

Značajke, kemizam i uporaba lišaja

Zovko, Marijana; Kosalec, Ivan; Kalođera, Zdenka; Partl, Anamarija; Pepeljnjak, Stjepan

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2007, 63, 227 - 243**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:540337>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Značajke, kemizam i uporaba lišaja

MARIJANA ZOVKO¹, IVAN KOSALEC², ZDENKA KALOĐERA¹, ANAMARIJA PARTL³,
STJEPAN PEPELJNJAK²

¹Zavod za farmakognoziju,

²Zavod za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu,

³Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb

UVOD

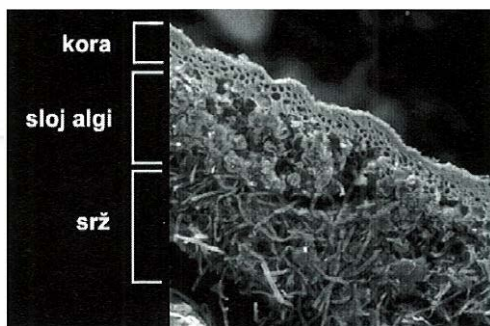
U stalnoj potrazi za novim biološki aktivnim tvarima, znanstvenici se uvijek iznova okreću prirodnim izvorima. Osim viših biljaka, vrlo vrijedan izvor takvih tvari su i različiti mikroorganizmi. Jedno od područja interesa u pronalaženju prirodno aktivnih tvari su i spojevi prisutni u lišajima. Oni su za medicinu dugo bili nepoznanica, ali su odnedavno postali vrlo zanimljivi zbog više korisnih svojstava, među kojima je i antimikrobno djelovanje. Postoje zapisi koji govore o tome da su se lišaji koristili u narodnoj medicini još u 15. stoljeću. Na primjer, vrsta *Usnea florida* (L.) F. H. Wigg. koristila se kod problema s kosom, vrsta *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. kod žutice, vrsta *Peltigera canina* (L.) Willd. protiv bjesnoće, a vrste *Cetraria islandica* (L.) Ach., *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. i *Cladonia* spp. protiv tuberkuloze. Početkom znanstvenog istraživanja sekundarnih metabolita lišaja mogu se smatrati pedesete godine prošlog stoljeća kad je utvrđeno djelovanje usniške kiseline na gram-pozitivne bakterijske vrste. Do danas su otkriveni brojni djelotvorni spojevi prisutni u lišajima. Za oko 60 lišajnih vrsta utvrđeno je antimikrobno, protutu morsko, antialergeno, imunomodulirajuće i ekspektoransko djelovanje. Ipak, o lišajima se još uvijek općenito relativno malo zna i oni se u zadnje vrijeme sve više istražuju.

1. ŠTO SU LIŠAJI?

Lišaji su simbiotske zajednice algi i/ili cijanobakterija (fotobionti) i gljivica (mikobionti). Nalaze se u svim zemaljskim staništima i predstavljaju jednu od najuspješnijih simbiotskih skupina. Postoji oko 17000 do sad otkrivenih vrsta lišaja. U većine vrsta, mikobiont je iz koljena *Ascomycetes* (mješinarke), a u malom broju vrsta iz razreda *Basidiomycetes* (stapčarke) i *Deuteromycetes* (nesavršene gljive). Fotobionti se dijele na fikobionte i cijanobionte. Fikobionti su eukarioti – zelene alge (*Chlorophyta*) te rodovi *Heterococcus* i *Petroderma*. Cijanobionti su prokariotski fotobionti. Oni mogu biti jednostanični kao rodovi *Gloeocapsa* i *Chroococcus*, ili nitasti s heterocistama (stanice bez fotosintetski aktivnog bojila koje fiksiraju atmosferski dušik) kao rodovi *Nostoc*, *Scytonema*, *Stygonema* i dr. (1). Uloga fotobionta u ovoj simbiotskoj zajednici je fotosinteza, dok mikobiont crpi hranjive tvari iz podloge i štiti osjetljive stanice fotobionta (2).

1.1. Građa lišaja

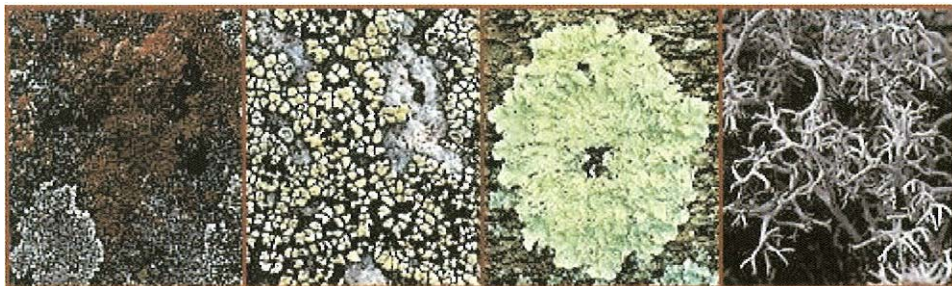
Strukturu lišaja otkrili su 1920.–1945. g. Asahina i Skibata. Tijelo lišaja naziva se steljka ili talus. Steljka je građena od dugačkih vlaknastih stanica gljiva koje zovemo hife, među kojima su smještene stanice algi. Steljka može sadržavati i izrasline (cefalodije) u kojima se nalazi neki drugi fotobiont. Na poprečnom presjeku većine vrsta lišaja jasno se raspoznaju tri sloja (slika 1.). Vanjsku površinu lišaja grade gusto isprepletne hife koje tvore koru lišaja. Kora služi kao zaštita od drugih organizama i prejakog sunca, a u njoj se mogu nalaziti porc (veće cifele i manje pseudocifele) za izmjenu plinova. Ispod kore nalazi se sloj stanica algi, slično kao asimilacijski parenhim u listu. Ispod sloja algi nalazi se srž ili medula, građena od spužvasto organiziranih hifa. U njoj se odvija izmjena plinova (2).



Slika 1. Poprečni presjek steljke lišaja
(preuzeto i prilagođeno s <http://www.ucmp.berkeley.edu/fungi/lichens>).

Postoje četiri osnovna i dva nešto rjeđa oblika rasta lišaja (slika 2.) (3):

- a) **korasti** (krustozni) – Čitavom su površinom prirasli uz podlogu tako da na njoj tvore »koru«. Mogu biti i urasli u podlogu tako da iz nje vire samo generativna tijela. Obično se njihov rast odvija na rubovima steljke.
- b) **ljuskasti** (skvamozni) – Po građi su slični korastim lišajima, ali im neki dijelovi steljke nisu pričvršćeni za podlogu pa imaju ljuskast izgled.
- c) **listasti** (foliozni) – Ispod srži imaju i donju koru iz koje se pružaju rizine – produljene hife koje podsjećaju na korjenčice kojima su ovi lišaji pričvršćeni za podlogu.
- d) **grmast** (frutikozni) – Pričvršćeni su za podlogu samo na jednom mjestu i najčešće su obilno razgranati. Na poprečnom je presjeku vidljiva cilindrična građa. Umjesto donje kore imaju središnju koru oko koje se nalazi srž. Oko srži je prsten algi, a oko nje vanjska kora.
- e) **zrnati** (leprozni) – Javljuju se u obliku prašinastih nakupina. Uopće nemaju koru, već samo sloj algi i sloj koji podsjeća na srž. Kod njih nikad nisu opažena generativna tijela, zbog čega ih je teško razvrstati.
- f) **složeni** – Imaju primarnu steljku koja je čvrsto pričvršćena za podlogu i sekundarnu steljku koja raste grmasto i slabo je pričvršćena za podlogu. Primarna steljka često odumire kod starijih jedinki.



Slika 2. Osnovni oblici rasta. Redom: korasti, ljuskasti, listasti i grmasti (preuzeto i prilagođeno s <http://www.ucmp.berkeley.edu/fungi/lichens>).

1.2. Stanište

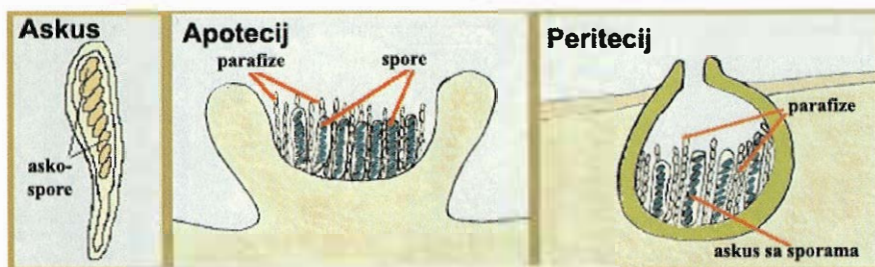
Lišaji mogu rasti na zemlji (terestrički), drveću (epifitski) ili kamenju (epilitski). Mikobionti iz podloge crpe neke mineralne tvari, ali glavna hrana lišaja nastaje fotosintezom u fotobiontu. Zato lišaje koji rastu na kori drveća ne smatramo nametnicima, jer oni stablu ne uzimaju hranu, već ga samo koriste kao podlogu za rast. Lišaji koji rastu na stijenama mogu djelovanjem oksalne kiseline razgraditi vapnenac i time pomoći stvaranje plodnog tla. Zato ih zovemo »pioniri vegetacije«.

Za rast im je pogodnija vlažna klima, ali dobro uspijevaju i u hladnim prašumama gdje vlaga zraka nije prevelika. No, lišaji nisu izbirljivi. Rastu u umjerenoj, arktičkoj, tropskoj pa i pustinjskoj klimi. Mogu preživjeti temperature u rasponu od -200 do 100 °C. Jedino što im smeta jest onečišćenje. U tundrama lišaji i mahovine čine većinu biljnog pokriva (2). Na Antarktiku postoji oko 350 vrsta lišaja i samo 2 vrste viših biljaka.

1.3. Razmnožavanje

Lišaji se mogu razmnožavati nespolno i spolno (sporama). Nespolno razmnožavanje može se odvijati na tri načina, a sva tri uključuju oba simbiotska partnera. Prvi i najjednostavniji način je fragmentacija steljke. Mali plosnati dijelovi steljke koji se zovu lobule, otkinu se i nastavljaju život kao nova jedinka. Drugi je način putem izidija. To su izrasline na steljki koje se lako odlome. Mogu biti u obliku štapića, bradavice ili razgranate. Građene su tako da vanjski sloj čini kora, a u sredini su stanice algi i hife gljiva. Treći je način pomoću soredijsa. To su nakupine hifa i stanica algi bez ovojnice. Mogu biti organizirane u soralije ili rasprostranjene po širokoj površini steljke. Raznosi ih vjetar ili kiša (4).

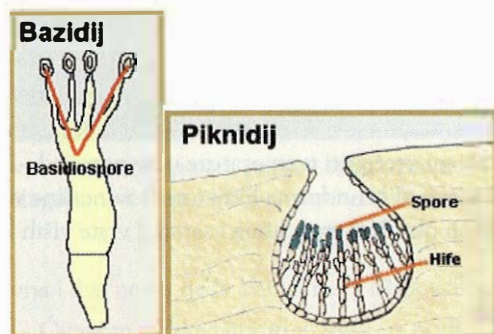
Spolno se razmnožava samo mikobiont koji onda mora »pronaći« novog fotobionta. Vrsta spora ovisi o vrsti mikobionta. Mješinarke stvaraju askospore i katkad konidiospore. Stapčarke stvaraju bazidiospore. Nesavršene gljive stvaraju samo konidiospore. Postoji i nekoliko vrsta plodišta. Apoteciji su plodišta u obliku tanjura, nekad izdignuti iznad površine steljke, a nekad udubljeni u nju. Unutar »tanjura« nalaze se askusi sa askosporama i sterilne niti – parafize. Parafize su građene od hifa i često imaju obojen vrh. Ta je boja važna u identifikaciji vrsta. Periteciji su plodišta koja se nalaze ispod površine steljke, sa malim otvorom prema van. Također su građeni od askusa i parafiza (slika 3.).



Slika 3. Lišajne askospore
(preuzeto i prilagođeno s <http://www.earthlife.net/lichens>).

Bazidiji su proširene hife na čijim se vrhovima nalaze po četiri bazidiospore (slika 4.).

Piknidiji su izgledom slični periteciju, ali u njima se nalaze konidije sa konidiosporama (slika 5). Konidiospore zapravo ne nastaju spolnim putem već otkidanjem vrhova hifa pa predstavljaju nespolni način razmnožavanja samog mikrobionta (3).



Slika 4. Bazidij i piknidij lišaja
(preuzeto i prilagođeno s <http://www.earthlife.net/lichens>).

2. KEMIZAM LIŠAJA

Tijekom života lišaji sintetiziraju veliki broj metabolita među kojima su zbog svog farmakološkog učinka najinteresantniji fenolni spojevi i polisaharidi. Broj kemijski opisanih produkata lišaja neprestano raste. Neke, kao npr. antrakinonske pigmente, u pravilu nalazimo i u lišajima i u gljivama koje samostalno žive, ali većina sekundarnih tvari koje proizvode lišaji obično se ne pojavljuje u drugim organizmima. Sekundarni produkti lišaja obično tvore 0,1 do 5 % suhe tvari, a u nekim slučajevima taj udio može biti i znatno veći (4).

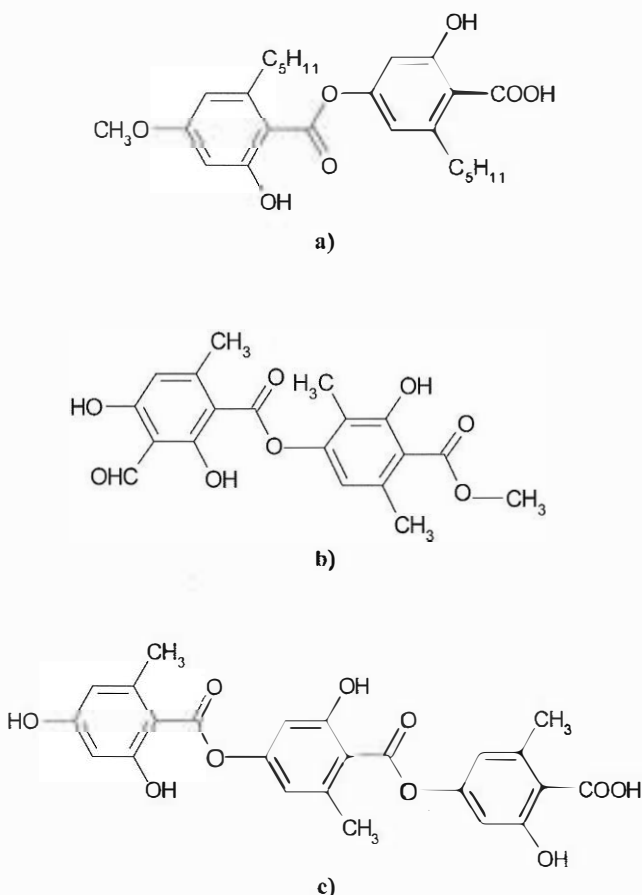
2.1. Fenolni spojevi

Najveći broj sekundarnih produkata lišaja pripada skupini fenolnih spojeva. Među njima su najzastupljeniji derivati orcinola i β -orcinola. Te derivate karakterizira iznimno

velika raznolikost. To je vjerojatno posljedica postojanja niza jednostavnih fenolnih prekursorskih jedinica koje se međusobno vrlo malo razlikuju. Te podjedinice se zatim kondenziraju u parove. Nakon kondenzacije slijedi niz reakcija kataliziranih blisko srodnim enzimima od kojih svaki djeluje na malo drugačiji supstrat (4).

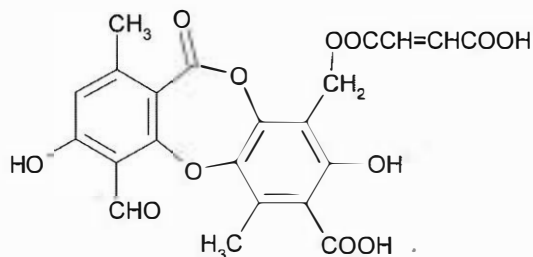
Većinu sekundarnih metabolita lišaja sintetizira mikobiont. Biosinteza većine produkata polazi od acetatnih jedinica, ali ni drugi prekursori poput šikimi ili mevalonske kiseline nisu rijetkost. Nekoliko skupina tvari, kao što su naftokinoni i ksantoni, nisu pronađeni u izoliranim mikobiontima, ali to ne isključuje mogućnost da ih sintetiziraju gljive kao partneri unutar lišaja, jer njihov sekundarni metabolizam u pravilu ovisi o okolišu u kojem se nalaze. Čini se da na metabolizam mikobionta ne utječe toliko vrsta fotobionta koliko sama njegova prisutnost (4).

Među fenolnim spojevima lišaja najbrojniji su esteri dvaju ili više molekula fenolkarboksilnih kiselina kao što su depsidi (npr. perlatolična kiselina, atranorin) ili tridepsidi (giroforična kiselina) (slika 5.) (4).



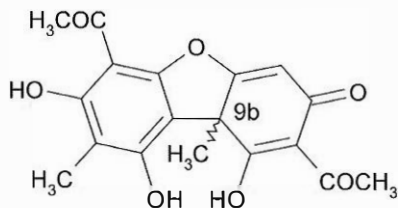
Slika 5. Perlatolična kiselina a), atranorin b) (depsidi) i giroforična kiselina c) (tridepsid)

Kemijska struktura depsidona vrlo je slična strukturi depsida, ali osim esterske veze imaju i etersku vezu između dviju monocikličkih jedinica poput npr. fumaroprotocetrar-
ne kiseline (slika 6). Depsidoni vjerojatno nastaju iz depsida u enzimski kataliziranoj
reakciji ciklizacije (5).



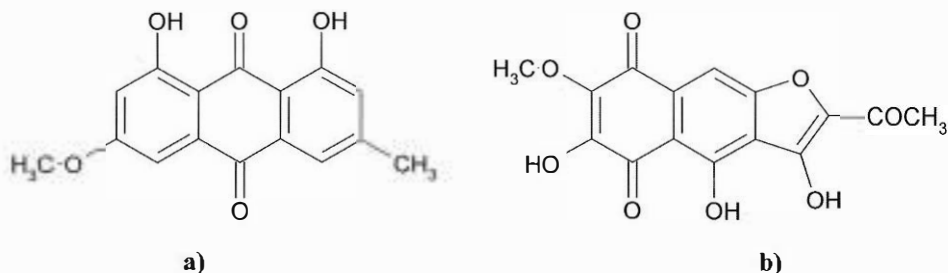
Slika 6. Fumaroprotocetrarna kiselina (depsidon)

Među derivatima dibenzofurana najvažnija je usninska kiselina, žuto obojeni spoj ko-
ji proizvodi gljivični partner u nekoliko vrsta lišaja. Ona postoji u obliku dva enantiome-
ra koji se razlikuju u konfiguraciji metilne skupine na položaju 9b (slika 7) (4).



Slika 7. Usninska kiselina

Od aromatskih pigmenata česti su antrakinoni i ksantoni dok su kromoni i naftoki-
nioni nešto rjeđi. Svi oni spadaju u poliketide, spojeve s izmjeničnim karbonilnim i meti-
lenskim skupinama. Među antrakinonima je najčešći parietin, a u vrstama roda *Clado-*
nia često se može naći crveni naftokinon, rodokladonična kiselina. (slika 8) (4).



Slika 8. a) parietin (antrakinon) i b) rodokladonična kiselina (naftokinon)

2.2. Polisaharidi u lišajima

Polisaharidi izolirani iz lišaja uglavnom su linearni ili rijede supstituirani α i β -glukani. Poznati su i neki galaktomananski polisaharidi dok su ostali tipovi struktura znatno rjeđi. Najvažniji primjeri glukanskih polisaharida su lihenan i izolihenan iz islandskog lišaja, *Cetraria islandica* (L.) Ach. (6). Lihenan je u vodi netopljivi polisaharid koji ima linearnu (1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 4)- β -D glukansku strukturu s omjerom veza 3 : 7. Ovaj omjer nije stalan, a njegova promjena u pravilu dovodi i do promjena u topljivosti. Izolihenan je α -glukan linearne (1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 4)- α -D glukanske strukture i za razliku od lihenana dobro je topljiv u vodi. Omjer veza je najčešće 2 : 1, ali se u literaturi pojam izolihenan često rabi i za polisaharide s drugim omjerima (1 \rightarrow 3) i (1 \rightarrow 4) α -glikozidnih veza.

Galaktomanani su do sad izolirani iz 24 vrste lišaja, među njima i iz islandskog lišaja, a razlikuju se prema omjeru glukoze, manoze i glukoze. U pravilu je udio manoze veći od udjela galaktoze i glukoze, a pronađeni su i galaktomanani bez glukoza podjedinica.

Među heteropolisaharidima najpoznatiji je tamnolan izoliran iz vrste *Thamnolia subuliformis* (Ehrh.) Culb. (*Th. vermicularis* (Sw.) Schaer. var. *subuliformis* (Ehrh.) Schaer.) polisaharid ramnopiranozilgalktofuranske strukture u kome prevladavaju (1 \rightarrow 3) vezae β -D galaktofuranozilne podjedinice s kompleksnim ramnopiranozilnim postranim lancima i terminalnim ksiloznim jedinicama (7).

2.3. Smještaj metabolita unutar lišaja

Obojeni sekundarni metaboliti, poput usninske kiseline i atrakinona, uglavnom su smješteni u gornjoj kori, ali njihova rasprostranjenost nije jednolika po cijeloj površini steljke. U gornjoj kori su smješteni i neki neobojeni spojevi kao što su atranorin i skvamatična kiselina. Za razliku od njih, depsidi i depsidoni su smješteni u srži. Razlike u raspodjeli metabolita vjerojatno su posljedica smještaja pojedinih enzima u različitim dijelovima lišaja. Kod frutikoznih lišaja sastav fenolnih spojeva ovisi o starosti. U mladim lišajima ima više usninske i vulpinske kiseline, a u starijima više atranorina. Iznimka je drveni lišaj (*Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf.) kojoj se starenjem smanjuje količina atranorina i perlaktolične kiseline, dok količina fizodične kiseline raste (4).

Mnogi sekundarni metaboliti lišaja izlučuju se iz stanica koje ih stvaraju i odlažu ekstracelularno u obliku kristala. To je vjerojatno prilagodba kojom se sprječava autotoksičnost uslijed nagomilavanja fenolnih spojeva. Izlučivanje sekundarnih metabolita mogao bi biti i način ispravljanja metaboličke neravnoteže do koje bi moglo doći zbog nagomilavanja produkata fotosinteze u odnosu na produkte s dušikom. S druge strane, izbacivanje energijom bogatih sastojaka iz glavnih metaboličkih putova mogla bi biti prilagodba kojom se smanjuju izvori energije dostupni mikrobiontu i tako ograničava njegova agresivnost (4).

2.4. Uloga fenolnih spojeva u lišajima

Fenolni spojevi u lišajima mogu imati raznolike biološke funkcije kao što su zaštita ili prilagodba lišaja okolišu u kojem se nalaze što je značajno zbog sporog rasta lišaja. Više

od polovice svih vrsta lišaja sadrže produkte sposobne za antibiozu. Takvi produkti mogu služiti za zaštitu steljke od drugih organizama kao što su kukci, puževi, nematode i mikroorganizmi. Ta kemijska zaštita može biti konstitutivna ili inducirana. Konstitutivna rezistencija temelji se na produkciji fenolnih inhibitora prije napada i najbolja je zaštita od životinja. Inducirana rezistencija temelji se na akumulaciji inaktivnih metabolita koji se po potrebi modificiraju u aktivne. Tako se lišaji štite od bakterija, virusa, gljivica i nematoda (8). Od fenolnih spojeva aktivni su usninska kiselina, te depsidi i depsidoni orcinolnog tipa. Zanimljivo je da niti odjeću koja je obojana bojama dobivenim od lišaja ne napadaju moljci (4).

Mnogi sekundarni metaboliti sprječavaju dozrijevanje spora i sjemenki mnogih biljaka ili drugih lišaja. Na primjer, fumaroprocetrarna, usninska, everninska, lekanorična i stiktična kiselina te atranorin inhibiraju klijanje spora i rast nekih mahovina *in vitro*. Inhibitori učinci ovisni su o pH i koncentraciji, pa npr. fumaroprocetrarna kiselina ima jače inhibicijsko djelovanje kod nižeg pH, dok je usninska kiselina aktivnija pri višim pH vrijednostima (8). Drugi spojevi inhibiraju fotosintezu u kloroplastima ili ograničavaju transpiraciju u korijenu viših biljaka. Na primjer, (-) enantiomer usninske kiseline pokazuje herbicidno djelovanje (9). Ipak nema znanstvenih dokaza da su kemijski dobro zaštićene vrste lišaja uspješnije u prirodi od drugih vrsta (4).

Pod utjecajem UV zračenja može doći do oštećenja genskog materijala lišaja. Stoga većina sekundarnih produkata lišaja snažno apsorbira u UV području, a neki i u području vidljive svjetlosti. Primjerice, usninska kiselina pokazuje apsorpcijski maksimum u oba područja spektra i tako štiti lišaj znatno jače nego tvari koje apsorbiraju samo u području vidljive svjetlosti kao npr. karotenoidi. Dodatna potvrda uloge usninske kiseline i parietina u zaštiti od štetnog djelovanja sunčeve svjetlosti jest to što je njihova količina veća u nekim vrstama koje rastu na svjetlu (4). Istraživanjima u uvjetima *in vitro* je dokazano da prisutnost vidljive svjetlosti stimulira biosintezu usninske kiseline. Ipak, brzina biosinteze ne ovisi o intenzitetu svjetlosti nego o prisutnosti ribitola ili drugih ugljikohidrata, a kod nekih vrsta i o temperaturi (10). I drugi sastojci kore poput atranorina i parietina kao i neki medularni sastojci poput everninske, fizodične, lekanorne ili salazinične kiseline imaju apsorpcijski maksimum u UV području i tako vjerojatno doprinose zaštiti lišaja od štetnog utjecaja sunčeve svjetlosti (4).

Kako je velik dio arktičkih vrsta lišaja tamno pigmentiran, apsorpcija u vidljivom dijelu spektra mogla bi biti i prilagodba kojom se povećava temperatura steljke ili količina svjetlosne energije dostupne za fotosintezu. Npr. atranorin apsorbira UV zračenje kojeg potom emitira na valnoj duljini 425 nm što je apsorpcijski maksimum klorofila. Međutim, kako lišaji koji rastu u sjeni nemaju ništa više atranorina od onih na svjetlu, čini se da njegova uloga u prikupljanju svjetlosne energije i poticanju fotosinteze ipak ima ograničenu važnost (4).

Fenolne kiseline, poput stiktične i fizodične, imaju sposobnost keliranja kationa iz mineralnih supstrata. Stoga bi te kiseline mogle sudjelovati u prikupljanju mineralnih tvari iz podloge na kojoj lišaj raste. No, smatra se da su za tu funkciju ipak važniji membranski proteini ili organske kiseline poput oksalne koje luči mikobiont (4).

Zbog hidrofobnosti mnogih produkata lišaja, njihove obilne naslage na gornjoj kori mogle bi imati ulogu sprječavanja močenja lišaja s gornje strane ili zadržavanja vode dobivene na drugi način. Ovo bi mogla biti prilagodba kod vrsta koje žive u ekstremno vlažnim ili suhim uvjetima (4). S druge strane, dio hidrofobnih spojeva izlučuje se u srž lišaja. Tako se sprječava zadržavanje prevelike količine vode u unutrašnjosti lišaja te omogućava stalna izmjena plinova s atmosferom (11).

Sekundarni metaboliti mogu imati ulogu u uspostavljanju ravnoteže između metabolizma fotobionta i mikobionta. Neki produkti mikobionta mogu suprimirati aktivnost fotobionta u starijim, manje aktivnim, dijelovima lišaja. Primjerice, u lišajevima ureaza razgrađuje ureu na ugljični dioksid, potreban za fotosintezu, i amonijak koji bi se mogao koristiti u sintezi proteina. Mikobiontski metabolit, usninska kiselina, ireverzibilno inhibira ureazu reakcijom s -SH skupinama u aktivnom mjestu. S druge strane, fotobionti sadrže hidrolazu usninske kiseline i na taj način ograničavaju njezino inhibicijsko djelovanje na ureazu. Neki od sekundarnih metabolita povećavaju permeabilnost stjenke stanica algi pa više produkata fotosinteze izlazi iz njih i služi kao hrana mikobiontu (4).

3. DJELOVANJE I UPORABA LIŠAJA

3.1. Antimikrobno djelovanje

Antimikrobno djelovanje je ispitano u velikom broju studija. Pokazalo se da isoprine dobivene od lišaja najbolje djeluju na gram-pozitivne bakterijske vrste. Manji broj iscrpina dobro djeluje i na gram-negativne bakterije, kvasnice ili dermatofite (12). Antimikrobno djelovanje pokazuje veliki broj izoliranih produkata lišaja npr. alektosarmentin, panarin i 1'-klorpanarin (argopsin), emodin, fiscion, metil-hematomat, metil- i etilorselinat, metil- β -orselinat, norliheksanton, zatim everninska, leprapinična, protolihesterinična, pulvinska i usninska kiselina te njihovi derivati. Među njima, djelotvornost usninske kiseline je najbolje ispitana. Oba njezina enantiomera su učinkovita protiv velikog broja gram-pozitivnih bakterijskih sojeva, uključujući i neke kliničke izolate, neovisno o otpornom fenotipu. Naročito je važna inhibicija rasta multirezistentnih sojeva vrste *Streptococcus aureus*, te nekih enterokoka i mikobakterija. Čini se da je (+)-enantiomer usninske selektivan prema vrsti *Streptococcus mutans* bez negativnog učinka na saprofitnu floru usne šupljine. Stoga na tržištu postoji nekoliko vodica za usta koji sadrže usninsku kiselinu, a ona se rabi i kao konzervans u kozmetici (4). Kombinacija bakrovih soli usninske i undecilenske kiseline značajno poboljšava kliničku sliku kod dermatofitije stopala (9).

3.2. Antivirusno i antiparazitsko djelovanje

Antivirusno djelovanje je dokazano za nekoliko sekundarnih metabolita lišaja, primjerice za emodin, 7-kloremodin, 7-klor1-O-metilemodin i 5,7-dikloremodin (11). Sulfonirani oblik acetilpustulana suprimira nastanak divovskih stanica zaraženih HIV-om (4). Istraživanja su pokazala da je (+)-enantiomer usninske kiseline učinkovit protiv Epstein-Barr virusa. Ukoliko se kombinacija usninske kiseline s cinkovim sulfatom koristi kao dodatna terapija kod genitalnih infekcija humanim *Papilloma* virusom značajno se ubrzava

reepitelizacija tkiva nakon operacije (9). Usninska kiselina inhibira i proliferaciju mišjeg poliomavirusa u 3T6 stanicama i to u koncentracijama koje su za stanicu netoksične. Smatra se da usninska kiselina djeluje kao generički represor transkripcije RNA (13). Iako metaboliti lišaja djeluju i na mikobakterije, dosadašnja istraživanja su pokazala da su manje djelotvorni od antibiotika koji su trenutno u upotrebi (14).

In vitro istraživanja su pokazala da usninska kiselina djeluje i na vrstu *Trypanosoma cruzi* što je čini potencijalnim kemoterapeutikom u terapiji Chagasove bolesti (15). Zabilježeno je i djelovanje (+)-usninske kiseline na vrstu *Leishmania amazonensis* na *in vivo* modelu, no to je djelovanje bilo ograničeno na intralezijsku, ali ne i na oralnu ili subkutanu primjenu (16).

3.3. Citostatičko i antitumorsko djelovanje

Iscrpine i izolirani metaboliti lišaja u nekoliko su studija pokazali citostatičko djelovanje. Primjerice, eterske i n-heksanske iscrpine lišaja vrsta *Cladonia convoluta* (Lam.) Anders, *Cladonia rangiformis* Hoffm., *Parmelia caperata* (L.) Ach. (= *Flavoparmelia caperata*), *Platismatia glauca* (L.) Culb. & Culb. i *Ramalina cuspidata* (Ach.) Nyl. bile su selektivno citotoksične na nekoliko staničnih linija humanih karcinoma kao što su kronična mijeloična leukemija (CCL-243), adenokarcinom dojke (HTB-22) i glioblastom (RCB-0461) (17). Enzimi 12-lipooksigenaza su proteini čija je ekspresija povećana u malignim stanicama. Stoga se smatra da oni imaju važnu ulogu u njihovom rastu, angiogenezi i nastanku metastaza. *In vitro* istraživanja su pokazala da je baemicesična kiselina iz vrste *Thamnolia vermicularis* Schaer. (slika 9.) umjereni, a lobarna kiselina iz vrste *Stereocaulon alpinum* L. i (+)-protoliheterinska kiselina iz islandskog lišaja snažni inhibitori tih enzima (18).

Usninska kiselina je pokazala i antitumorsku aktivnost na nekoliko tumorskih modela (9), kao i antimitosku aktivnost na nekoliko vrsta biljnih (*Nicotiana tabacum*) (L.) Ach. i životinjskih staničnih linija (leukemijske neoplastične stanice i stanice adenokarcinoma)



Slika 9. Vrsta *Thamnolia vermicularis*

(preuzeto s <http://home.hiroshima-u.ac.jp/lichen/jjman/thamnolia.htm>)

te na neke stanice kvasnica i plijesni (*Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium moniliforme*). Činjenica da usninska kiselina djeluje antimitotski na sve modele govori u prilog pretpostavci da se radi o aktivnosti na nekoj vrlo bazičnoj razini metabolizma, zajedničkoj za sve ispitivane sustave (19). I mnogi polisaharidi djeluju antitumorski kao npr. pustulan i izolihenani. Neki od njih samo sprječavaju rast tumora, a neki ih i smanjuju, a zasad nema kliničkih testova koji bi potvrdili to djelovanje. Fizodična kiselina bi mogla imati ulogu u prevenciji nastanka tumora jer kiselina inhibira mutageno djelovanje heterocikličkih amina koji se često javljaju u grijanoj hrani (4).

3.4. Imunomodulatorno djelovanje

Iz islandskog lišaja (slika 10.) izoliran je imunološki aktivan polisaharid, razgranati galaktomanan s okosnicom sastavljenom iz dva strukturna elementa, (1→6)- α -D-manopiranozilne i (1→6)- α -D-galaktopiranozilne podjedinice. Taj polisaharid je pokazao izraženo imunostimulirajuće djelovanje u *in vitro* fagocitoznom testu i u *in vivo* testu klirensa ugljika. Potonji test je pokazao da je djelotvornost polisaharida islandskog lišaja usporediva s djelotvornošću lentinana, fungalnog polisaharida koji se u Japanu koristi kao dodatna terapija za rak (20).

I iz vrste *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis* izoliran je gelirajući polisaharid A-letinanskog tipa s (1→3)- β -glukanskom strukturom i grananjem na O-6 nazvan Ths-2. Taj polisaharid je pokazao veliku djelotvornost u *in vitro* komplementarnom testu. S obzirom na letinansku strukturu Ths-2, pripravci od lišaja *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis* mogli bi imati imunomodulatornu aktivnost sličnu Shiitake gljivama (*Lentinula*



Slika 10. Islandski lišaj (*Cetraria islandica* (L.) Ach.)
(preuzeto s <http://www.nhm.uio.no/botanisk/lav>)

edodes (Berk.) Pegler) i drugim tradicionalno korištenim imunostimulansima (21). Polisaharidi prisutni u vodenoj i bazičnoj iscrpini lišaja vrste *Peltigera canina* (L.) Willd. induciraju proliferaciju i tvorbu interleukina 10 (IL10) u stanicama slezene štakora kao i sekreciju čimbenika nekroze tumora alfa (TNF- α) peritonealnih makrofaga štakora. Navedeni polisaharidi tako utječu i na stanice koje sudjeluju u prirodnom i stanice koje sudjeluju u stečenom imunitetu (22).

3.5. Analgetsko, antipiretsko, antitrombotsko i protuupalno djelovanje

Usninska i difraktaična kiselina izolirane iz lišaja *Usnea diffracta* Vain. djeluju kao analgetici i antipiretici. Pri tome difraktaična kiselina snižava normalnu tjelesnu temperaturu laboratorijskih miševa, dok usninska kiselina djeluje samo na lipopolisaharidima induciranu hipertermiju (23). *In vivo* ispitivanja protupalne aktivnosti (+) usninske kiseline pokazala su da je njezina učinkovitost nakon kronične i akutne oralne primjene ovisna o dozi, a intenzitet djelovanja usporediv s intenzitetom djelovanja kontrolne supstance, ibuprofena (24). Protupalni učinak u uvjetima *in vitro* pokazao je i longisiminon izoliran iz vrste *Usnea longissima* Ach. (slika 11.) (25) kao i vulpinska kiselina (26).

Iscrpina lišaja vrste *Umbilicaria esculenta* (Miyoshi) Mink. pokazao je antitrombotsku aktivnost. Nakon oralne primjene iscrpine produžilo se vrijeme krvarenja, a smanjila smrtnost i paraliza miševa inducirana kolagenom i epinefrinom. S druge strane, iscrpina nije pokazala fibrinolitičku aktivnost niti je promijenila koagulacijske vrijednosti poput



Slika 11. *Usnea longissima*
(preuzeto s <http://www.nhm.uio.no/botanisk/lav>)

parcijalnog tromboplastinskog vremena, protrombinskog vremena ili trombinskog vremena. Stoga je antitrombotska aktivnost iscrpine lišaja vrste *Umbilicaria esculenta* vjerojatnije posljedica antitrombocitne nego antikoagulativne aktivnosti (27).

3.6. Djelovanje na gastrointestinalni sustav i apetit

Ispitivanja antiulcerogenog učinka vodene iscrpine vrste *Usnea longissima* te difraktaične i usninske kiseline izolirane iz tog lišaja na indometacinom inducirane gastričke lezije kod štakora pokazala su značajan gastroprotektivni učinak ekstrakata kao i čistih kiselina. Taj učinak se može pripisati reducirajućem djelovanju na tvari koje nastaju prilikom oksidativnog stresa te inhibiciji infiltracije neutrofila u oštećena tkiva (28, 29, 30). Protolihestrinska kiselina iz islandskog lišaja djeluje i na bakteriju *Helicobacter pylori* (14) jednog od glavnih uzročnika želučanog vrijeda.

Gorke tvari iz islandskog lišaja, fumaroprotocetrarna i cetrarna kiselina, potiču izlučivanje želučanog soka i povećavaju apetit (31). I vrsta *Lobaria pulmonaria* se koristi kao aperitiv. S druge strane, usninska kiselina je prisutna na američkom tržištu kao sredstvo koje pomaže smanjenju prekomjerne tjelesne težine. No, postoje indicije da bi se preparati koji ju sadrže mogli uskoro povući s tržišta zbog sumnje da izazivaju hepatotoksičnost (32).

3.7. Ostala djelovanja

Lišaji pokazuju i druga zanimljiva djelovanja. Dilakton pulvinske kiseline je kardiotonik. (+)-usninska kiselina, giroforna kiselina i difraktainska kiselina djeluju antiproliferativno i inhibiraju aktivnost keratinocita. Usninska kiselina povećava propusnost membrana za vodikove ione (26).

Pripravci od vrste *Lobaria pulmonaria* koriste se kod astme i problema s mjehurom. Najpoznatiji lišaj koji se danas koristi u medicini je svakako islandski lišaj. Protolihestrinska kiselina u islandskom lišaju je aktivan sastojak infuza za opstrukciju gornjih dišnih putova (14). Od islandskog se lišaja radi infuz ili macerat, a sadrže ga i neki gotovi ljekoviti pripravci (npr. antiseptičke karamelc). U pučkoj medicini koristi se na ranama koje teško zacjeljuju, kao roborans i laktagog (31).

3.8. Uporaba u prehrani

Lišaji predstavljaju i vrijedan izvor hranjivi tvari. Njihova hranjiva vrijednost potječe uglavnom od ugljikohidrata. Imaju samo 1–5% proteina, a gotovo da i nemaju masti. U Japanu se od vrste *Umbilicaria esculenta* rade juhe i salate. I u drugim zemljama se jedu vrste roda *Umbilicaria*. Na Aljaski se vrsta *Flavocetraria cucullata* (Bellardi) Kärnefelt & Thell koristi kao začim za juhe. Jestivi su i lišaji: *Lassalia pustulata* (L.) Mérat, *Bryoria* sp. i islandski lišaj (4). Neki smatraju da je biblijska *mana* zapravo lišaj *Lecanora esculenta* (Pall.) Eversm. koji raste na stijenama, ali se od njih lako odvoji pri jačem naletu vjetra. Vjetar ga nosi po pustinji, a po kiši se nekad i nakuplja u veće nakupine. Sobov lišaj *Cladonia rangiferina* (L.) Web. je vrlo važan izvor hrane za jelene i sobove, a koristio se i za

proizvodnju brandyja u Švedskoj, ali je ta proizvodnja brzo zaustavljena zbog istrjebljenja lokalnih lišaja. Vrsta *Lobaria pulmonaria* koristila se kao zamjena za hmelj u proizvodnji piva u Europi i Sibiru, a u Indiji su njenim prahom prali kosu. Još nekoliko vrsta lišaja se koristilo kod pranja kose u Indiji i Europi. U Mauritaniji se vrsta *Parmelia paraguariensis* Lyngje pušila kao duhan. Neke se vrste lišaja koriste kao opojne droge u Brazilu i Indiji.

3.9. Uporaba u kozmetici

U industriji mirisa danas su važne dvije vrste lišaja – *Pseudevernia furfuracea* (drveni lišaj) i *Evernia prunastri* (hrastov lišaj). Glavni mirisni sastojci tih vrsta su monoterpeni (kamfor, borneol, cineol, geraniol) (4). Danas se oko 9000 tona lišaja godišnje upotrijebi u proizvodnji parfema no ta se količina neprestano smanjuje. Osim ekoloških razloga to je posljedica i činjenice da su neke vrste lišaja alergogene. Među alergenima prisutnim u lišajima ističu se usninska kiselina, atranorin i everninska kiselina. Kako se lišaj skuplja zajedno s korom drveta na kojemu raste, moguća je i pojava alergije na biljne tvari iz podloge (33).

Mnogi spojevi koje nalazimo u lišajima koriste se u preparatima za zaštitu od sunca. To su fenolni spojevi atranorin, panarin, parietin, giroforna, usninska i lekanorna kiselina zatim različiti ksantoni, antrakinoni itd. Utvrđeno je da ti spojevi inhibiraju UV-inducirano vezanje 8-metoksipsolarena na proteine, ali sam mehanizam te inhibicije nije detaljno istražen (34).

3.10. Ostale uporabe

Mnoge vrste lišaja izlučuju intenzivno obojene pigmente. Još su američki Indijanci koristili lišaje u proizvodnji boja, a neki od njih su i danas u uporabi. Primjerice, vrsta *Letharia vulpina* (L.) Hue. sadrži žutu vulpinsku kiselinu. Smeđa boja dobiva se od lišaja *Parmelia omphalodes* (L.) Ach. Za bojanje vune u crveno-smeđu boju koriste se vrste *Arctoparmelia centrifuga* (L.) Hale, *Aspicilia calcarea* (L.) Mudd. i neke vrste rodova *Cladonia* i *Parmelia*. Za bojanje drva koriste se vrste roda *Bryoria* koje daju crnu boju. Himalajski pastiri rade boju za lice tako da pljunu na kamen na kojemu je lišaj *Buellia cf. subsonoroides* S. Singh & Awas. da bi dobili pastu koju nanose na kožu. Ukoliko se depsidi i depsidoni prisutni u vrsti *Rocella tinctoria* D.C. hidroliziraju pomoću amonijaka nastaje orcinol. Daljnjom reakcijom orcinola s amonijakom u prisutnosti zraka nastaje crveno-ljubičasta smjesa fenoksazona koja se naziva orcein. Ako se ista reakcija odvija u bazičnom mediju oksidacija i polimerizacija idu još dalje te nastaje lakmus. On se koristi kao indikator kiselosti, uglavnom impregniran na papiru. Ipak, upotreba lišaja za proizvodnju boja sve je rjeđa zbog ugroženosti mnogih vrsta (4).

Egipćani su lišaje koristili u mumificiranju tako što su njima punili tjelesne šupljine mumija. Uglavnom su to bile vrste rodova *Evernia* i *Pseudevernia*. Vrsta *Alectoria sarmen-tosa* se stavljala u vatru za stvaranje dima kojeg su Indijanci koristili za sporazumijevanje na daljinu. Vrsta *Bryoria fremontii* (Tuck.) Brodo & D. Hawksw. se u smjesi s blatom koristila za popunjavanje rupa u drvenim kolibama u Kanadi. Lišaj *Cladina stellaris* (Opiz)

Brodo se u velikim količinama koristi za ukrašavanje vijenaca i buketa i za izradu arhitektonskih modela. U Kanadi su se vrste *Alectoria sarmentosa* (Ach.) Ach. i *Usnea longissima* koristile kao smjesa za punjenje madraca i jastuka u sezonskim kampovima. Zbog svojih upijajućih svojstava vrste *Alectoria sarmentosa*, *Ramalina menziesii* Tayl. i *Usnea* spp. rabile su se u izradi pelena za bebe i higijenskih uložaka. Vrsta *Letharia vulpina* dobila je svoje ime jer su njome nekad trovali vukove i lisice.

Zbog svoje osjetljivosti na onečišćenje, lišaji se upotrebljavaju kao bioindikatori za procjenu onečišćenja nekog područja (35). Postoje skale (npr. Hawksworth-Rose, te Van Haluwyn-Lerond) u kojima je zabilježeno koliko je koja vrsta otporna na onečišćenje te se prema vrstama koje rastu na određenom području procjenjuje onečišćenje zraka. Na onečišćenja su često najosjetljiviji grmasti lišaji, koji su zbog svoje razgranate stieljke najviše izloženi zraku. Zbog sposobnosti kompleksiranja teških metala, u blizini tvornica lišajima se mjeri onečišćenje teškim metalima. Lihenometrija je grana koja se bavi proučavanjem brzina rasta pojedinih vrsta lišaja. Oni rastu vrlo sporo, nekoliko milimetara godišnje pa se veličina lišaja može koristiti za određivanje starosti skulpture ili građevine na kojoj rastu.

ZAKLJUČAK

Lišaji se tradicionalno rabe u različitim granama ljudske djelatnosti, od tekstilne industrije do kozmetike i prehrane, a u novije vrijeme pobuđuju i interes farmaceutske industrije. Raznolikost uporaba je posljedica prisutnosti velikog broja kemijskih spojeva prisutnih u lišajima. S farmaceutskog stajališta, od najvećeg su interesa fenolni spojevi i polisaharidi. Fenolni spojevi su se pokazali vrlo djelotvornima na gram-pozitivne mikroorganizme, ali to djelovanje nije ograničeno samo na njih nego i na gram-negativne organizme, kvasnice, dermatofite te viruse i parazite. Među mnogobrojnim ispitivanim spojevima, svojom aktivnošću ističe se usninska kiselina. Većina ispitivanih ekstrakata lišaja pokazala je i antitumorsko djelovanje, koje se moglo pripisati jednoj ili više tvari izoliranoj iz biljnog materijala. Interesantno je i imunostimulirajuće djelovanje koje pokazuju polisaharidi prisutni u islandskom lišaju, *Cetraria islandica*, te vrstama *Thamnolia vermicularis* i *Peltigera canina*. Spojevi prisutni u lišajima pokazuju i neka djelovanja karakteristična za analgoantipiretike poput analgetskog, antipiretskog, antitrombotskog i protuupalnog djelovanja. Jedan dio tih djelovanja se mogao pripisati usninskoj i difraktaičnoj kiselini. Te kiseline, kao i neki drugi metaboliti lišaja, pokazali su i gastroprotektivno djelovanje. To je naročito interesantno jer je jedan od najvećih nedostataka nekih od analgoantipiretika koji su danas u uporabi upravo uloga u nastanku želučanog ulkusa. S obzirom na veliku raznolikost metabolita i djelovanja koje oni pokazuju, lišaji predstavljaju vrlo interesantno istraživačko područje. Stoga se s razlogom može pretpostaviti da će ovi zanimljivi simbionti i njihovi produkti sve više zauzimati mjesto u suvremenim načinima liječenja.

Characteristics, chemistry and use of lichens

by M. Zovko, I. Kosalec, Z. Kalođera, A. Partl, S. Pepeljnjak

S u m m a r y

Lichens are traditionally used in many aspects of human activities, from textile industry to cosmetics and nutrition. Recently, lichen metabolites have become a subject of intense pharmaceutical research. Among them, phenolic compounds and polysaccharides are the most interesting. Examples of metabolically active phenolics include some phenolic acids such as usnic, protolichesterinic and diffractaic acid, derivatives of emodin and orselinate, longissiminone and others. Those and other phenolic compounds have demonstrated antimicrobial, antiviral, antitumor, analgesic, antipyretic, anti-inflammatory, gastroprotective and many other pharmacological activities. On the other hand, lichen polysaccharides have demonstrated significant immunostimulatory activity. Thus, lichens and the products obtained from lichens offer a promising field for research of new pharmacologically active substances.

Literatura-References

1. T. Friedl, B. Büdel, Photobionts; U: T. H. Nash III (ur.), Lichen biology, Cambridge University Press, Cambridge, 1996., 8.-23.
2. B. R. Speer University of California, Museum of Paleontology, Index of /fungi/lichens, <http://www.ucmp.berkeley.edu/fungi/lichens>.
3. Loveable Lichens, <http://www.earthlife.net/lichens/>.
4. D. Fahselt, *Symbiosis* **16** (1994) 117.
5. E. Garcia-Junceda, A. Gonzales, C. Vicente, *Myton* **45** (1985) 153.
6. I. A. Schepetkin, M. T. Quinn, *Int. Immunopharmacol.* **6** (2006) 317.
7. E. S. Ólafsdóttir, K. Ingólfssdóttir, *Planta Med.* **67** (2001) 199.
8. J. D. Lawrey, *Bryologist* **89** (1986) 111.
9. M. Cocchiello, N. Skert, P. L. Nimis, G. Sava, *Naturwiss.* **89** (2002) 137.
10. M. McEvoy, L. Nybakken, K. Asbjørn Solhaug, Y. Gauslaa, *Mycol. Progr.* **5** (2006) 221.
11. S. Huneck, *Naturwiss.* **86** (1999) 559.
12. C. O. Esimone, M. U. Adikwu, *Fitoterapia* **70** (1999) 428.
13. L. Campanella, M. Delfini, P. Ercole, A. Iacoangeli, G. Risuleo, *Biochimie* **84** (2002) 329.
14. K. Ingólfssdóttir, G. A. C. Chung, V. G. Skúlason, S. R. Gissurarson, M. Vilhelmsdóttir, *Europ. J. Pharm. Sci.* **6** (1998) 141.
15. E. A. B. De Carvalho, P. P. Andrade, N. H. Silva, E. C. Pereira, R. C. B. Q. Figueiredo, *Micron* **36** (2005) 155.
16. A. Fournet, M. E. Ferreira, A. Rojas de Arias, S. Torres de Ortiz, A. Inchausti, G. Yahuff, W. Quilhot, E. Fernandez, M. E. Hidalgo, *Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **116** (1997) 51.
17. C. Bézivin, S. Tomasi, F. Lohézic-Le Dévéhat, J. Boustie, *Phytomedicine* **10** (2003) 499.

18. F. Bucar, I. Schneider, H. Ögmundsdóttir, K. Ingólfssdóttir, *Phytomedicine* **11** (2004) 602.
19. M. Cardarelli, G. Serino L. Campanella, P. Ercole, F. De Cicco Nardone, O. Alesiani, F. Rossiello, *Cell. Mol. Life Sci.* **53** (1997) 667.
20. K. Ingólfssdóttir, K. Jurcic, B. Fischer and H. Wagner, *Planta Med* **60** (1994) 527.
21. E. S. Olafsdóttir, S. Omarsdóttir, B. S. Paulsen, H. Wagner, *Phytomedicine* **10** (2003) 318.
22. S. Omarsdóttir, J. Freysdóttir, H. Barsett, B. Smestad Paulsen, E. S. Olafsdóttir, *Phytomedicine* **12** (2005) 461.
23. E. Okuyama, K. Umeyama, M. Yamazaki, Y. Kinoshita, Y. Yamamoto, *Planta Med.* **61** (1995) 113.
24. C. S. Vijayakumar, S. Viswanathan, M. Kannappa Reddy, S. Parvathavarthini, A. B. Kundu, E. Sukumar, *Fitoterapia* **71** (2000) 564.
25. M. I. Choudhary, Azizuddin, S. Jalil, A. Rahman, *Phytochemistry* **66** (2005) 2346.
26. M. Bačkor, J. Gaburjaková, J. Hudák, W. Ziegler, *Acta Facultatis Naturalium Universitatis Comenianae; Physiologia Plantarum XXIX* (1997) 67.
27. K. Moo-Sung, L. Kyung-Ae, *J. Ethnopharmacol.* **105** (2006) 342.
28. Y. Bayir, F. Odabasoglu, A. Cakir, A. Aslan, H. Suleyman, M. Halici, C. Kazaz, *Phytomedicine* **13** (2006) 584.
29. F. Odabasoglu, A. Cakir, H. Suleyman, A. Aslan, Y. Bayir, M. Halici, C. Kazaz, *J. Ethnopharmacol.* **103** (2006) 59.
30. M. Halici, F. Odabasoglu, H. Suleyman, A. Cakir, A. Aslan, Y. Bayir, *Phytomedicine* **12** (2005) 656.
31. W. Schaffner, *Ljekovito bilje: Kompendij*, Leo commerce, 1999, 66.
32. G. W. Neff, K. Rajender Reddy, F. A. Durazo, D. Meyer, R. Marrero, N. Kaplowitz, *J. Hepatol.* **41**(2004) 1062.
33. M. Sheu, E. L. Simpson, S. V. Law, F. J. Storrs, *J. Am. Acad. Dermatol.* **55**(2006) 332.
34. E. Farnandez, A. Reyes, M. E. Hidalgo, W. Quilhot, *J. Photochem. Photobiol. B. Biology* **42**(1998) 195.
35. P. Wolseley, P. James, *Brit. Lichen Soc. Bull.* **91** (2002) 1.

Primitljeno 7. veljače 2007.