardom amifostinom (pozitivnom probom), mitomicinom C (negativnom probom) i netretiranim ćelijama (nultom probom). Na osnovu indeksa proliferacije utvrđeno je da nijedno od testiranih jedinjenja ne pokazuje značajno smanjenje broja tretiranih ćelija. Rezultati testa ukazuju na zaštitni efekat testiranih jedinjenja, njihov citogenetski potencijal i smanjenje oštećenja smanjenjem učestalosti mikronukleusa na dozno zavistan način, te da su najefikasnija pri koncentraciji od 2,0  $\mu g/ml$ . Jedinjenje 21 pokazalo je najsnažniji efekat na smanjenje nastanka mikronukleusa ( $P < 0.01$ ), 44 % pri koncentraciji od 2,0  $\mu g/ml$  u poređenju sa nultom kontrolom. Nešto manji efekat uočava se kod jedinjenja 3, 10 i 20, pri istoj koncentraciji.

Proučavanjem veze strukture i aktivnosti testiranih jedinjenja utvrđeno je da jedinjenja 5, 6 i 9, derivati sa 24-metilen-lanost-7,9(11)-dienskim sistemom, pokazuju slabiju aktivnost u odnosu na derivate 24-metilen-lanost-8-enskih jedinjenja, 3, 4, 10, 11, 12, 20 i 21. U slučaju jedinjenja 21, koje ima 3-keto grupu, uočena je veća aktivnost u odnosu na jedinjenja sa 3-hidroksi (4) i 3-*O*-acil supstituentima (3 i 20). Aktivnost epimernih jedinjenja 10 i 11 direktno zavisi od relativne konfiguracije u položaju C-3, tako da jedinjenje 10 sa 3 $\beta$ -acetatnom grupom pokazuje značajno veću aktivnost.

Kod serije lanostana sa  $\Delta^{8,9}$  vezom, oksigenacija položaja C-12 ili C-16, kao i prisustvo karboksilne grupe u položaju C-21 i C-26 ima povoljan uticaj na zaštitni efekat kod hromozomskih aberacija. Jedinjenje 16, derivat 3,4-*seco*-lanostana, sa otvorenim A prstenom ima ostatak skeleta identičan kao kod jedinjenja 12 i oba jedinjenja pokazuju sličnu aktivnost, što upućuje da otvaranje prstena A nema uticaj na aktivnost.

Poređenjem dobijenih podataka sa literaturnim predložen je potencijalni regulatorni mehanizam delovanja na ćelijski ciklus, putem regulacije p53 proteina, što je potrebno dodatno istražiti.

Uspešno su po prvi put dobijena plodonosna tela kultivacijom na podlogama od piljevine stabla breze, ruja, crne jove i na unutrašnjoj ljusci pečenog lešnika.

Prikazani rezultati dokazuju da je moguća kultivacija i plodonošenje *F. betulina* na alternativnim supstratima. Primenom FTIR i HR MAS NMR spektroskopskih tehnika u kombinaciji

sa multivarijantnom analizom moguće je pratiti promene metaboličkog profila plodonosnih tela, kao posledice sazrevanja i gajenja na različitim supstratima. Na osnovu dobijenih rezultata, utvrđeno je da sazrevanjem i promenom podloge za gajenje, dolazi do promene hemijskog sastava (metaboličkog profila) plodonosnih tela *F. betulina*. Na osnovu VIP-pred skorova i S-grafika za dobijene OPLS-DA modele definisani su karakteristični markeri sazrevanja. Za određivanje markera plodonosnih tela gajenih na različitim supstratima korišćeni su SUS grafici dobijenih OPLS-DA modela. Identifikacija jedinjenja zahteva opsežne dodatne analize i potvrde, što će biti predmet budućeg istraživanja.

Rezultati dobijeni na osnovu FTIR i HR MAS NMR spektroskopskih podataka i SIMCA predikcionog modela pokazuju da se i FTIR spektroskopska tehnika može uspešno koristiti za određivanje faze sazrevanja plodonosnih tela *F. betulina*.

## Literatura

1. Hawksworth, D.L., Lücking, R. (2017) Fungal diversity revised: 2.2 to 3.8 milion species. *Microbiol Spectrum* **5**, FUNK-0052-2016.
2. Hawksworth D. (1991) The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significiance and conservation. *Mycol Res* **95**, 641–655.
3. Hanson J. (2008) *The Chemistry of Fungi*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom.
4. Deacon, J.W. (2006) *Fungal Biology*, 4th edition. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom.
5. Hobbs C. (1986) *Medicinal mushrooms: an exploration of tradition, healing, and culture*. Botanica Press, Summertown, Tennessee.
6. Vukojević, J. (1998) *Praktikum iz mikologije i lihenologije*. Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija
7. Ruggiero M.A., Gordon D.P., Orrell T.M., Bailly N., Bourgoin T., Brusca R.C., Cavalier-Smith T., Guiry M.D., Kirket P.M. (2015) A higher level classification of all living organisms. *PLoS ONE* **10**, e0119248.
8. <https://hostdefense.com/blogs/host-defense-blog/the-mushroom-lifecycle>
9. Kirk P., Cannon P., David J, Minter D., Stalpers J. (2008) *Dictionary of the Fungi*, 10th edition. CAB International Press, Wallingford, Oxon, United Kingdom.
10. Floudas D., Binder M., Riley R., Barry K., Blanchette R.A., Henrissat B., Martínez A.T., Otilar R., Spatafora J.W., Yadav JS., Aerts A., Benoit I., Boyd A., Carlson A., Copeland A., Coutinho P.M., de Vries R.P., Ferreira P., Findley K., Foster B., Gaskell J., Glotzer D., Górecki P., Heitman J., Hesse C., Hori C., Igarashi K., Jurgens J.A., Kallen N., Kersten P., Kohler A., Kues U., Kumar T.K., Kuo A., LaButti K., Larrondo L.F., Lindquist E., Ling A., Lombard V., Lucas S., Lundell T., Martin R., McLaughlin D.J., Morgenstern I., Morin E., Murat C., Nagy L.G., Nolan M., Ohm R.A., Patyshakuliyeva A., Rokas A., Ruiz-Dueñas F.J., Sabat G., Salamov A., Samejima M., Schmutz J., Slot J.C., St John F., Stenlid J., Sun H., Sun S., Syed K., Tsang A., Wiebenga A., Young D., Pisabarro A., Eastwood D.C., Martin F., Cullen D., Grigoriev I.V., Hibbett D.S. (2012) The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* **336**, 1715–1719.
11. Eastwood D., Grigoriev I.V., Berka R.M., Blanchette R.A., Kersten P., Martinez A.T., Vicuna R., Cullen D. (2012) Comparative genomics of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* provide insight into selective ligninolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 5458–5463.
12. Binder M., Justo A., Riley R., Salamov A., Lopez-Giraldez F., Sjökvist E., Copeland A., Foster B., Sun H., Larsson E., Larsoon K.H., Townsend J., Grigoriev I., Hibbett D. (2013) Phylogenetic and phylogenomic overview of the *Polyporales*. *Mycologia*.
13. Grienke U., Zöll M., Peintner U., Rollinger J. (2014) European medicinal polypores – A modern view on traditional uses. *J Ethnopharmacol* **154**, 564–583
14. Chang S.T. (1999) Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21<sup>st</sup> century: nongreen revolution. *Int J Med Mushrooms* **1**, 1–8.
15. Molitoris H.P. (2005) Fungi: companions of Man in Good and Evil. *Int J Med Mushrooms* **7**, 49–73.
16. Grienke U., Mihaly-Bison J., Schuster D., Afonyushkin T., Binder M., Guan S.H., Cheng C.R., Wolber G., Stuppner H., Guo D.A., Bochkov V.N., Rollinger J.M. (2011) Pharmacophore-based discovery of FXR-agonists. Part II: identification of bioactive triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Bioorg Med Chem* **19**, 6779–6791.
17. Shashkina M.Y., Shashkin P.N., Sergeev A.V. (2006) Chemical and medicobiological properties of chaga. *Pharm Chem J* **40**, 560–568.
18. Zhong X., Ren K., Lu S., Yang S., Sun D. (2009) Progress of research on *Inonotus obliquus*. *Chin J Integr Med* **15**, 156–160.
19. Peintner U., Pöder R., Pümpel T. (1998) The Iceman's fungi. *Mycol Res* **102**, 1153–1162.



20. Peintner U., Pöder R. (2000) Ethnomycological remarks on the Iceman's fungi. The Iceman and his Natural Environment. Springer, Vienna.
21. Dutta A. K., Acharya K. (2014) Traditional and ethno-medicinal knowledge of mushrooms from the state West Bengal, India. *Asian J Pharm Clin Res* **7**, 36–40.
22. Wasser S. (2014) Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomed J* **37**, 345–356.
23. Chihara G., Hamuro J., Maeda Y., Arai Y., Fukuoka F. (1970) Fractionation and Purification of the Polysaccharides with Marked Antitumor Activity, Especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., (an Edible Mushroom). *Cancer Res* **30**, 2776–2781.
24. Ng M.L., Yap A.T. (2002) Inhibition of human colon carcinoma development by lentinan from shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*). *J Altern Complement Med* **8**, 581–589.
25. Daba A.S., Ezeronye O.U. (2003) Anticancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *African J Biotechnol* **2**, 672–678.
26. Cui J., Chisti Y. (2003) Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnol Adv* **21**, 109–122.
27. Lei P., Zhang W., Men X. (2014) Review on anti-tumor effect of triterpene acid compounds. *J Can Res Ther* **10**, 14–19.
28. Powell M. (2014) Medicinal mushrooms, A clinical guide. Mycology Press, United Kingdom.
29. Han M.-L., Chen Y.-Y., Shen L.-L., Song J., Vlasák J., Dai Y.-C., Cui B.-K. (2016) Taxonomy and phylogeny of the brown-rot fungi: *Fomitopsis* and its related genera, *Fungal Divers* **80**, 343–373.
30. Pegler, D.N. (2000) Useful fungi of the world: some use of bracket fungi. *Mycologist* **14**, 6–7.
31. <https://www.uniprot.org/taxonomy/40450>
32. Isaka M., Chinthanom P., Suvannakad R., Thummarukcharoen T., Feng T., Liu J.-K. (2019) Fomitopsis I and J, 24-methyl-lanostane triterpenoids from fruiting bodies of the wood-rot basidiomycete *Fomitopsis* sp. *Phytochem Lett* **29**, 178–181.
33. Pleszczynska M., Wiater A., Siwulski M., Lemieszek M.K., Kunaszewska J., Kaczor J., Rzeski W., Janusz G., Szczodrak J. (2016) Cultivation and utility of *Piptoporus betulinus* fruiting bodies as a source of anticancer agents. *World J Microbiol Biotechnol* **32**, 151.
34. Xu X., Wu Y., Chen H. (2011) Comparative antioxidative characteristics of polysaccharide-enriched extracts from natural sclerotia and cultured mycelia in submerged fermentation of *Inonotus obliquus*. *Food Chem* **127**, 74–79.
35. Wiater A., Paduch R., Pleszczynska M., Prochniak K., Choma A., Kandefer-Szerszen, M., Szczodrak J. (2011) alpha-(1,3)-D-glucans from fruiting bodies of selected macromycetes fungi and the biological activity of their carboxymethylated products. *Biotechnol Lett* **33**, 787–795.
36. Xu X., Yan H., Chen J., Zhang X. (2011) Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnol Adv* **29**, 667–674.
37. Sakagami H.A.T. (1991) Induction of immunopotential activity by a protein Q11 bound polysaccharide (PSK). *Anticancer Res* **11**, 993–1000.
38. Seniuk O.F., Gorovoj L.F., Beketova G.V., Savichuk H.O., Rytik P.G., Kucherov I.I., Prilutskay A.B., Prilutsky A.I. (2011) Anti-infective properties of the melanin-glucan complex obtained from medicinal tinder bracket mushroom, *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) Fr. (*Aphyllophoromycetidae*). *Int J Med Mushrooms* **13**, 7–18.
39. Kandefer-Szerszeń M., Kawecki Z. (1974) Ether extracts from the fruiting body of *Piptoporus betulinus* as interference inducers. *Acta Microbiol Pol, A Microbiol Gen* **6**, 197–200.
40. Duru M., Çayan G.T. (2015) Biologically active terpenoids from mushroom origin: a review. *Rec Nat Prod* **9**, 456–483.
41. Wu X., Yang J., Dong Y. (2005) Chemical constituents of *Fomes officinalis* (I). *Zhongcaoyao* **36**, 811–814.
42. Wu X., Yang J., Zhou L., Dong Y. (2004) New Lanostane-Type Triterpenes from *Fomes officinalis*. *Chem Pharm Bull* **52**, 1375–1377.

43. Peng X.-R., Su H.-G., Liu J.-H., Huang Y.-J., Yang X.-Z., Li Z.-R., Zhou L., Qiu M.-H. (2019) C30 and C31 Triterpenoids and triterpene sugar esters with cytotoxic activities from edible mushroom *Fomitopsis pinicola* (Sw.Ex Fr.) Krast. *J Agric Food Chem* **67**, 10330–10341.
44. Zhao J., Yang Y., Yu M., Yao K., Luo X., Qi H., Zhang G., Luo Y. (2018) Lanostanetype C31 triterpenoid derivatives from the fruiting bodies of cultivated *Fomitopsis palustris*. *Phytochemistry* **152**, 10–21.
45. Khalilov Q., Li L., Liu Y., Tohtahon Z., Chen X., Aisa H.A., Yuan T. (2018) Piptolinic acids F–J, five new lanostane-type triterpenoids from *Piptoporus betulinus*. *Nat Prod Res*, 1–8.
46. Liu X.-T., Winkler A.L., Schwan W.R., Volk T.J., Rott M., Monte A. (2010) Antibacterial compounds from mushrooms II: Lanostane triterpenoids and an ergostane steroid with activity against *Bacillus cereus* isolated from *Fomitopsis pinicola*. *Planta Med* **76**, 464–466.
47. Kuo P.-C., Tai S.-H., Hung C.-C., Hwang T.-L., Kuo L.-M., Lam S.H., Cheng K.-C., Kuo D.-H., Hung H.-Y., Wu T.-S. (2021) Antiinflammatory triterpenoids from the fruiting bodies of *Fomitopsis pinicola*. *Bioorg Chem* **108**, 104562.
48. Zhang J., Chen B., Liang J., Han J., Zhou L., Zhao R., Liu H., Dai H. (2020) Lanostane Triterpenoids with PTP1B Inhibitory and Glucose-Uptake Stimulatory Activities from Mushroom *Fomitopsis pinicola* Collected in North America. *J Agric Food Chem* **68**, 10036–10049.
49. Wu X., Yang J.-S., Yan M. (2009) Four New Triterpenes from Fungus of *Fomes officinalis*. *Chem Pharm Bull* **57**, 195–197.
50. Alresly Z., Lindequist U., Lalk M., Porzel A., Arnold N., A Wessjohann L. (2016) Bioactive triterpenes from the fungus *Piptoporus betulinus*. *Rec Nat Prod* **10**, 103–108.
51. Rösecke J., König W.A. (1999) Steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*. *Phytochemistry* **52**, 1621–1627.
52. Rösecke J., König W.A. (2000) Constituents of various wood-rotting basidiomycetes. *Phytochemistry* **54**, 603–610.
53. Keller A.C., Maillard M.P., Hostettmann K. (1996) Antimicrobial steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*. *Phytochemistry* **41**, 1041–1046.
54. Kamo T., Asanoma M., Shibata H., Hirota M. (2003) Anti-inflammatory lanostane-type triterpene acids from *Piptoporus betulinus*. *J Nat Prod* **66**, 1104–1106.
55. Wangun H.V.K., Berg A., Hertel W., Nkengfack A.E., Hertweck C. (2004) Anti-inflammatory and anti-hyaluronate lyase activities of lanostanoids from *Piptoporus betulinus*. *J Antibiot* **57**, 755–758.
56. Naranmandakh S., Murata T., Odonbayar B., Suganuma K., Batkhuu J., Sasaki K., (2018) Lanostane triterpenoids from *Fomitopsis officinalis* and their trypanocidal activity. *J Nat Med* **72**, 523–529.
57. Han J., Li L., Zhong J., Tohtaton Z., Ren Q., Han L., Huang X., Yuan T. (2016) Officimalonic acids A–H, lanostane triterpenes from the fruiting bodies of *Fomes officinalis*. *Phytochemistry* **130**, 193–200.
58. Feng W., Yang J., Xu X., Liu Q. (2010) Quantitative determination of lanostane triterpenes in *Fomes officinalis* and their fragmentation study by HPLC-ESI. *Phytochem Anal* **21**, 531–538.
59. Tohtahon Z., Xue J., Han J., Liu Y., Hua H., Yuan T. (2017) Cytotoxic lanostane triterpenoids from the fruiting bodies of *Piptoporus betulinus*. *Phytochemistry* **143**, 98–103.
60. Yoshikawa K., Inoue M., Matsumoto Y., Sakakibara C., Miyataka H., Matsumoto H., Arihara S. (2005) Lanostane triterpenoids and triterpene glycosides from the fruit body of *Fomitopsis pinicola* and their inhibitory activity against COX-1 and COX-2. *J Nat Prod* **68**, 69–73.
61. Han J., Liu W., Li M., Gu Y., Zhang Y., Yuan T. (2020) Lanostane Triterpenoids from the Fruiting Bodies of *Fomes officinalis* and Their Anti-Inflammatory Activities. *Molecules* **25**, 4807.
62. Epstein W.W., van Lear G. (1966) Metabolites of *Fomes officinalis*. *J Org Chem* **31**, 3434–3435.
63. Anderson C., Epstein W. (1971) Metabolic intermediates in the biological oxidation of lanosterol to eburicoic acid. *Phytochemistry* **10**, 2713–2717.
64. Augustijn D., de Groot H.J.M., Alia A. (2021) HR-MAS NMR Applications in Plant Metabolomics. *Molecules* **26**, 931.

65. Markley J.L., Brüschweiler R., Edison A.S., Eghbalnia H.R., Powers R., Raftery D., Wishart D.S. (2017) The future of NMR-based metabolomics. *Curr Opin Biotechnol* **43**, 34–40.
66. Qin Z., Liao D., Chen Y., Zhang C., An R., Zeng Q., Li X. (2019) A Widely Metabolomic Analysis Revealed Metabolic Alterations of *Epimedium Pubescens* Leaves at Different Growth Stages. *Molecules* **25**, 137.
67. Wang L., Ma K.-B., Lu Z.-G., Ren S.-X., Jiang H.-R., Cui J.-W. Chen G., Teng N.-J., Lam H.-M., Jin B. (2020) Differential physiological, transcriptomic and metabolomic responses of *Arabidopsis* leaves under prolonged warming and heat shock. *BMC Plant Biol* **20**, 86.
68. Augustijn D., de Groot H.J.M., Alia A. (2019) A robust circadian rhythm of metabolites in *Arabidopsis thaliana* mutants with enhanced growth characteristics. *PLoS ONE* **14**, e0218219.
69. Kruk J., Doskocz M., Jodlowska E., Zacharzewska A., Lakomiec J., Czaja K., Kujawski J. (2017) NMR Techniques in Metabolomic Studies: A Quick Overview on Examples of Utilization. *Appl Magn Reson* **48**, 1–21.
70. Emwas A.-H.M., Salek R.M., Griffin J.L., Merzaban J. (2013) NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: Applications, limitations, and recommendations. *Metabolomics* **9**, 1048–1072.
71. Emwas A.H. (2015) The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research. *Methods Mol Biol* **1277**, 161–193.
72. Matsuda F. (2016) Technical Challenges in Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Mass Spectrom* **5**, S0052.
73. Keun H. (2018) NMR-based metabolomics. The Royal Society of Chemistry, United Kingdom.
74. Sakellariou D., Meriles C.A., Martin R.W., Pines, A. (2005) NMR in rotating magnetic fields: magic-angle field spinning. *Magn Reson Imaging* **23**, 295–299.
75. Euceda L.R., Giskeodegard G.F., Bathen T.F. (2015) Preprocessing of NMR metabolomics data. *Scand J Clin Lab Investig* **75**, 193–203.
76. Smolinska A., Blanchet L., Buydens L.M., Wijmenga S.S. (2012) NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. *Anal Chim Acta* **750**, 82–97.
77. Le Guennec A., Tayyari F., Edison A.S. (2017) Alternatives to Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy Presat and Carr-Purcell-Meiboom-Gill Presat for NMR-Based Metabolomics. *Anal Chem* **89**, 8582–8588.
78. Winning H., Viereck N., Wollenweber B., Larsen F.H., Jacobsen S., Sondergaard I., Engelsen S.B. (2009) Exploring abiotic stress on asynchronous protein metabolism in single kernels of wheat studied by NMR spectroscopy and chemometrics. *J Exp Bot* **60**, 291–300.
79. Santos O.N.A., Folegatti M.V., Dutra L.M., Andrade I.P.d.S., Fanaya E.D., Lena B.P., Barison A., Santos A.D.d.C. (2017) Tracking lipid profiles of *Jatropha curcas* L. seeds under different pruning types and water managements by low-field and HR-MAS NMR spectroscopy. *Ind Crop Prod* **109**, 918–922.
80. Pagter M., Yde C.C., Kjaer K.H. (2017) Metabolic Fingerprinting of Dormant and Active Flower Primordia of *Ribes nigrum* Using High-Resolution Magic Angle Spinning NMR. *J Agric Food Chem* **65**, 10123–10130.
81. Coutinh, I.D., Moraes T.B., Mertz-Henning L.M., Nepomuceno A.L., Giordani W., Marcolino-Gomes J., Santagneli S., Colnago L.A. (2017) Integrating High-Resolution and Solid-State Magic Angle Spinning NMR Spectroscopy and a Transcriptomic Analysis of Soybean Tissues in Response to Water Deficiency. *Phytochem Anal* **28**, 529–540.
82. Sidhu O.P., Annarao S., Pathre U., Snehi S.K., Raj S.K., Roy R., Tuli R., Khetrpal C.L. (2010) Metabolic and histopathological alterations of *Jatropha* mosaic begomovirus-infected *Jatropha curcas* L. by HR-MAS NMR spectroscopy and magnetic resonance imaging. *Planta* **232**, 85–93.
83. Marino G., Righi V., Simoni A., Schenetti L., Mucci A., Tugnoli V., Muzzi E., Francioso O. (2013) Effect of a peat humic acid on morphogenesis in leaf explants of *Pyrus communis* and *Cydonia oblonga*. Metabolomic analysis at an early stage of regeneration. *J Agric Food Chem* **61**, 4979–4987.

84. Pereir, S.I., Figueiredo P.I., Barros A.S., Dias M.C., Santos C., Duarte I.F., Gil A.M. (2014) Changes in the metabolome of lettuce leaves due to exposure to mancozeb pesticide. *Food Chem* **154**, 291–298.
85. Mazzei P., Vinale F., Woo S.L., Pascale A., Lorito M., Piccolo A. (2016) Metabolomics by Proton High-Resolution Magic-Angle-Spinning Nuclear Magnetic Resonance of Tomato Plants Treated with Two Secondary Metabolites Isolated from *Trichoderma*. *J Agric Food Chem* **64**, 3538–3545.
86. Blondel C., Khelalfa F., Reynaud S., Fauvelle F., Raveton M. (2016) Effect of organochlorine pesticides exposure on the maize root metabolome assessed using high-resolution magic-angle spinning (1)H NMR spectroscopy. *Environ Pollut* **214**, 539–548.
87. Mazzei P., Cozzolino V., Piccolo A. (2018) High-Resolution Magic-Angle-Spinning NMR and Magnetic Resonance Imaging Spectroscopies Distinguish Metabolome and Structural Properties of Maize Seeds from Plants Treated with Different Fertilizers and Arbuscular mycorrhizal fungi. *J Agric Food Chem* **66**, 2580–2588.
88. Oliveira C.S., Lião L.M., Alcantara G.B. (2019) Metabolic response of soybean plants to *Sclerotinia sclerotiorum* infection. *Phytochemistry* **167**, 112099.
89. Taglienti A., Tiberini A., Ciampa A., Piscopo A., Zappia A., Tomassoli L., Poiana M., Dell’Abate M.T. (2020) Metabolites response to onion yellow dwarf virus (OYDV) infection in ‘Rossa di Tropea’ onion during storage: A (1)H HR-MAS NMR study. *J Sci Food Agric* **100**, 3418–3427.
90. Gil A.M., Duarte I.F., Delgadillo I., Colquhoun I.J., Casuscelli F., Humpfer E., Spraul M. (2000) Study of the compositional changes of mango during ripening by use of nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Agric Food Chem* **48**, 1524–1536.
91. Pérez E.M.S., Iglesias M.J., Ortiz F.L., Pérez I.S., Galera M.M. (2010) Study of the suitability of HRMAS NMR for metabolic profiling of tomatoes: Application to tissue differentiation and fruit ripening. *Food Chem* **122**, 877–887.
92. Vermathen M., Marzorati M., Diserens G., Baumgartne D., Good C., Gasser F., Vermathen P. (2017) Metabolic profiling of apples from different production systems before and after controlled atmosphere (CA) storage studied by (1)H high resolution-magic angle spinning (HR-MAS) NMR. *Food Chem* **233**, 391–400.
93. Yoon D., Choi B.R., Ma S., Lee J.W., Jo I.H., Lee Y.S., Kim G.S., Kim S., Lee D.Y. (2019) Metabolomics for Age Discrimination of Ginseng Using a Multiplex Approach to HR-MAS NMR Spectroscopy, UPLC-QTOF/MS, and GC×GC-TOF/MS. *Molecules* **24**, 2381.
94. Mazzei P., Celano G., Palese A.M., Lardo E., Drosos M., Piccolo A. (2019) HRMAS-NMR metabolomics of Aglianicone grapes pulp to evaluate terroir and vintage effects, and, as assessed by the electromagnetic induction (EMI) technique, spatial variability of vineyard soils. *Food Chem* **283**, 215–223.
95. Mucci A., Parenti F., Righi V., Schenetti L. (2013) Citron and lemon under the lens of HR-MAS NMR spectroscopy. *Food Chem* **141**, 3167–3176.
96. Righi V., Parenti F., Tugnoli V., Schenetti L., Mucci A. (2015) *Crocus sativus* Petals: Waste or Valuable Resource? The Answer of High-Resolution and High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance. *J Agric Food Chem* **63**, 8439–8444.
97. Ali S., Badshah G., Da Ros Montes D’Oca C., Ramos Campos F., Nagata N., Khan A., de Fátima Costa Santos M., Barison A. (2020) High-Resolution Magic Angle Spinning (HR-MAS) NMR-Based Fingerprints Determination in the Medicinal Plant *Berberis laurina*. *Molecules* **25**, 3647.
98. Wiklund S., Karlsson M., Antti H., Johnels D., Sjostrom M., Wingsle G., Edlund U. (2005) A new metabonomic strategy for analysing the growth process of the poplar tree. *Plant. Biotechnol J* **3**, 353–362.
99. Choze R., Alcantara G.B., Alves Filho Ede G., e Silva L.M., Faria J.C., Liao L.M. (2013) Distinction between a transgenic and a conventional common bean genotype by <sup>1</sup>H HR-MAS NMR. *Food Chem* **141**, 2841–2847.
100. de Oliveira C.S., Carlos E.F., Vieira L.G., Liao L.M., Alcantara G.B. (2014) HR-MAS NMR metabolomics of ‘Swingle’ citrumelo rootstock genetically modified to overproduce proline. *Magn Reson Chem* **52**, 422–429.

101. Ritota M., Marini F., Sequi P., Valentini M. (2010) Metabolomic characterization of Italian sweet pepper (*Capsicum annum* L.) by means of HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate analysis. *J Agric Food Chem* **58**, 9675–9684.
102. Ritota M., Casciani L., Han B.Z., Cozzolino S., Leita L., Sequi P., Valentini M. (2012) Traceability of Italian garlic (*Allium sativum* L.) by means of HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Food Chem* **135**, 684–693.
103. Marseglia A., Acquotti D., Consonni R., Cagliani L.R., Palla G., Caligiani A. (2016) HR MAS (1)H NMR and chemometrics as useful tool to assess the geographical origin of cocoa beans–Comparison with HR (1)H NMR. *Food Res Int* **85**, 273–281.
104. Mallamace D., Corsaro C., Salvo A., Cicero N., Macaluso A., Giangrosso G., Ferrantelli V., Dugo G. (2014) A multivariate statistical analysis coming from the NMR metabolic profile of cherry tomatoes (The Sicilian Pachino case). *Phys A Stat Mech Its Appl* **401**, 112–117.
105. Corsaro C., Mallamace D., Vasi S., Ferrantelli V., Dugo G., Cicero N. (2015) (1)H HR-MAS NMR Spectroscopy and the Metabolite Determination of Typical Foods in Mediterranean Diet. *J Ana Methods Chem* **2015**, 175696.
106. Cicero N., Corsaro C., Salvo A., Vasi S., Giofre S.V., Ferrantelli V., Di Stefano V., Mallamace D., Dugo G. (2015) The metabolic profile of lemon juice by proton HR-MAS NMR: The case of the PGI Interdonato Lemon of Messina. *Nat Prod Res* **29**, 1894–1902.
107. Sánchez Pérez E.M., García López J., Iglesias M.J., López Ortiz F., Toresano F., Camacho F. (2011) HRMAS-nuclear magnetic resonance spectroscopy characterization of tomato “flavor varieties” from Almería (Spain). *Food Res Int* **44**, 3212–3221.
108. Jo S., Song Y., Jeong J.-H., Hwang J., Kim Y. (2020) Geographical discrimination of *Allium* species (garlic and onion) using 1H NMR spectroscopy with multivariate analysis. *Int J Food Prop* **23**, 241–254.
109. Daolio C., Beltrame F.L., Ferreira A.G., Cass Q.B., Cortez D.A., Ferreira M.M. (2008) Classification of commercial Catuaba samples by NMR, HPLC and chemometrics. *Phytochem Anal* **19**, 218–228.
110. Bharti S.K., Bhatia A., Tewari S.K., Sidhu O.P., Roy R. (2011) Application of HR-MAS NMR spectroscopy for studying chemotype variations of *Withania somnifera* (L.). *Dunal Magn Reson Chem* **49**, 659–667.
111. Vermathen M., Marzorati M., Baumgartner D., Good C., Vermathen P. (2011) Investigation of different apple cultivars by high resolution magic angle spinning NMR. A feasibility study. *J Agric Food Chem* **59**, 12784–12793.
112. Delgado-Goni T., Campo S., Martin-Sitjar J., Cabanas M.E., San Segundo B., Arus C. (2013) Assessment of a 1H high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy procedure for free sugars quantification in intact plant tissue. *Planta* **238**, 397–413.
113. Song E.H., Kim H.J., Jeong J., Chung H.J., Kim H.Y., Bang E., Hong Y.S. (2016) A (1)H HR-MAS NMR-Based Metabolomic Study for Metabolic Characterization of Rice Grain from Various *Oryza sativa* L. Cultivars. *J Agric Food Chem* **64**, 3009–3016.
114. Santos A., Fonseca F.A., Dutra L.M., Santos M.F.C., Menezes L.R.A., Campos F.R., Nagata N., Ayub R., Barison, A. (2018) (1)H HR-MAS NMR-based metabolomics study of different persimmon cultivars (*Diospyros kaki*) during fruit development. *Food Chem* **239**, 511–519.
115. Yoon D., Choi B.-R., Kim Y.-C., Oh S.M., Kim H.-G., Kim J.-U., Baek N.-I., Kim S., Lee D.Y. (2019) Comparative Analysis of *Panax ginseng* Berries from Seven Cultivars Using UPLC-QTOF/MS and NMR-Based Metabolic Profiling. *Biomolecules* **9**, 424.
116. Salvo A., Rotondo A., Mangano V., Grimaldi M., Stillitano I., D’Ursi A.M., Dugo G., Rastrelli L. (2020) High-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS-NMR) as quick and direct insight of almonds. *Nat Prod Res* **34**, 71–77.
117. Flores I.S., Martinelli B.C.B., Lião L.M. (2020) High-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) as a tool in the determination of biomarkers of Passiflora-based herbal medicines. *Fitoterapia* **142**, 104500.

118. Shingu T., Tai T., Akahori A. (1992) A lanostane triterpenoid from *Poria cocos*. *Phytochemistry* **31**, 2548–2549.
119. Lai K.-H., L, M.-C., Du Y.-C., El-Shazl, M., Wu T.-Y., Hsu Y.-M., Henz A., Yang J.-C., Backlund A., Chang F.-R., Wu Y.-C. (2016) Cytotoxic lanostanoids from *Poria cocos*. *J Nat Prod* **79**, 2805–2813.
120. Ukiya M., Akihisa T., Tokuda H., Hirano M., Oshikubo M., Nobukuni Y., Kimura Y., Tai T., Kondo S., Nishino H. (2002) Inhibition of tumor-promoting effects by poricoic acids G and H and other lanostane-type triterpenes and cytotoxic activity of poricoic acids A and G from *Poria cocos*. *J Nat Prod* **65**, 462–465.
121. Honeywell EM., Bills CE. (1932) Cerevisterol, a sterol accompanying ergosterol in yeast. *J Biol Chem* **99**, 71–78.
122. Guo H., Sid J., Lia Z.-H., Fenga T., Donga Z.-J., Daid Y.-C., Liua J.-K. (2013) Two new triterpenoids from the fungus *Perenniporia maackiae*. *J Asian Nat Prod Res* **15**, 253–257.
123. In Kyoung L., Jin-Young J., Ji-Hee Y., Dae Won K., Myeong Seok L., Woon-Hyung, Y., Bong Sik Y. (2012) Fomitocide K, a new lanostane triterpene glycoside from the fruiting body of *Fomitopsis nigra*. *Mycobiology* **40**, 76–78.
124. Zhou L., Zhang Y., Gapter LA., Ling H., Agarwal R., Ng KY. (2008) Cytotoxic and anti-oxidant activities of lanostane-type triterpenes isolated from *Poria cocos*. *Chem Pharm Bull* **56**, 1459-1462.
125. Ye C. J., Sharpe Z., Alemara S., Mackenzie S., Liu G., Abdallah B., Heng H. (2019) Micronuclei and Genome Chaos: Changing the System Inheritance. *Genes* **10**, 366.
126. Sekiya N., Goto H., Shimada Y., Endo Y., Sakakibara I., Terasawa K. (2003) Inhibitory effects of triterpenes isolated from Hoelen on free radical-induced lysis of red blood cells. *Phytother Res* **17**, 160–162.
127. Zhang S.-D., Yu L., Wang P., Kou P., Li J., Wang L.-T., Fu Y.-J. (2019) Inotodiol inhibits cells migration and invasion and induces apoptosis via p53-dependent pathway in HeLa cells. *Phytomedicine*, 152957.
128. Atkins K. M., Thomas L. L., Barroso-González J., Thomas L., Auclair S., Yin J., Thomas G. (2014) The Multifunctional Sorting Protein PACS-2 Regulates SIRT1-Mediated Deacetylation of p53 to Modulate p21-Dependent Cell-Cycle Arrest. *Cell Rep* **8**, 1545–1557.
129. Cilerdzic J., Sofrenic I., Tesevic V., Brceski I, Duletic-Lausevic S., Vukojevic J., Stajic M. (2018) Neuroprotective Potential and Chemical Profile of Alternatively Cultivated *Ganoderma lucidum* Basidiocarps. *Chem Biodivers* **15**, e1800036.
130. Cyranka M., Graz M., Kaczor J., Kandefer-Szerszen' M., Walczak K., Kapka-Skrzypczak L. (2011) Investigation of antiproliferative effect of ether and ethanol extracts of Birch polypore medicinal mushroom, *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) P. Karst. (Higher Basidiomycetes) in vitro grown mycelium. *Int J Med Mushrooms* **13**, 525–533.
131. Ka H-K., Ryu S-R., Lee B-H., Yoon K-H., Bak W-C (2008) Log cultivation of the birch fungus *Piptoporus betulinus* using *Betula davurica*. *Korean J Mycol* **36**, 98–100.
132. Santos ADDC, Fonseca FA, Dutra LM, Santos MFC, Menezes LRA, Campos FR, Nagata N, Ayub R, Barison A. (2018) <sup>1</sup>H HR-MAS NMR-based metabolomics study of different persimmon cultivars (*Diospyros kaki*) during fruit development. *Food Chem* **15**, 511-519.
133. Novák M., Synytsya A., Gedeon O., Slepíčka P., Procházká V., Synytsya A., Čopíková J. (2012) Yeast  $\beta(1-3),(1-6)$ -d-glucan films: Preparation and characterization of some structural and physical properties. *Carbohydr Polym* **87**, 2496–2504.
134. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds.) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York.
135. Savković Ž., Stupar M., Unković N., Ivanović Ž., Blagojević J., Vukojević J., Ljaljević Grbić M. (2019) In vitro biodegradation potential of airborne *Aspergilli* and *Penicillia*. *Sci Nat* **106**, 8.
136. Fenech M., Morley A.A. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* **285**, 35–44.

137. Fenech M. (2000) A mathematical model of the in vitro micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not specifically scored in binucleated cells or in cells that have completed one nuclear division. *Mutagenesis* **15**, 329–336.
138. Countryman P.I., Heddle J.A. (1976) The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* **41**, 321–332.
139. Surrallés J., Xamena N., Creus A., Catalán J., Norppa H., Marcos R. (1995) Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* **341**, 169-184.

## BIOGRAFIJA

Ivana (Vladimir) Sofrenić rođena je 5. marta 1991. godine u Bijeljini. Osnovnu i srednju školu završila je u Bijeljini. Školske 2010/11 upisala je Hemijski fakultet u Beogradu, a diplomirala 30. septembra 2014. godine. Master studije upisala oktobra 2014. godine, kod mentora prof. dr Veleta Teševića i prof. dr Ljubodraga Vujisića i završila ih 18. septembra 2015. godine sa ocenom 10. Doktorske studije na Hemijskom fakultetu u Beogradu upisala je školske 2015/16 godine, kod mentora prof. dr Ljubodraga Vujisića i dr Miroslava Novakovića.

Od 1. aprila 2016. godine do 11. maja 2018. godine bila je doktorant stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Od 11. maja 2018. godine zaposlena je kao asistent na Hemijskom fakultetu u Beogradu. Od 2018. godine bila je angažovana na projekatima br. 172053 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Bioaktivni prirodni proizvodi samoniklih, gajenih i jestivih biljaka: određivanje strukture i aktivnosti” (2011/19); međunarodnim projektima „Development of on-line GC-MS and LC-MS methods based on micro extraction inpacked sorbent (MEPS) for the OPCW proficiency testframework and on-site analysis” (2017/21) i „Detection of herbs and dietary supplements fraud using metabolomics approach” (2019/21); projektu bilateralne saradnje (2019/21) „Metabolomic approach for the determination of herbs and spices fraud”; na projektu saradnje SANU i BAN „Phytochemical investigation of secondary metabolites from plants and fungi and their biotransformed products” (2020/22).

Objavila je tri rada kategorije M21, dva rada kategorije M22, dva rada kategorije M23, jedan rad kategorije M24, po dva saopštenja kategorija M34 i M64. Koautor je pomoćnog udžbenika „Određivanje strukture molekula spektroskopskim metodama: zbirka spektara”.



## Objavljeni i saopšteni radovi koji čine deo disertacije

### Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21):

1. **Ivana Sofrenić**, Boban Anđelković, Nina Todorović, Tatjana Stanojković, Ljubodrag Vujisić, Miroslav Novaković, Slobodan Milosavljević, Vele Tešević (2021) Cytotoxic triterpenoids and triterpene sugar esters from the medicinal mushroom *Fomitopsis betulina*. *Phytochemistry* **181**, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112580> (IF<sub>2020</sub> = 4,072).

### Rad u međunarodnom časopisu (M23):

1. Ivana Sofrenić, Boban Anđelković, Ljubodrag Vujisić, Miroslav Novaković, Aleksandar Knežević, Miroslava Stanković, Slobodan Milosavljević, Vele Tešević (2021) DNA protective activity of triterpenoids isolated from medicinal mushroom *Fomitopsis betulina*. *J Serb Chem Soc.* <https://doi.org/10.2298/JSC210401039S> (IF<sub>2020</sub> = 1,240).

### Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34):

1. **Ivana Sofrenić**, Ljubodrag Vujisić, Miroslav Novaković, Nina Todorović, Milka Jadranin, Dejan Gođevac, Boban Anđelković, Slobodan Milosavljević, Vele Tešević, New Triterpenoid Acids from Fungus *Fomitopsis betulina*, Fourth International Conference on Natural Products Utilization: from Plants to Pharmacy Shelf, May, 2019, Albena, Bulgaria.

### Saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64):

1. **Ivana Sofrenić**, Ljubodrag Vujisić, Miroslav Novaković, Boban Anđelković, Vele Tešević, Izolovanje i identifikacija triterpenskih kiselina iz gljive *Piptoporus betulinus*, 54. Savetovanje SHD, Septembar, 2017, Beograd, Srbija.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ивана В. Софренић

Број индекса ДХ29/2015

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Изоловање, идентификација и цитотоксична активност секундарних метаболита  
плодоносних тела *Fomitopsis betulina* и примена HR MAS NMR спектроскопске технике  
у одређивању метаболичког профила

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

### Потпис аутора

У Београду, 30.08.2021.

Ivana Sofrenić

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ивана В. Софренић

Број индекса ДХ29/2015

Студијски програм Хемија

Наслов рада: Изоловање, идентификација и цитотоксична активност секундарних метаболита плодноносних тела Fomitopsis betulina и примена HR MAS NMR спектроскопске технике у одређивању метаболичког профила

Ментори: проф. др Љубодраг Вујисић и др Мирослав Новаковић, виши научни сарадник

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 30.08.2021.

Ivana Sofrenić

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Изоловање, идентификација и цитотоксична активност секундарних метаболита плодноносних тела *Fomitopsis betulina* и примена HR MAS NMR спектроскопске технике у одређивању метаболичког профила

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- ③ Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, 30.08.2021.

Ivana Sofrenić

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.