UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ivan N. Milovanović

SPOSOBNOST APSORPCIJE SELENA I BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKATA MICELIJE ODABRANIH VRSTA BASIDIOMYCOTINA

Doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ivan N. Milovanović

ABILITY OF SELENIUM ABSORPTION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF MYCELIAL EXTRACTS OF SELECTED BASIDIOMYCOTINA SPECIES

Doctoral dissertation

Belgrade, 2014

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

dr. Mirjana Stajić, vanredni profesor, mentor
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr. Jelena Vukojević, redovni profesor, mentor
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr. Ilija Brčeski, vanredni profesor, član
Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Smatram da je ovo pravi trenutak kada mogu da objedinim utiske od predhodnih nekoliko godina i da izrazim svoju zahvalnost svima koji su doprineli da one budu jedno nezamenljivo iskustvo.

Prvenstveno zahvalnost dugujem onima koji su svakodnevno bili prisutni: mentorima prof. dr Jeleni Vukojević i prof. dr Mirjani Stajić zahvaljujem na nepresušnoj pomoći i vođenju, stručnim sugestijama i komentarima prilikom istraživanja i pisanja rada. Iskreno se zahvaljujem i prof. dr Iliji Brčeski na korisnim savetima, saradnji i pomoći u izradi doktorske disertacije.

Hvala mojim kolegama Aleksandru Kneževiću, dr Jasmini Ćilerđić, dr Milošu Stuparu i dr Tatjani Stanojković, kao i mnogobrojnim kolegama sa Instituta MOL koji su tokom eksperimentalnog rada dali stručne savete i sugestije.

Veliko Vam hvala na pruženom prijateljstvu, razumevanju i entuzijazmu, prilikom izvođenja eksperimentalnog dela rada i onda kada nije bilo sve po planu.

Takođe, hvala Ministarstvu prosvete i nauke Republike Srbije, koje je finansiralo projekat "Karakterizacija i primena metabolita gljiva i utvrđivanje potencijala novih biogungicida" 170032, u okviru koga je i rađena ova teza.

Naravno, hvala mojim dragim i mnogobrojnim drugarima i prijateljima koji su imali razumevanja za moj rad i ambicije tokom ovih godina.

Mojim roditeljima, devojci, tetki i teči, i mentorima na ukazanoj prilici da učim, radim ono što volim i na svemu što su učinili da danas budem to što jesam.

Autor

REZIME

Lekovita svojstva gljiva baziraju se na prisustu velikog broja bioaktivnih jedinjenja kao što su polisaharidi, terpenoidi, esencijalne amino kiseline, nukleotidi, nukleinske kiseline, steroli, nezasićene masne kiseline i drugi, kao i značajnog sadržaja makro- i mikroelemenata i vitamina. Imaju sposobnost usvajanja neorganskog selena, njegove transformacije u organske, bolje iskoristljive, forme i akumulacije.

Ciljevi istraživanja su bili: (1) praćenje prinosa biomase micelije 8 vrsta makromiceta i efikasnosti apsorbcije selena pri kultivaciji u selenitom obogaćenom medijumu, (2) proučavanje efekta visokih koncentracija selena na produkciju micelije, morfologiju i ultrastrukturu hifa, kao i na kapacitet apsorpcije i akumulacije kod *Pleurotus ostreatus* i (3) određivanje antioksidativnog, antifungalnog i citostatičkog potencijala ekstrakata neobogaćene i selenom obogaćene micelije odabranih vrsta.

Najviši prinos biomase zabeležen je u medijumu bez selena, dok je u njegovom prisustvu i sa povećanjem koncentracije uočen linearni pad produkcije. *Ganoderma applanatum* je imala naiviši prinos (27.8 g/L), dok je najmanja produkcija izmerena kod *Lenzites betulinus* (5.2 g/L). Vrednosti apsorbovanog selena su se kretale u opsegu od 1.4 μg/g (*Pleurotus eryngii*) do 20.3 μg/g (*P. ostreatus*). Produkcija biomase *P. ostreatus* je bila najveća u odsustvu selena (11.8 g/L), koncentracije od 5.0, 10.0 i 20.0 mg/L nisu imale efekat na rast micelije, više koncentracije su značajno inhibirale prinos biomase, a koncentracija od 1000.0 mg/L je bila MIC. Količina apsorbovanog selena se kretala u opsegu od 251.2 μg/g (pri koncentraciji u medijumu od 5.0 mg/L) do 938.9 μg/g (20.0 mg/L), a procenat usvajanja od 3.6% (100.0 mg/L) do 53.3% (5.0 mg/L). Pri koncentracijama od 100.0 mg/L i 500.0 mg/L uočena je pojava cigla-crvenkaste boje micelije sa značajnim morfološkim i ultrastrukturnim promenama u poređenju sa kontrolom: manja gustina hifa, tanak ćelijski zid sa izraženim ekstracelularnim matriksom, učestalija septiranost a ređe grananje hifa i pojava klamp-veza. Citološkom analizom je utvrđeno da je selen akumuliran najvećim delom u ćelijskoj membrani i vakuolama, dok su promene na ćelijskom zidu bile neznatne. Antioksidativni kapacitet neobogaćenih i selenom obogaćenih etanolnih ekstrakata micelije testiranih vrsta zavisio je od vrste i koncentracije ekstrakta. Na osnovu EC_{50} vrednosti ekstrakata antioksidativna aktivnost je opadala sledećim redosledom: *L. betulinus* > *G. lucidum* >

G. applanatum > *P. pulmonarius* > *P. ostreatus* > *P. eryngii* > *T. hirsuta* > *F. velutipes*. Prisustvo selena u miceliji značajno je povećalo nivo neutralizacije DPPH radikala koji je bio u korelaciji sa sadržajem fenola koji se kretao u opsegu od 8.2 μg GAE/mg suvog ekstrakta (*T. hirsuta*) do 35.0 μg GAE/mg suvog ekstrakta (*L. betulinus* i *G. applanatum*). Produkcija flavonoida je zabeležena samo kod *G. lucidum*, *P. eryngii* i *L. betulinus* u relativno malim količinama, kako u odsustvu tako i u prisustvu selena. Mikrodilucionom metodom je utvrđen stepen osetljivosti 14 vrsta mikromiceta na različite ekstrakte i njihove koncentracije. Ispitivani ekstrakti nisu imali inhibitorni uticaj na rast *Cladosporium* sp., *Microsporum gypseum* i *Trichophyton mentagrophytes*, čak su neki stimulisali njihov rasta. Bazirano na MIC vrednostima ekstrakata antifungalni kapacitet je opadao sledećim redosledom: *G. applanatum* > *T. hirsuta* > *L. betulinus*, *P. pulmonarius* > *P. eryngii* > *G. lucidum*, *F. velutipes* > *P. ostreatus*. Nijedan od ekstrakata i koncentracija nije imao fungicidni efekat. Osetljivost testiranih mikromiceta na komercijalni antimikotik, ketokonazol, je bila mnogo veća u poređenju sa ekstraktima. Etanolni ekstrakti micelije proučavanih vrsta, bez i obogaćeni selenom, su pokazali nisku citotoksičnu aktivnost prema HeLa i LS174 ćelijama u poređenju sa komercijalnim citostatikom *cis*-DDP. Na osnovu dobijenih IC_{50} vrednosti, citotoksični potencijal ekstrakata na ispitivane ćelijske linije je opadao sledećim redosledom: *T. hirsuta* > *G. applanatum* > *P. eryngii* > *F. velutipes* > *G. lucidum* > *P. pulmonarius* > *L. betulinus* > *P. ostreatus*. Najvišu IC_{50} za HeLa ćelije imao je ekstrakt micelije *T. hirsuta* (116.3 μg/mL), dok je ekstrakt *G. applanatum* pokazao najniži efekat na LS174 ćelija (231.4 μg/mL).

Ključne reči: Lekovite gljive, Selen, Morfo-fiziološka analiza, Biološka aktivnost
Naučna oblast: Biologija
Uža naučna oblast: Biologija gljiva
UDK broj: 546.23::635.8 (043.3)

ABSTRACT

Medicinal properties of mushrooms are based on presence of numerous bioactive compounds, such as polysaccharides, terpenoids, essential amino acids, nucleotids, necleic acids, sterols, unsaturated fatty acids etc., as well as on significant content of micro- and macroelements and vitamins. Mushrooms have ability to absorb inorganic selenium, to transform it to organic and better bio-available forms and to accumulate it.

The aims of the researche: (1) study of mycelial biomass production and efficiency of selenium absorption during cultivation in selenite-enriched medium, (2) study of effect of high selenium concentration on mycelium production, morphology and ultrastructure of hyphae, as well as capacity of its absorption and acumulation in *Pleurotus ostreatus* and (3) determination of antioxidant, antifungal and cytotoxic potential of non-amended and selenium-amended mycelia of selected species.

The highest biomass yield was noted in the non-amended medium, while in the selenium presence and with increase of its concentration linear decrease of production was observed. *Ganoderma applanatum* was characterized by the best yield (27.8 g/L), while the lowest production was measured in *Lenzites betulinus* (5.2 g/L). Values of absorbed selenium were ranged between 1.4 μg/g (*Pleurotus eryngii*) and 20.3 μg/g (*P. ostreatus*). Biomass production in *P. ostreatus* was the highest in selenium absence (11.8 g/L), concentrations of 5.0, 10.0 and 20.0 mg/L had no any effect on mycelium growth, higher concentrations significantly inhibited yield, and concentration of 1000.0 mg/L was MIC. Amount of absorbed selenium was in range from 251.2 μg/g (at medium concentration of 5.0 mg/L) to 938.9 μg/g (20.0 mg/L), and percentage of absorption from 3.6% (100.0 mg/L) to 53.3% (5.0 mg/L). Appearance of mycelium of brick-red colour with significant morphological and ultrastructural changes in comparison with the control was observed at the concentrations of 100.0 mg/L and 500.0 mg/L. Hyphal density was lower, the cell wall was thick with more expressed extracellular matrix, septa were abundant, and branch frequency and occurrence of clamp-connections were rare. Cytological analysis demonstrated that majority of selenium was accumulated in cell membrane and vacuoles, while changes at cell wall was insignificant. Antioxidant capacity of non-amended and selenium amended mycelium extract of tested species depended on species and extract concentration. Based on extract EC_{50} value, antioxidant activity decreased in the following order: *L.*

betulinus > *G. lucidum* > *G. applanatum* > *P. pulmonarius* > *P. ostreatus* > *P. eryngii* > *T. hirsuta* > *F. velutipes*. Selenium presence in the mycelium significantly increased level of DPPH• scavenging, which was in correlation with phenol content that was in range from 8.2 μg GAE/mg of dry extract (*T. hirsuta*) to 35.0 μg GAE/mg of dry extract (*L. betulinus* and *G. applanatum*). Flavonoid production was noted only in *G. lucidum*, *P. eryngii* and *L. betulinus* in relatively low amounts, both in absence and presence of selenium. Sensitivity level of 14 tested micromycetes on various extracts and their concentrations was observed by microdilution method. Studied extracts had no any inhibitory effect on growth of *Cladosporium* sp., *Microsporum gypseum* and *Trichophyton mentagrophytes*, some of them even stimulated their growth. Based on MIC values of extracts, antifungal capacity was decreased in the following order: *G. applanatum* > *T. hirsuta* > *L. betulinus*, *P. pulmonarius* > *P. eryngii* > *G. lucidum*, *F. velutipes* > *P. ostreatus*. None of extracts and concentrations had any fungicidal effect. Sensitivity of tested micromycetes on commercial antimycotic ketoconazole was significantly higher in comparison with the extracts. Tested ethanol extracts, without and with selenium, showed low cytotoxic activity against HeLa and LS174 cells in comparison with commercial cytostatic *cis*-DDP. Based on the obtained IC_{50} values, cytotoxic potential of extracts against studied cell lines was decreased in the following order: *T. hirsuta* > *G. applanatum* > *P. eryngii* > *F. velutipes* > *G. lucidum* > *P. pulmonarius* > *L. betulinus* > *P. ostreatus*. The highest IC_{50} for HeLa cells had mycelium extract of *T. hirsuta* (116.3 μg/mL), while *G. applanatum* extract showed the lowest effect on LS174 cells (231.4 μg/mL).

Key words: Medicinal mushrooms, Selenium, Morpho-physiological characteristics, Biological activities
Scientific field: Biology
Specific scientific field: Mycology
UDK number: 546.23::635.8 (043.3)

LISTA SKRAĆENICA

$Al(NO_3)_3$ x 9 H_2O – aluminijum nitrat nona-hidrat

ATCC – kolekcije Američkog centra kultura

BEOFB – Institut za Botaniku, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

BHA – butil hidroksianizol

BHT – butil hidroksitoluen

CFU – jedinica koja formira koloniju

CH_3CO_2K – kalijum acetat

cis-DDP – cis-diaminedihloroplatinium

dH_2O – destilovana voda

DMSO – dimetil sulfoksid

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DPPH – 2,2-difenil,1-pikril hidrazil

EC_{50} – koncentracija ekstrakta koja neutrališe 50% radikala

FBS – fetalni goveđi serum

GAE – ekvivalent galne kiseline

GPx – glutation-peroksidaze

GPx1 – ćelijska glutation-peroksidaza

GPx2 – gastrointestinalna glutation-peroksidaza

GPx3 – plazma glutation-peroksidaza

H_2Se – selenid

H_2O_2 – vodonik peroksid

HAI – Institut za Evoluciju, Uninerzitet u Haifi, Izrael

HCl – hlorovodonična kiselina

HeLa – ćelijska linija humanog adenokarcinoma grlića materice

HMGCoA – 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A

HNO_3 – azotna kiselina

IC_{50} – koncentracija ekstrakta koja inhibira preživljavanje ćelija za 50%

LS174 – ćelijska linija humanog karcinoma kolone

MA – sladni agar

MFC – minimalna fungicidna koncentracija

MIC – minimalna inhibitorna koncentracija

Milli-Q – bidestilovna voda

MTT – test mikrokulture tretirane tetrazoliumom

Na_2CO_3 – natrijum karbonat

Na_2SeO_3 – natrijum selenit

NaCl – natrijum hlorid

$NaHSeO_3$ – natrijum hidrogen selenit

NK – prirodne ćelije ubice

O_2^- – superoksid anjon radikal

OCl^- – hipohloritni anjon

•OH – hidroksil radikal

PG – propil-galat

PLGPx – fosfolipo-hidroksiperoksidna glutation-peroksidaza

ppm – milioniti deo jedinice

QE – ekvivalent kvercetina

RNK – ribonukleinska kiselina

RPMI – Roswell park memorijalni institut

RPMI 1640 –medijum za kultivaciju ćelijskih linija kancera

SDB – Saburo-dekstrozni bujon

Se – selen

Se^o – elementarni selen

SeO_3^{2-} – selenit

SeO_4^{2-} – selenat

TBHQ – tert-butil-hidroksihinon

SADRŽAJ

1. UVOD ..... - 1 -

1.1. Medicinski značaj odabranih vrsta makromiceta ..... - 2 -

1.1.1. Vrste roda Pleurotus (Fr. P.) Kumm. ..... - 2 -

1.1.2. Vrste roda Flammulina P. Karst. ..... - 4 -

1.1.3. Vrste roda Trametes Fr. ..... - 6 -

1.1.4. Vrste roda Lenzites Fr. . ..... - 7 -

1.1.5. Vrste roda Ganoderma P. Karst. ..... - 8 -

1.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata lekovitih vrsta gljiva ..... - 9 -

1.2.1. Oksidativni stres i izazivači ..... - 9 -

1.2.2. Antioksidativni mehanizam ..... - 12 -

1.2.3. Antioksidansi ..... - 13 -

1.3. Antifungalna aktivnost ekstrakata lekovitih vrsta gljiva ..... - 14 -

1.4. Citoksična aktivnost ekstrakata lekovitih vrsta gljiva ..... - 15 -

1.5. Selen ..... - 16 -

1.5.1. Selen u biosferi ..... - 17 -

1.5.2. Metabolizam selena ..... - 18 -

1.5.3. Selen i ishrana ..... - 19 -

1.5.3. Selen i gljive ..... - 21 -

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA ..... - 22 -

3. MATERIJAL I METODE ..... - 24 -

3.1. Proučavane vrste i priprema inokuluma ..... - 25 -

3.2. Određivanje produkcije biomase ..... - 26 -

3.3. Merenje koncentracije apsorbovanog selena u miceliji ..... - 26 -

3.4. Određivanje efekta visokih koncentracije selena na morfo-fiziološke i ultrastrukturne karakteristike micelije ..... - 27 -

3.5. Određivanje biololoških aktivnosti ekstrakata testiranih vrsta gljiva ..... - 28 -

3.5.1. Kultivacija ..... - 28 -

3.5.2. Priprema ekstrakata micelije ..... - 28 -

3.5.3. Antioksidativna aktivnost ..... - 28 -

3.5.3.1. DPPH test ..... - 28 -

3.5.3.2. Određivanje sadržaja fenola - 29 -
3.5.3.3. Određivanje sadržaja flavonoida - 29 -
3.5.4. Antifungalna aktivnost - 29 -
3.5.5. Citotoksična aktivnost - 30 -
3.5.5.1. Ćelijske linije kancera - 30 -
3.5.5.2. Tretman ćelijskih linija - 31 -
3.5.5.3. Određivanje stepena preživljavanja ćelija (MTT test) - 31 -
3.6. Statistička analiza - 32 -
4. REZULTATI I DISKUSIJA - 33 -
4.1. Prinos biomase i nivo apsorpcije selena kod proučavanih vrsta makromiceta - 34 -
4.1.1. Sadržaj selena u kultivacionom medijumu - 34 -
4.1.2. Efekat koncentracije selena na prinos biomase micelije - 35 -
4.1.3. Uticaj koncentracije selena na sposobnost apsorpcije - 36 -
4.2. Efekat visokih koncentracije selena na morfo-fiziološke karakteristike micelije *Pleurotus ostreatus* - 37 -
4.2.1. Efekat visokih koncentracije selena na rast i apsorpcioni kapacitet micelije - 37 -
4.2.2. Efekat visokih koncentracije selena na morfologiju i ultrastrukturu micelije - 40 -
4.3. Antioksidativna aktivnost - 45 -
4.3.1. Neutralizacija DPPH radikala - 45 -
4.3.2. Sadržaj fenola i flavonoida - 51 -
4.4. Antifungalna aktivnost - 54 -
4.5. Citotoksični potencijal - 60 -
5. ZAKLJUČCI - 63 -
6. LITERATURA - 67 -

1. UVOD

1.1. Medicinski značaj odabranih vrsta makromiceta

Lekovite gljive imaju dugu istoriju korišćenja u narodnoj medicini. Najstariji pisani podatak (iz 3000. godina pre nove ere) o korišćenju gljiva za lečenje raznih bolesti potiče iz Indije. Rimljani su ih smatrali hranom bogova, Egipćani su ih prinosili na dar Bogu Ozirisu, a narodi Dalekog Istoka su ih zvali "eliksirom života". Tretman tinkturama gljiva dugi niz godina je predstavljao nezamenljiv i gotovo jedini poznat i dostupan vid lečenja drevnih naroda. Poslednjih 50 godina iskustva i znanja tradicionalne medicine o lekovitim svojstvima gljiva potvrđena su naučnim metodama i kliničkim studijama. Za razliku od lekova koji leče posledice ali ne i uzroke bolesti i imaju niz neželjenih efekata, preparati na bazi lekovitih vrsta gljiva deluju na uspostavljanje i održavanje biološke homeostaze kao i poboljšanje odbrambenog sistema organizma.

Metaboliti velikog broja vrsta gljiva imaju pozitivan efekat na imuni sistem čoveka i stoga se mogu koristiti u tretmanu i lečenju raznih bolesti uključujući tumore, kardiovaskularna oštećenja, visok nivo šećera i holesterola u krvi, razne vrste infekcija, alergija, neurodegenerativnih poremećaja i dr. Njihovo imunomodulirajuće dejstvo bazirano je na stimulaciji produkcije proteina citokina i perforina koji pospešuju aktivnost makrofaga odnosno eliminaciju tumorskih ćelija (Wasser i Weis, 1999a,b). Lekovita svojstva gljiva se baziraju na prisustu velikog broja bioaktivnih jedinjenja, kao što su polisaharidi (uglavnom α/β-glukani), triterpeni, esencijalne amino kiseline, nukleotidi (adenozin i deoksiadenozin), nukleinske kiseline, steroli, nezasićene masne kiseline i drugi, kao i značajnog sadržaja makro- i mikroelemenata (Ca, P, Fe, K, Mg, Se i Ge) i vitamina (B grupe-B1, B2, B3, B5, B6, B11, B12, C i D) (Erjavec i dr., 2012).

1.1.1. Vrste roda Pleurotus (Fr. P.) Kumm

Vrste roda *Pleurotus* su kosmopolitski rasprostranjene i zbog karakterističnog izgleda plodonosnih tela poznate su pod nazivom šumska ostriga (Slika 1). Njihova plodonosna tela imaju visoku hranljivu vrednost jer su bogata ugljenim hidratima (3% – 28%, a kod *P. ostreatus* čak 57% sveže mase), dijetetskim vlaknima (3% – 32%, kod *P. ostreatus* do 47% suve mase), proteinima (10% – 30% suve mase, zavisno od vrste),

esencijalnim amino kiselinama, posebno alaninom, glutaminom i glutaminskom kiselinom (25% – 35% suve mase), vitaminima (C, A, B2, B1, D i B3) i mineralima (K, P, Mg, Ca, Na, Fe, Se, Zn, Cu i Mn) a siromašna lipidima (3% – 5% suve mase) (Gunde-Cimerman, 1999). Pored značajnog sadržaja mikroelemenata, vrste ovog roda imaju sposobnost da apsorbuju neke od njih iz spoljašnje sredine. Stajić i dr. (2002, 2006) i Milovanović i dr. (2013) su pokazali da *Pleurotus* spp. mogu da usvajaju i akumuliraju selen (Se) iz selenom obogaćenog medijuma i na taj način predstavljaju njegov odličan dijetetski izvor.

Slika 1. Izgled plodonosog tela: **A.** *Pleurotus ostreatus*, **B.** *P. eryngii*, **C.** *P. pulmonarius*

Od davnina se *P. ostreatus* koristio za ublažavanje bolova i relaksaciju mišića, kao i u lečenju ukočenosti ekstremiteta i tetiva. Danas su dokazana lekovita svojstva 8 vrsta ovog roda: *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. citrinopileatus*, *P. tuber-regium*, *P. cornucopiae*, *P. calyptratus*, *P. eryngii* i *P. dryinus*. Ekstrakti micelije i plodonosnih tela ovih vrsta kao i jedinjenja izolovana iz njih imaju antihiperholesterolnu, imunomodulirajuću, antioksidativnu, antitumorsku, antihipertenzivnu, antihiperglikemijsku, antimikrobnu, antiinflamatornu i antiosteoporotsku aktivnost (Wasser i Weis, 1999a). Lekovitost ovih vrsta bazirana je pre svega na prisustvu polisaharida, među kojima su najvažniji β-1,3-D- i β-1,6-D-glukani, koji poseduju ključnu ulogu u aktivaciji makrofaga kao i u redukciji nivoa holesterola i glukoze u krvi (Manzi i Pizzoferrato, 2000). β-glukani iz ekstrakata plodonosnih tela i micelije *P. ostreatus*, *P. citrinopileatus*, *P. florida* i *P. tuber-regium* takođe poseduju značajni antikancerogeni potencijal (Gregori i dr., 2007). *P. ostreatus*, *P. eryngii* i *P. citrinopileatus* kao producenti lovastatina, jedinjenja male molekulske mase, predstavljaju najefikasnije prirodne reducente nivoa holesterola i triglicerida u krvi

(Wasser i Weis, 1999a). Lovastatin je glavni inhibitor HMGCoA reduktaze, ključnog enzima u metabolizmu holesterola, koji katalizuje prevođenje HMGCoA u mevalonat (Gunde-Cimerman i dr., 1993). Visok antioksidativni kapacitet je takođe karakterističan za vrste ovog roda (Bobek i Galbavy, 2001). Metanolni i etanolni ekstrakti *P. florida* i *P. ostreatus* su pokazali izuzetnu efikasnost u redukciji hidroksilnih i lipidnih radikala, koja je bila u korelaciji sa povećanim sadržajem fenolnih jedinjenja kao i znatno višom koncentracijom aminokiselina sa fenolnom grupom (cisteina i metionina) u poređenju sa drugim testiranim vrstama (*Agaricus bisporus* i *Lentinus edodes*) (Jayakumar i dr., 2007). Eringin je odgovoran za antifungalnu, a termostabilne ribonukleaze i protein xb68Ab za antivirusnu i imunomodulirajuću aktivnost ekstrakata plodonosnih tela *P. eryngii* (Fu i dr., 2003; Wang i Ng, 2004). Ovi ekstrakti takođe igraju važnu ulogu u stvaranju koštanog tkiva pošto sadrže nesteroidna jedinjenja (17 β-estradiol) i neke sterole koji imaju aktivnost sličnu estrogenu (Yaoita i dr., 2002; Kim i dr., 2006; Shimizu i dr., 2006). Eringolizin iz ekstrakata bazidiokarpa *P. eryngii* je nosilac citostatičke aktivnosti protiv leukemije kao i antibakterijske aktivnosti protiv *Bacillus* spp. (Ngai i Ng, 2006), dok je ergotionin antioksidativni agens (Dubost i dr., 2007). Metanolni ekstrakti *P. pulmonarius* su efikasnija antiinflamatorna i antitumorska sredstva od lekova diklofenaka i cisplatina, a takođe i dobri antialergijski agensi jer inhibiraju oslobađanje histamina (Nayana i dr., 2002; Baggio i dr., 2010). *P. tuber-regium* se od davnina koristi za tretman obolelih od kožnih i kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, kao i osoba sa stomačnim problemima i visokim krvnim pritiskom (Stamets, 2000).

Zbog nutritivnih i medicinskih svojstava, 5 vrsta roda *Pleurotus* se komercijalno gaji i po godišnjoj svetskoj proizvodnji (900000 t) *P. ostreatus* zauzima treće mesto posle *A. bisporus* i *L. edodes* (Synytsya i dr., 2009).

1.1.2. Vrste roda Flammulina P. Karst.

Vrste roda *Flammulina* se tradicionalno koriste u ishrani tokom zimskih meseci, s obzirom na specifičnost klimatskih uslova u kojima rastu. Najpoznatija vrsta roda je *F. velutipes* u Japanu poznata kao Enoki, Enokidaki i Enokitaki, dok je u svetu široko prihvaćen naziv "zlatna igličasta gljiva" (Slika 2). Plodonosna tela imaju visoku

hranljivu vrednost jer su bogata ugljenim hidratima (10.57 g/100g sveže mase) i šećerima (8.29 g/100g sveže mase) među kojima su dominantni fruktoza i trehaloza (4.60 odnosno 2.63 g/100g sveže mase), dok je sadržaj proteina i masti znatno niži (0.47 odnosno 0.21 g/100g sveže mase) (Reis i dr., 2012). U mastima su najzastupljenije polinezasićene masne kiseline (74.3%) dok je procenat zasićenih a posebno mononezasićenih znatno niži (18.5% odnosno 7.2%). Količina pepela (0.88 g/100g sveže mase) govori o prisustvu mikroelemenata, a od vitamina najzastupljeniji su tokoferoli (1.81 μg/100g sveže mase).

Slika 2. Izgled plodonosnog tela *Flammulina velutipes*: **A.** samonikla, **B.** kultivisana

Pored visoke hranljive vrednosti plodonosnih tela, ekstrakti *F. velutipes* kao i pojedinačna jedinjenja se karakterišu značajnom biološkom aktivnošću, naime poseduju imunomodulirajući, antioksidativni i antikancerogeni potencijal. Tako su Chang i dr. (2010) saopštili da polisaharidi i proteini izolovani iz plodonosnih tela *F. velutipes*, pre svega FVE i EA6, poboljšavaju humoralni imuni odgovor stimulacijom produkcije mononukleocita, T-limfocita, kao i interleukina (IL-2) i interferona (IFN-γ), što se nalazi u osnovi borbe organizma protiv raznih infekcija i tipova tumora. Visok stepen antikancerogene aktivnosti pokazali su glikoprotein proflamin i protein flamin izolovani iz plodonosnih tela (Kanatsu i dr., 1963; Ikekawa, 1995). Međutim, i različiti ekstrakti *F. velutipes* su imali visok citostatički efekat, inhibirali su proliferaciju ćelijskih linija brojnih tipova karcinoma i smanjivali smrtnost za čak 40% (Ikekawa i dr., 1969; Gu i Leonard, 2006). Ekstrakti bazidiokarpa kao i ergotionein, aromatični tiol izolovan iz njih, mogu se smatrati dobrim antioksidansima jer sprečavaju oksidaciju oksiomioglobulina izolovanog iz mesa mačke, kao i oksidaciju lipida i akumulaciju slobodnih radikala (Akanmu i dr., 1991; Ashida i dr., 2005).

Visoki sadržaj aminokiselina i proteina kao i brojni biološki efekti su dovoljni razlozi za komercijalnu kultivaciju *F. velutipes* u zemljama Dalekog Istoka, Evrope i Severne Amerike.

1.1.3. Vrste roda Trametes Fr.

Predstavnici roda *Trametes* su rasprostranjeni gotovo u celom svetu, najčešće su saprobi na panjevima, i u tradicionalnoj medicini naroda Dalekog Istoka i Južne Amerike se koriste vekovima (Slika 3). Pored brojnih minerala i vitamina plodonosna tela vrsta ovog roda sadrže visok procenat polisaharida kao što je krestin koji je još 1977. godine stavljen na listu pomoćnih lekovitih sredstava u Japanu. Ovaj polisaharid pozitivno deluje na imuni sistem stimulišući sintezu i aktivnost limfocita, naročito pri oksidativnom stresu (Yuan i dr., 1996). U kombinaciji sa hemo i radio-terapijom krestin ima antikancerogeno dejstvo protiv različitih tipova kancera, kao što su kancer želuca, jednjaka, rektuma, pluća i mlečnih žlezda (Kobayashi i dr., 1993; Mizuno, 1996). Brojna klinička ispitivanja su potvrdila da ekstrakti plodonosnih tela *T. versicolor* deluju antiinflamatorno na gornje disajne puteve, urinarni i digestivni trakt, dok koreolan izolovan iz micelije ima antidijabetski i antiparazitski efekat protiv protozoe *Trichomonas vaginalis* (Ikuzawa i dr., 1985; Ying i dr., 1987).

Slika 3. Izgled plodonosnog tela: **A.** *Trametes versicolor*, **B.** *T. hirsuta*

Za razliku od *T. versicolor*, lekovita svojstva drugih vrsta ovog roda još uvek nisu dovoljno proučena. Objekat novijih istraživanja je *T. hirsuta* čiji su ekstrakti micelije i plodonosnih tela pokazali imunomodulirajući, antivirusni i antibakterijski efekat (Sivaprakasam i dr., 2011).

1.1.4. Vrste roda Lenzites Fr.

U tradicionalnoj kineskoj medicini tinkture i čajevi na bazi plodonosnih tela vrsta roda *Lenzites* korišćeni su protiv prehlade i za ublažavanje bolova. Rod je opisan još 1835. godine od strane švedskog naučnika Elias Magnus Frisa i do sada je potvrđeno ukupno 6 vrsta (Slika 4). Širok spektar različitih jedinjenja je izolovan iz ekstrakata micelije i bazidiokarpa i dokazani su njihovi imunomodulirajući, antioksidativni, antitumorski i antimikrobni efekti (Liu, 1978).

Slika 4. Izgled plodonosnog tela: **A.** *Lenzites betulinus*, **B.** *L. elegans*, **C.** *L. warnieri*

L. betulinus je najpoznatiji predstavnik roda i jedna od često korišćenih lekovitih vrsta u zemljama Dalekog Istoka. Ekstrakti njegovih plodonosnih tela se odlikuju značajnim antibakterijskim efektom i imunomodulirajućim potencijalom koji se nalazi u osnovi antikancerogene aktivnosti protiv HeLa i SMMC-7721, ćelijskih linija kancera grlića materice i jetre (Fujimoto i dr., 1994; Ren i dr., 2006; Yamaç i Bilgili, 2006). Međutim, i neka jedinjenja izolovana iz micelije, kao što su betulin A i B i polisaharidi, su visoko efikasni u neutralizaciji slobodnih radikala odnosno inhibiciji rasta nekih tipova tumora (čak i do 90%), na primer Sarkoma 180 i Erlihovog tumora (Ohtsuka i dr., 1973; Lee i dr., 1996). Rezultati Lee i dr. (1996) su pokazali da je betulin A čak četri puta efikasniji antioksidans od vitamina E zbog čega ima ključnu ulogu u lečenju nekih bolesti koje su posledica oksidativnog stresa, kao što su arteroskleroza, dijabetes, reumatoidni artritis i dr. I pored navedenih bioloških efekata ekstrakata i jedinjenja *L. betulinus* lista aktivnosti još uvek nije kompletirana. Takođe treba imati u vidu i potencijal ostalih vrsta roda koje do sada nisu proučavane.

1.1.5. Vrste roda Ganoderma P. Karst.

Finski mikolog Peter Adolf Karsten je 1881. godine prvi opisao rod *Ganoderma* koji je dobio ime na osnovu morfoloških karakteristika plodonosnog tela (*ganos* - svetlosti *derma*- koža) (Slika 5). Ovaj rod obuhvata kosmopolitske vrste, među kojima se neke intenzivno proučavaju zbog lekovitih svojstava kao i uloge u raznim biotehnološkim procesima. *G. lucidum* (Reiši, Ling Zi, Manentake) smatra se simbolom dobrog zdravlja, sreće i dugovečnosti u Kini, Japanu i Koreji gde se već vekovima koristi u tradicionalnoj medicini. Naučna istraživanja i brojne kliničke studije su potvrdili njenu lekovitost. Dokazano je da ekstrakti *G. lucidum* imaju imunostimulirajući, antitumorski, antihiperglikemijski i antihiperholesterolni efekat kao i da regulišu krvni pritisak, sprečavaju stvaranje krvnih ugrušaka i deluju kao kardiotonici. Yoon i dr. (1994) i Wasser i Weis (1999b) su pokazali da se ekstrakti plodonosnih tela *G. lucidum* mogu takođe koristiti kao prirodni antibiotici jer poseduju antibakterijski i antivirusni potencijal protiv vrsta rodova *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Bacillus* koji je baziran na povećanoj produkciji interferona. U novije vreme, česti objekti istraživanja su i *G. applanatum* i *G. tsugae* koje se preko 2000 godina intenzivno koriste u narodnoj medicini Dalekog Istoka. Pokazano je da ekstrakti ovih vrsta imaju antitumorski, antimikrobni, antioksidativni, antialergijski, antihipertenzivni i antihiperglikemijski potencijal kao i potencijal u lečenju bronhitisa i hepatitisa (Lee i dr., 2007; Ma i dr., 2011).

Slika 5. Izgled plodonosnog tela: **A.** *Ganoderma lucidum*, **B.** *G. applanatum*

Lekovita svojstva vrsta roda *Ganoderma* potiču od širokog spektra jedinjenja kao što su polisaharidi, triterpenoidi, alkaloidi, steroidi, aminokiseline i proteini, vitamini i minerali (Wasser i Weis, 1999a,b). Mizuno (1995) i Lee i dr. (2006) su saopštili da su polisaharidi *G. lucidum* efikasni u lečenju nesanice, hroničnog hepatitisa, bolesti

bubrega i krvnih sudova, hroničnog bronhitisa i bronhijalne astme, čira na želucu i dvanaestopalačnom crevu, dok su Chang i But (1986) i Yan (1987) zabeležili pozitivan efekat kod 92% pacijenata oboleleih od hepatitisa B nakon tretmana sa vulingdanom, aktivnom supstancom iz plodonosnih tela. Steroidi izolovani iz plodonosnog tela *G. applanatum* imaju visok stepen aktivnosti protiv gram-pozitivnih odnosno gram-negativnih bakterija, aplanoksna kiselina je efikasna u inhibiciji razvoja tumora kože miša, a visok sadržaj polisaharida i fenola je odgovoran za značajni antioksidativni kapacitet njenih ekstrakata (Lindquist i dr., 2005; Kozarski i dr., 2012).

Koliko su značajna navedena svojstva ukazuje činjenica da se *G. lucidum* sve više komercijalno gaji a u nekim zemljama i u industrijskim razmerama

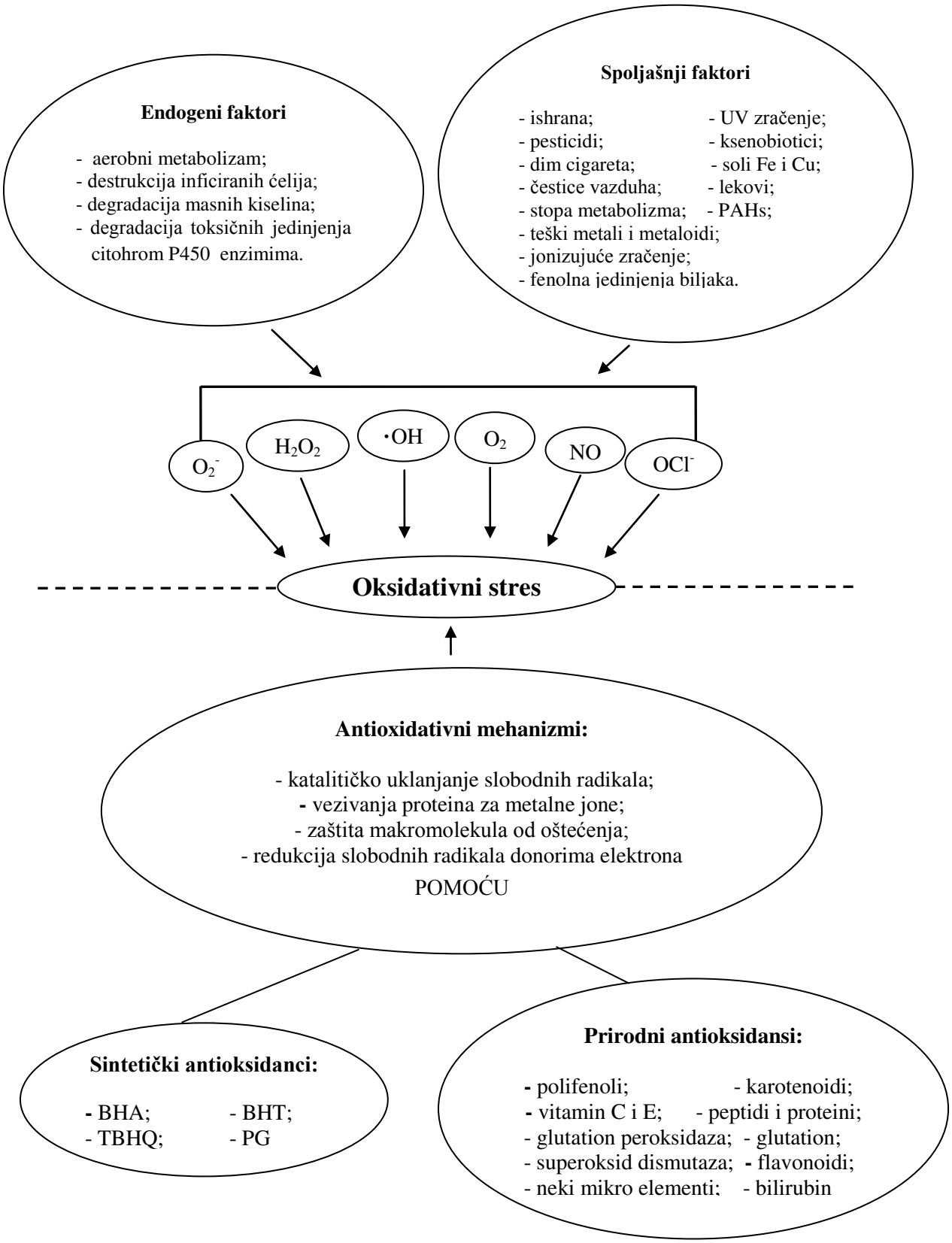
1.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata lekovitih vrsta gljiva

1.2.1. Oksidativni stres i izazivači

Kiseonik je esencijalni element za aerobne organizme ali može biti i prouzrokovač hroničnog toksičnog stresa u ćeliji. Ćelijski energetski metabolizam i korišćenje kiseonika su povezani sa stvaranjem slobodnih radikala i njihovih neradikalskih intermedijera koji mogu voditi poreklo od različitih elemenata od kojih su za biološke sisteme najvažniji oni poreklom od kiseonika i azota. Superoksid anjon radikal (O_2^-), vodonik peroksid (H_2O_2), hidroksil radikal (•OH) i atomi kiseonika su reaktivne vrste koje se neprekidno produkuju *in vivo* i neophodni su za ćelijske aktivnosti kao što su produkcija energije, fagocitoza, regulacija ćelijskog rasta i sinteza biološki važnih jedinjenja (Yen i Wu, 1999; Xu i dr., 2009). Međutim, u slučaju nedovoljnog kapaciteta ćelijskog antioksidativnog odbrambenog sistema slobodni, visoko reaktivni, radikali izazivaju oksidativni stres (Turkoglu i dr., 2007; Limón-Pacheco i Gonsebatt, 2009). Brojna istraživanja su pokazala da slobodni radikali pri višim koncentracijama mogu da izvrše atak na bilo koji biološki molekul, nukleinske i aminokiseline, proteine, ugljene hidrate, lipide i fosfolipide, menjajući njihovu funkciju u ćeliji, tkivu i organu što može voditi produkciji organskih radikala, peroksidaciji ćelijske membrane i pojavi različitih poremećaja i ćelijske smrti (Limón-Pacheco i Gonsebatt, 2009).

Interesovanje za slobodne radikale počelo je nakon otkrića da su oni medijatori brojnih bolesti kao što su dijabetes, autoimune, neurodegenerativne, koronarne, maligne, plućne, inflamatorne i mnoge druge bolesti (Finkel i Holbrook, 2000). Izazivači oksidativnog stresa mogu se podeliti u dve grupe, oksidansi iz spoljašnje sredine i endogeni ćelijski oksidansi (Slika 6). Sredinski faktori koji mogu prouzrokovati oksidativni stres su svrstani u nekoliko grupa:

1. **ishrana i stopa metabolizma** - brojne studije su pokazale da ishrana siromašna proteinima i kalorijama značajno produžava životni vek i smanjuje nivo somatskih mutacija i stopu pojave kancera zbog redukcije oksidativnih oštećenja, efikasnije reparacije DNK i poboljšanja imunog odgovora (Ames i dr., 1993). Metabolizam toksičnih jedinjenja troši ćelijske antioksidanse i često rezultuje stvaranjem reaktivnih metabolita veće toksičnosti,
2. **UV i jonizujuće zračenje** indukuju formiranje O_2^-, H_2O_2, •OH, lipid peroksida i lipid peroksid radikala koji reaguju sa ćelijskim jedinjenjima i vode produkciji organskih radikala i pojavi destruktivnih poremećaja kao što su kancer, dijabetes, arteroskleroza, katarakta i neurodegenerativni poremećaji, Alchajmerova i Parkinsonova bolest (Marrot i dr., 2008),
3. **visoke koncentracije teških metala** (hrom, mangan, germanijum, barijum, olovo) **i metaloida** (arsenik) - akumuliraju se u specifičnim tkivima i organima izazivajući oksidativna oštećenja (Buchman i dr., 2001),
4. **pesticidi** - izazivaju poremećaje više organa,
5. **toksični ksenobiotici** - izazivaju produkciju mutagenih metabolita i reaktivnih jedinjenja kiseonika,
6. **policiklični aromatični ugljovodonici** - prouzrokuju oksidaciju DNK, proteina i fosfolipida ćelijske membrane, mutacije, povećanje nivoa lipid peroksidacije u krvi, karcinogenezu, teratogenezu i disfunkciju imunog sistema (Kasai i dr., 2008),
7. **aerozagađivači dijametra manjeg od 2,5 μm, oksidi azota, različiti lekovi i biljna fenolna jedinjenja** - prouzrokuju lipid peroksidaciju, oštećenja ćelijskih makromolekula, smanjenje nivoa vitamina E i C i povećanje smrtnosti od plućnih i kardiovaskularnih bolesti (Ames i dr., 1993; Nel, 2005).



Slika 6. Izazivači oksidativnog stresa i antioksidativni mehanizmi (šema)

Prema Ames i dr. (1993) endogeni ćelijski oksidansi mogu nastati na jedan od sledećih načina:

1. **kao posledica normalnog aerobnog metabolizma**,
2. **dekstrukcijom bakterija, virusa ili parazita koji su inficirali ćelije** pri čemu nastaju O_2^-, H_2O_2 i OCl^-,
3. **kao rezultat degradacije masnih kiselina peroksizomima** - stvara se H_2O_2 koji se dalje degraduje u prisustvu katalaza,
4. **degradacijom stranih toksičnih jedinjenja** - aktivacijom citohrom P450 enzima.

1.2.2. Antioksidativni mehanizmi

Kao odgovor na stalno prisustvo izazivača oksidativnog stresa različiti antioksidativni sistemi i mehanizmi su se razvili ne samo kod različitih organizama već i u različitim tkivima i organima (Limón-Pacheco i Gonsebatt, 2009). Razlike u stopi metaboličke aktivnosti i korišćenja kiseonika u različitim organelama, tkivima i organima prouzrokuju značajne razlike u njihovim antioksidativnim sistemima, kapacitetu i osetljivosti na toksična jedinjenja iz spoljašnje sredine. Limón-Pacheco i Gonsebatt (2009) su pokazali niži nivo glutationa u mozgu nego u jetri, bubrezima i mišićima kao i aktivnosti organ-specifičnih antioksidativnih enzima. Zbog akumuliranja slobodnih radikala u ćelijama sa starenjem organizma, postoje značajne razlike u ekspresiji antioksidativnih sistema kod adulta i embriona (Harman, 2001).

Prema Sarmadi i Ismail (2010) odbrambeni mehanizmi protiv oksidativnih oštećenja indukovanih slobodnim radikalima uključuju nekoliko faza (Slika 6):

1. katalitičko uklanjanje slobodnih radikala u prisustvu katalaza, glutation peroksidaza i superoksid dizmutaza,
2. vezivanje proteina za metalne jone (bakar i gvožđe),
3. zaštita od oštećenja makromolekula koje izaziva oksidativni stres,
4. redukcija slobodnih radikala pomoću donora elektrona (glutation, vitamin E (α tokoferol), vitamin C (askorbinska kiselina), β-karoten, bilirubin i dr.).

Neki mikroelementi, kao što su selen, bakar, cink i magnezijum, su važni u navedenim odbrambenim mehanizmima jer imaju ulogu kofaktora antioksidativnih

enzima. Peptidi koji nastaju hidrolizom proteina iz hrane takođe mogu imati važnu ulogu u neutralizaciji radikala i inhibiciji peroksidacije lipida što zavisi od njihove strukture i aminokiselinskog sastava (Sarmadi i Ismail, 2010). Ekspresija antioksidativnog sistema može biti povezana sa drugim faktorima koji nisu njegov deo, na primera sa faktorima koji sprečavaju apoptozu (Jang i Surh, 2003). Međutim, pri nekim uslovima, odbrambeni, antioksidativni, mehanizmi nisu dovoljno aktivni da zaštite organizam pa je neophodno dodavanje antioksidanasa hrani (Sarmadi i Ismail, 2010).

1.2.3. Antioksidansi

Antioksidans je agens koji sprečava nastanak ili uklanja nastala oštećenja izazvana slobodnim radikalima (Pryor, 1991). Neki antioksidansi se sintetišu u organizmu (endogeni), a drugi unose hranom ili upotrebom dijetetskih dodataka (egzogeni). Prvoj grupi pripadaju enzimi kao što su superoksid-dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza, neenzimski molekuli (glutation, histidin-peptidi, transferin i feritin, dihidrolipoinska kiselina, redukovani oblik koenzima Q, melatonin i dr.), kao i neki hemijski elementi (cink i selen) (Slika 6). Međutim, i pored postojanja ćelijskog antioksidativnog odbrambenog sistema do određenih oštećenja ipak dolazi. Antioksidansi se mogu podeliti na prirodne i sintetičke (Slika 6). Najčešće korišćeni sintetički antioksidansi su butil-hidroksitoluen (BHT), butil-hidroksianizol (BHA), tert-butil-hidroksihinon (TBHQ) i propil-galat (PG). Pored toga što usporavaju peroksidaciju lipida oni mogu biti i toksični pa je današnji trend njihova zamena prirodnim antioksidansima (Nobuyuki i dr., 1985). Za razliku od sintetičkih, prirodni egzogeni antioksidansi nemaju neželjene efekte, široko su dostupni i što je najvažnije potpuno su bezbedni. Najpoznatiji i najznačajniji među njima su vitamini C i E, karetenoidi i polifenoli uključujući i flavonoide (Fang i Zhong, 2002). Gljive, zajedno sa biljkama, su značajni izvori prirodnih antioksidanasa. Njihova upotreba u prehrambenoj industriji, umesto sintetičkih konzervanasa i drugih prehrambenih aditiva, značajno je porasla proteklih decenija (Al-Bakri i Afifi, 2007).

Redovno korišćenje namirnica sa visokim antioksidativnim potencijalom predstavlja važan i efikasan vid preventive ne samo od nastanka različitih bolesti već i odlaganja

procesa starenja. Određivanjem antioksidativnog statusa u biološkim sistemima prati se uticaj ishrane ili dodataka na oksidativni stres kao i njihov doprinos prevenciji bolesti čiji su uzročnici oksidativna oštećenja (Sánchez-Moreno, 2002).

1.3. Antifungalna aktivnost ekstrakata lekovitih vrsta gljiva

Stare civilizacije Dalekog Istoka su koristile tinkture dobijene iz plodonosnih tela lekovitih vrsta gljiva najčešće za tretman rana i sprečavanje infekcija. Proučavanja ekstrakata određenih vrsta gljiva su pokazala njihov značajni antimikrobni potencijal. U zavisnosti od koncentracije mogu inhibirati rast mikroorganizma (bakteristatički odnosno fungistatički efekat) ili ga ubiti (baktericidni odnosno fungicidni efekat). Razne vrste bakterija i gljiva mogu prouzrokovati brojne bolesti biljaka, životinja i čoveka, smanjenje ili čak potpuni gubitak prinosa kao i kvarenje i propadanje hrane (Garcia i Blanco, 2000; Gould, 2004; Brown i dr., 2012). Zbog toga kao i zbog učestale pojave rezistentnosti na komercijalne antibiotike i antimikotike kao posledice dugotrajnog i nekontrolisanog korišćenja, mikroorganizmi predstavljaju globalni problem za zdravlje i ishranu. Sa druge strane, primena komercijalnih antibiotika i antimikotika ima za posledicu i čitav niz neželjenih efekata, visoku toksičnost, akumulaciju u lancima ishrane zbog dugog perioda degradacije i neselektivno delovanje. Yamaç i Bilgili (2006) i Turkoglu i dr. (2007) su istakli da brojne vrste makromiceta sintetišu različita jedinjenja sa antibakterijskim, antifungalnim i antivirusnim efektom, koja mogu biti izolovana i primenjena u kliničkoj praksi. Glavni nosioci navedenih aktivnosti su polisaharidi, triterpenoidi, lektini, proteini, bakterolitički enzimi i etarska ulja čiji kapacitet zavisi od metoda ekstrakcije i prečišćavanja (Gao i dr., 2003). Za razliku od sintetičkih antimikrobnih agenasa čiji su mehanizmi delovanja dobro poznati i baziraju se na inhibiciji sinteze ćelijskog zida, proteina i nukleinskih kiselina i narušavanju funkcije citoplazmatične membrane, mehanizmi delovanja prirodnih antimikrobnih jedinjenja još uvek nisu poznati i intenzivno se proučavaju. Cushnie i Lamb (2005) i Karaca (2011) su pokazali da je antifungalna aktivnost lekovitih vrsta gljiva u direktnoj korelaciji sa njihovim hemijskim sastavom, naročito sa sadržajem fenola. Flavonoidi sprečavaju sintezu DNK i RNK inhibirajući enzime uključene u te procese, narušavaju

sktrukturu lipidnih slojeva u ćelijskoj membrani povećavajući njenu permeabilnost, ometaju energetski metabolizam ćelije, germinaciju spora biljnih i humanih patogena.

1.4. Citotoksična aktivnost ekstrakata lekovitih vrsta gljiva

Dinamičan industrijski i ekonomski razvoj ima niz prednosti ali i negativnih posledica na spoljašnju sredinu i društvo. Danas, bolesti sa najvećom stopom smrtnosti u humanoj populaciji su različiti tipovi kancera (Doll i Peto, 1981). Razvoj onkologije i kliničko lečenje tumora otpočeli su početkom XX veka, ali je tek razvojem molekularne biologije omogućeno bolje razumevanje ovih bolesti. Brojna istraživanja su pokazala da mnogi faktori uslovljavaju pojavu kancera. Poslednjih decenija sve češće se u naučnoj literaturi sreću dokazi o povezanosti načina ishrane i pojave kancerogenih oboljenja. Doll i Peto (1981) su saopštili da je u 35% slučajeva uzrok pojave kancera bila nepravilna ishrana.

Konvencionalne terapije daju zadovoljavajuće rezultate samo pri tretmanu ranih faza razvoja tumora ili su apsolutno neefikasne (Chen i dr., 2006). Hemoterapija se odlikuje mnogobrojnim štetnim efektima kao što su odsustvo selektivne toksičnosti tj. isti efekat na maligne i zdrave ćelije, pojava mutacija koje se mogu nasleđivati i mnogo agresivnije metastaze pri ponovnom javljanju kancera, zbog čega prirodni preparati danas zauzimaju sve značajnije mesto u tretmanu obolelih.

Rezultati brojnih istraživanja započetih još 1966. godine u Japanu pokazuju značajnu ulogu ekstrakata gljiva u prevenciji kancera kao i njihov snažan citostatički efekat i sugerišu da redovno konzumiranje određenih lekovitih vrsta gljiva, tokom dužeg vremenskog perioda, ima pozitivan efekat na prevenciju pojave kancera, usporavanje razvoja tumora i pojavu metastaza. Thompson (1995), Cao i Lin (2006) i Chen (2006) su istakli da se ove aktivnosti mogu pre svega pripisati:

1. terpenoidima koji zaustavljaju proliferaciju malignih ćelija prekidanjem ćelijskog ciklusa i apoptozom i
2. polisaharidima koji regulišu ekspresiju gena kancera i poboljšavaju imuni sistem stimulišući aktivaciju prirodnih ćelija ubica i proliferaciju limfocita a time i povećanu produkciju citokina koji je odgovoran za održavanje homeostaze organizma. Lentinan iz plodonosnih tela *Lentinus edodes*, kalvacin iz *Calvatia*

gigantea, proflamin iz *F. velutipes*, pleuran iz vrsta roda *Pleurotus*, šizofilan iz *Shizophillum commune* i krestin iz *T. versicolor* su samo neki od izolovanih polisaharida za koje je naučno dokazano da poseduju citotoksični efekat (Wasser i Weis, 1999a, b).

1.5. Selen

Selen (Se) je esencijalni mikroelement koji je u malim količinama neophodan za normalno funkcionisanje ćelija, dok je u visokim koncentracijama toksičan. Još je 1957. godine Nemački lekar Klaus identifikovao Se kao komponentu organske supstance koju je nazvao faktor 3 i pokazao njen pozitivan efekat u sprečavanju nekroze jetre kod pacova izazvane ishranom bez vitamina E (Rayman, 2000). Kao konstituent glutation-peroksidaze (GPx) i 30-tak drugih selenoproteina, Se ima imunostimulatornu funkciju, ulogu u antioksidativnom sistemu i regulaciji nivoa hormona štitne žlezde (Rotruck i dr., 1973). Neophodan je za nesmetano funkcionisanje neutrofila, makrofaga i prirodnih ćelija ubica. Istraživanja su pokazala da podizanje nivoa Se, naročito kod osoba sa njegovim deficitom, vodi ekspanziji T-limfocita i prirodnih ćelija ubica. Shodno tome, mnogobrojna klinička ispitivanja su potvrdila važnu ulogu Se u lečenju različitih bolesti uključujući kardiovaskularne, maligne, dijabetes, sterilitet i dr. Deficit Se, koji nastaje nakon njegovog dugotrajnog odsustva u ishrani, često je povezan sa povećanom učestalošću kardiovaskularnih bolesti (Kešanske i Kašin Bekove) i drugih oboljenja povazanih sa oksidativnim stresom (Rayman, 2000; Daniels, 2004).

Glutation peroksidaza se nalazi u citoplazmi i mitohondrijama ćelija gde štiti membrane od oksidativnih oštećenja i predstavlja depo Se za sintezu drugih selenoproteina. Poznate su 4 glutation peroksidaze: ćelijska (GPx1), gastrointestinalna (GPx2), plazma (GPx3) i fosfolipo-hidroksiperoksidna (PLGPx). Fosfolipo-hidroksiperoksidna GPx inhibira peroksidaciju lipida i katalizuje esterifikaciju masnih kiselina do funkcionalnih fosfolipidnih struktura ćelijskih membrana (Arthur, 2000). Međutim, pored navedenih pozitivnih efekata, glutation peroksidaze imaju i ulogu u sprečavanju oksidativnog oštećenja RNK virusa, koje može voditi spontanim mutacijama sa povećanjem virulencije, što je pokazano kod koksaki virusa izolovanog iz obolelih od Kešanske bolesti (Beck i dr., 1995). Takođe, neki virusi mogu da uzimaju

Se od domaćina i ugrađuju ga u sopstvene proteine i enzimske sisteme čime umanjuju odbranu organizma. Deficit Se kod domaćina povećava stopu apoptoze čime se olakšava dalja invazija virusa (Yu i dr., 1999).

Važni selenoenzimi su tioredoksin reduktaza i jodotironin dejodinaza koja postoji u tri forme. Prvi od njih je neophodan za produkciju redukovanog tioredoksina koji je uključen u brojne redoks regulacije i supstrat je za ribonukleotid reduktaze pa tako učestvuje u sintezi DNK (Flohé i dr., 2000), dok drugi reguliše sintezu hormona štitne žlezde trijodtironina (T3) i njegovog neaktivnog oblika tiroksina (T4) čime utiče na metabolizam, normalan razvoj i rast (Voet i Voet, 2004).

Od ostalih selenoproteina treba spomenuti:

1. selenofosfat-sintetaze (SPS1 i SPS2) koje učestvuju u formiranju prekursora selenocisteina i njihovoj inkorporaciji u druge selenoproteine,
2. selenoprotein P, polipeptid sa 10 selenocisteinskih ostataka koji je prisutan u tri izoforme i ima ulogu u vezivanju Se u plazmi, a zbog prirode kovalentne veze Se u polipeptidnom lancu verovatno ima i antioksidativnu aktivnost (Burk i Hill, 2005) i
3. selenoprotein W koji je odgovoran za antioksidativnu aktivnost u mišićima (Brown i Arthur, 2001).

1.5.1. Selen u biosferi

Selen, metaloid sličan sumporu, otkrio je 1817. godine švedski naučnik Jens Jakob Bercilijus i nazvao ga po boginji Seleni koja u grčkoj mitologiji simbolizuje Mesec. Hemijski pripada grupi halogenih elemenata VIa grupe IV periode. U prirodi se nalazi u relativno maloj količini, svega 0.05 ppm, kao primesa raznih sulfidnih ruda uključujući pirit, halkopirit, sfalerit i druge, u metaloselenidima a ređe u neorganskim jedinjenjima kao što su selenid, selenit i selenat (Wiberg i dr., 2001). Rasprostranjenost Se u zemljinoj kori zavisi od geološkog sastava terena, najmanje ga ima u magmatskim i metamorfnim stenama, nešto više u sedimentima, a najviše u glinenim škriljcima. Seleniferne oblasti Australije i Irske sadrže više od 0.5 mg/kg Se što su vrlo toksične koncentracije, dok je u regijama sa vulkanskim i granitnim stenama (Brazil, Indija, Irska, Kina, SAD) zabeležen njegov deficit, < 0.1 mg/g (Dhillon i Dhillon, 2003).

Nejednaka distribucija Se u pojedinim oblastima predstavlja takozvanu geohemijsku bolest.

Selen se javlja u tri alotropske modifikacije, elementarna i amorfna koje su crvene boje i kristalna koja je sivoplava. Aerozagađenja, naročito povećanje koncentracije oksida sumpora i nastanak ”kiselih kiša”, značajno smanjuju koncentraciju Se u zemljištu koje je prva karika u lancu ishrane (Gerhardsson i dr., 1994). Zagađenje mora teškim metalima dovodi do opadanja sadržaja Se u mesu ribe koja predstavlja njegov bogat izvor. Međutim, problem bioakumulacije Se nastaje intenzivim korišćenjem fosilnih goriva i navodnavanjem u selenifernim regijama (Lemly, 1997).

1.5.2. Metabolizam selena

Biološka iskoristljivost Se zavisi od njegove forme i koncentracije prisutne u supstratu kao i karakteristika supstrata (sastav, tip, temperatura, pH, salinitet i koncentracija kiseonika) (Hartikainen, 2005; Poluboyarinova i dr., 2009). U prirodi se nalazi u 5 formi (Lenz i Lenz, 2009):

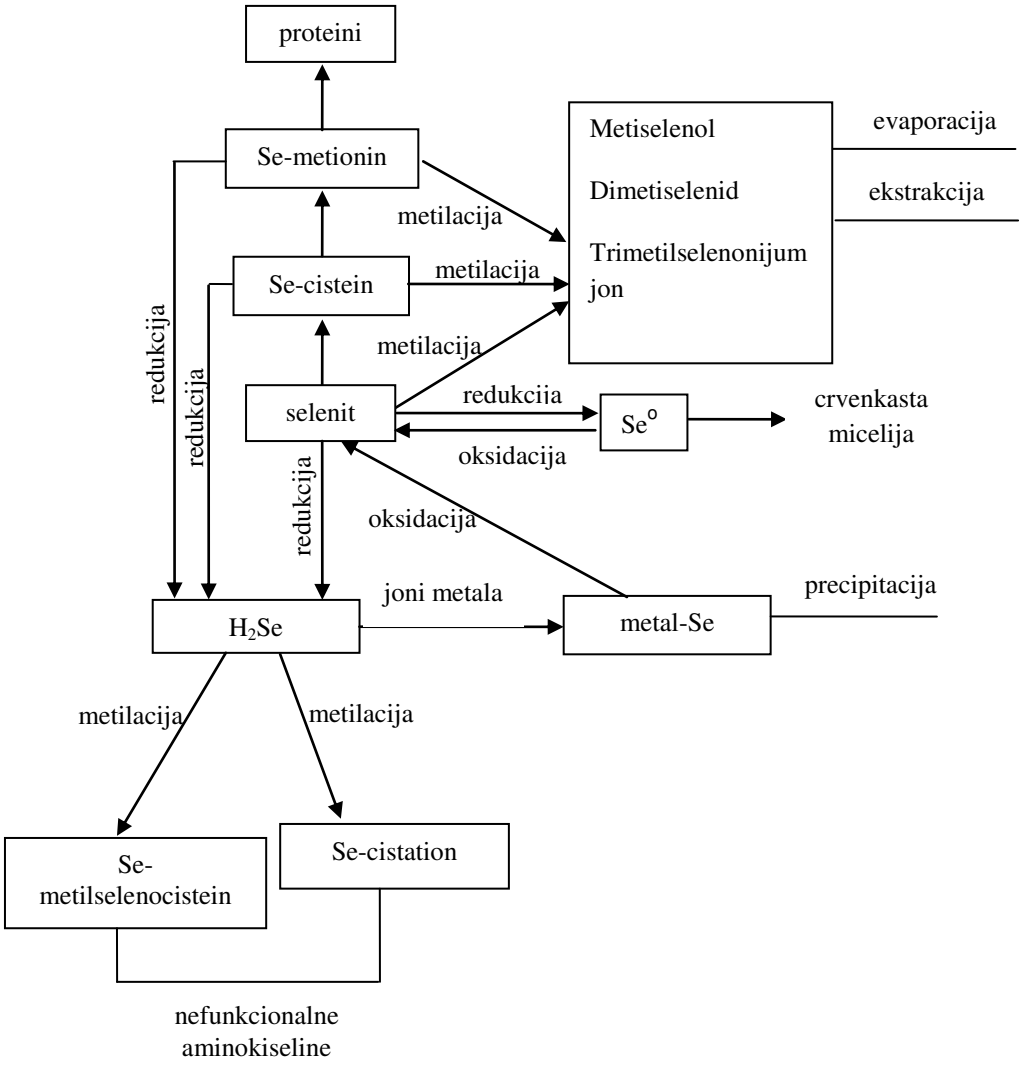
1. elementarni, nerastvorljivi, teško iskoristljiv (Se^{o}),
2. isparljiv selenid (H_2Se) i metal selenidi koji dospevaju u atmosferu putem bioloških aktivnosti,
3. teško isparljivi seleniti (SeO_3^{2-}),
4. selenati (SeO_4^{2-}),
5. organska jedinjenja selena.

Letavayova i dr. (2008) su pokazali da su selenati mnogo toksičniji od organskih formi selena zbog stvaranja slobodnih radikala. Poznato je da se apsorbovani Se ugrađuje u selenocistein, selenometionin, Se-metilselenocistein i nekoliko neidentifikovanih seleno jedinjenja (Falandysz, 2008). Međutim, mehanizmi njegovog usvajanja, transporta, akumulacije i metabolizma zavise od vrste gljive (Melgar i dr., 2009).

Prema Ip (1998) i Lenz i Lenz (2009), rastvorljivi seleniti i selenati mogu ući u dva metabolička puta (Slika 7):

1. direktna ili indirektna metilacija do metilselenola, dimetilselenida i trimetilselenonijum jona koji se izlučuju i

2. redukcija nerastvorljivog Se^o koji se može ili reoksidovati do selenita, ređe selenata, ili redukovati do H_2Se koji je prekursor u sintezi selenoproteina.



Slika 7. Metabolički putevi selena (šema)

1.5.3. Selen i ishrana

Saznanja o Se do skora kontradiktorna (da li je koristan ili toksičan) potiču iz veterinarske medicine. Kliničku sliku trovanja Se kod životinja opisao je još pre 700 godina Marko Polo tokom putovanja kroz Kinu. Endemska selenoza na zapadu Amerike, zatim takozvano slepo posrtanje i alkalna bolest goveda poznati su još iz XIX

veka. Otkrivanje esencijalnih uloga Se, proteklih godina, otvara poglavlje o određivanju dozvoljenih granica unosa (Goldhaber, 2003).

Toksičnost Se ogleda se kroz poremećaj funkcije imunog sistema i tireoideje kao i sinteze hormona rasta zbog oksidacije glutationa i inhibicije GPx što dovodi do nastanka slobodnih radikala i to u značajnim koncentracijama (Orskov i Flyvbjerg, 2000). Toksični efekti zavise od forme (organski ili neorganski) i od količine unetog Se. Elementarni Se^{o} i većina metalnih selenida imaju relativno nisku toksičnost zbog njihove niske biološke iskoristljivosti za razliku od selenita i selenata koji su izrazito toksični. Međutim, organski oblici Se imaju visoku biološku iskoristljivost i toksični su u velikim dozama. Tako unos Se u količini preko 800 μg dnevno daje kliničku sliku trovanja, selenoza u obliku opadanja kose, slabljenja noktiju, edema pluća, nadražaja gastrointestinalnog trakta, mentalne konfuzije i razvoja malignih oboljenja (Whanger i dr., 1996).

Nedostatak Se, kao i u slučaju prekomernih doza, prvo je opisan kod životinja gde izaziva usporen rast, slabost srčanog mišića i muskulature, neplodnost i dr. (Goldhaber, 2003). Proučavanjem povezanosti deficita Se sa oboljenjima kod ljudi počinje krajem sedamdesetih godina prošlog veka, kada je opisana Kešanska bolest. Nassir i dr. (1997) i Flohé i dr. (2000) su povezali deficit Se sa razvojem brojnih bolesti kod čoveka kao što su različiti tipovi kancera, distrofija mišića, kardiovaskularne bolesti uključujući i endemsku kardiomiopatiju, hiperholesterolemiju i muški sterilitet. Generalno gledano, nedovoljan unos Se rezultira smanjenom aktivnošću selenoenzima (Rayman, 2000).

Međutim, bez obzira na poznavanje posledica prekomernog i nedovoljnog unosa Se u organizam još uvek ne postoji opšte prihvaćena dnevna doza. Tako, Akademija nauka SAD iznosi da su optimalne doze Se za odrasle osobe 50 - 200 μg dnevno (Levander i Mooris, 1984), po regulativi ekspertske grupe Svetske zdravstvene organizacija iz 1996. godine dnevna potreba za ovim elementom kod muškaraca je 40 μg a kod žena 30 μg, dok su po Mihailović (1996) bezbedne količine Se do 775 μg dnevno.

Selen je u ishrani prisutan u organskoj i neorganskoj formi kao selenometionin, uglavnom u hrani biljnog porekla, i selenocistein, u hrani životinjskog porekla, dok seleniti i selenati nisu prisutni u hrani ali se često koriste kao dodaci. Najbolji izvori Se u ishrani su selenom obogaćeni kvasac, pšenica i druge namirnice biljnog porekla pošto je njegova iskoristljivost veća iz navedenih izvora nego iz hrane životinjskog porekla

(Fairweather-Tait, 1997) a posebno iz vode (Valentine, 1997). Prema mogućnosti usvajanja iz hrane, Se spada u grupu umereno dobrih elemenata jer kako ističe Evropski komitet za hranu oko 60% prisutnog Se je moguće apsorbovati (Fairweather-Tait, 1999).

1.5.4. Selen i gljive

Poznato je da veliki broj jestivih i lekovitih vrsta gljiva ima sposobnost usvajanja i akumulacije Se u formi jedinjenja malih molekulskigh masa (6 kDa) kao što su selenocistein i selenometionin. Sadržaj Se kod gljiva varira između 0.6 i 19.5 mg/kg suve mase i zavisi od vrste, mesta i godine branja. Među proučavanim vrstama najveći sadržaj Se je zabeležen kod *Boletus edulis* (oko 17.0 mg/kg suve mase), dok je značajna količina ovog mikroelementa nađena i kod *Macrolepiota* sp. (5.0 mg/kg suve mase), samoniklih vrsta roda *Agaricus* (2.7 mg/kg suve mase), vrsta iz klase Gasteromycetes (1.9 mg/kg suve mase), *Lactarius torminosus* (1.9 mg/kg suve mase) i *Marasmius oreades* (1.6 mg/kg suve mase) (Šlejkovec i dr., 2000). Zbog značajnog kapaciteta gljiva da usvajaju Se, trend je obogaćivanje komercijalno gajenih vrsta ovim mikroelementom i dobijanje odličnih dijetetskih izvora selena. Sun i dr. (1993) su pokazali da je redovnim konzumiranjem selenom obogaćenih plodonosnih tela *P. ostreatus* došlo do značajnog povećanja nivoa ovog mikroelementa u krvi i jetri kao i aktivnosti GPx u eritrocitima, a Spolar i dr. (1999) su zabeležili usporavanje razvoja hemijski indukovanih tumora redovnom upotrebom selenom obogaćenih bazidiokarpa *A. bisporus*.

Međutim, na bazi navedenih sposobnost, da apsorbuju i akumuliraju Se, gljive se mogu koristiti i kao bioindikatori zagađenja zemljišta ovim mikroelementom (Quinche, 1993).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Dosadašnja znanja o sposobnosti gljiva da usvajaju i akumuliraju mikroelemente kao i o ulozi Se u funkcionisanju organizma poslužili su kao baza za postavljanje ciljeva ovog istraživanja:

1. praćenje prinosa biomase micelije proučavanih vrsta makromiceta i efikasnosti apsorbcije Se pri njegovim različitim koncentracijama tokom tečne kultivacije u selenitom obogaćenom medijumu;
2. praćenje efekata visokih koncentracija Se na produkciju micelije, morfologiju i ultrastrukturu hifa, kao i na kapacitet njegove apsorpcije i akumulacije kod *Pleurotus ostreatus*;
3. analiza uticaja Se, prisutnog u ekstraktima micelija proučavanih vrsta, na antioksidativni potencijal i sadržaj ukupnih fenola i flavonoida;
4. analiza antifungalnog kapaciteta ekstrakata Se-obogaćene micelije proučavanih vrsta;
5. testiranje citotoksične aktivnosti ekstrakata Se-obogaćene micelije proučavanih vrsta.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Proučavane vrste i priprema inokuluma

Kulture proučavanih jestivih i lekovitih vrsta gljiva su izolovane iz plodonosnih tela sakupljenih u Srbiji ili su dobijene iz Instituta za Evoluciju Univerziteta u Haifi, Izrael (HAI) i čuvaju se na malt agar (MA) medijumu u kolekciji kultura Instituta za botaniku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (BEOFB) (Tabela 1).

Tabela 1. Proučavane vrste jestivih i lekovitih gljiva

Naučno ime vrste	**Kod soja**	**Poreklo soja**
Flammulina velutipes (Curt.: Fr.) Sing.	HAI 966	Izrael, nacionalni park Nahal Nesher na planini Karmel, sa *Quercus calliprinos* Webb., 1995
Ganoderma applanatum (Pers.:Wallr.) Pat.	BEOFB 411	Srbija, Beograd, Bojčinska šuma, 2008
Ganoderma lucidum (Leyss.:Fr.) Karst.	BEOFB 431	Srbija, Beograd, Bojčinska šuma, sa *Quercus* sp., 2008
Lenzites betulinus (L.:Fr.) Fr.	BEOFB 500	Rusija, Permski kraj, sa *Populus tremela*, 2009
Pleurotus eryngii (DC.:Fr.) Quél.var. *eryngii*	HAI 507	Kultivisani soj, Hawaii, Nextlab
Pleurotus ostreatus (Jacq.: Fr.) Kumm.	HAI 592	KW, A. S. Buchalo.
Pleurotus pulmonarius (Fr.) Quél.	HAI 573	KW, A. S. Buchalo (111), - VKM (F-2006). Coll. Rusija, Soči.
Trametes hirsuta (Wulf.:Fr.) Pil.	BEOFB 30	Srbija, Novi Beograd, sa *Prunus* sp., 2009

Priprema inokuluma se sastojala iz nekoliko faza: (1) inokulacija 100.0 mL sintetičkog medijuma (glukoza, 10.0 g/L; NH_4NO_3, 2.0 g/L; K_2HPO_4, 1.0 g/L; NaH_2PO_4 x H_2O, 0.4 g/L; $MgSO_4$ x $7H_2O$, 0.5 g/L; ekstrakt kvasca, 2.0 g/L, pH 6.5) sa 25 diskova micelije (Ø 0.5 cm) 7 dana stare kulture sa MA u 250-mL erlenmajerima; (2) inkubacija na sobnoj temperaturi (22 ± 2ºC) na rotor šejkeru (100 obrtaja u minuti) u toku 7 dana; (3) ispiranje dobijene biomase (3 puta) sterilnom destilovanom vodom; (4)

homogenizacija biomase sa 100.0 mL sterilne destilovane vode u laboratorijskom blenderu.

3.2. Određivanje produkcije biomase

5.0 mL homogenizovanog inokuluma je korišćeno za inokulaciju 70.0 mL modifikovanog sintetičkog medijuma (sa glukozom u koncentraciji od 65.0 g/L i peptonom kao izvorom azota u količini od 2.0 g/L) obogaćenog natrijum selenitom (Na_2SeO_3) sa početnim koncentracijama Se od 300.0 μg/L, 700.0 μg/L, 1000.0 μg/L ili 1300.0 μg/L (Stajić i dr., 2006). Medijum bez Se je korišćen kao kontrola. Tečna kultivacija je vršena na sobnoj temperaturi na rotor šejkeru 21 dan izuzev vrsta roda *Pleurotus* čija je inkubacija trajala samo 9 dana. Dobijena biomasa je filtrirana, ispirana 3 puta sa 50.0 mL sterilne destilovane vode na magnetnoj mešalici na temperaturi od 30°C sa ciljem uklanjanja preostalog Se na ćelijskom zidu i sušena na 50°C do konstantne mase. Suva biomasa je merena i predstavljena kao g/L. Po tri ponavljanja za svaku koncentraciju Se i vrstu su bila urađena.

3.3. Merenje koncentracije apsorbovanog selena u miceliji

Suva biomasa micelije (0.1 g) kao i medijum obogaćen Se pre i posle kultivacije proučavanih vrsta (2.0 mL) su se tretirali sa 10.0 mL koncentrovane HNO_3 i 3.0 mL koncentrovane HCl. Dobijeni uzorci su bili razblaženi sa Milli-Q vodom do zapremine od 20.0 mL. Koncentracija apsorbovanog Se određivana je hidridnom tehnikom atomskim apsorpcionim spektrofotometrom (SP 190 Pye Unicam, Engleska). Standardna kriva je kreirana korišćenjem rastvora koji su sadržali Se u koncentracijama od 0.0, 10.0, 25.0, and 50.0 μg/L. Dobijene vrednosti su predstavljene kao μg apsorbovanog Se po g suve biomase ili po L medijuma.

3.4. Određivanje efekta visokih koncentracija selena na morfo-fiziološke i ultrastrukturne karakteristike micelije

Efekat visokih koncentracija Se na morfo-fiziološke i ultrastrukturne karakteristike micelije praćen je kod *P. ostreatus* HAI 592. Testirane koncentracije Se prisutnog u formi Na_2SeO_3 su bile 5.0 mg/L, 10.0 mg/L, 20.0 mg/L, 50.0 mg/L, 100.0 mg/L, 500.0 mg/L, 1000.0 mg/L, 2500.0 mg/L, 5000.0 mg/L i 10000.0 mg/L. Minimalna inhibitorna koncentracija Se (MIC) određena je kultivacijom gljive u mikrotitracionoj ploči, čiji je svaki bunarčić sadržao 90.0 µL Se-obogaćenog modifikovanog medijumu i 10.0 µL homogenizovanog inokuluma, na 25°C u toku 21 dana. Medijum bez Se je korišćen kao kontrola. Po tri ponavljanja je urađeno za svaku koncentraciju Se.

Morfologija i ultrastruktura hifa, produkcija biomase i sposobnost micelije da apsorbuje Se proučavane su kultivacijom *P. ostreatus* u 100-mL erlenmajerima koji su sadržali 20.0 mL modifikovanog sintetičkog medijuma obogaćenog selenom u koncentracijama koje nisu kompletno inhibirale rast, na sobnoj temperaturi, na rotor šejkeru u toku 9 dana. Inokulacija je vršena sa 1.5 mL homogenizovanog inokuluma.

Morfologija hifa je proučavana posmatranjem micelije uronjene u glicerin ili obojene Fuchsine kiselinom svetlosnim mikroskopom (Carl Zeiss Axio Imager 2).

Ultrastrukturne analize su rađene na preparatima micelije koji su pravljeni na sledeći način: micelija je fiksirana u smeši 2,5% glutaraldehida i 0,1 M fosfatnog pufera na 4°C preko noći, postfiksirana u istom puferu koji je sadržao 1,0% osmijum tetroksid u toku jednog sata, dehidrisana i uronjena u Araldite smolu. Ultratanki preseci su pravljeni sa UC6 ultramikrotomom (Leica Microsystem, Germany), rutinski bojeni sa uranil acetatom i olovo citratom i posmatrani pod 80 kV na Philips CM12 transmisionom elektronskom mikroskopu.

Stopa rasta micelije je određena merenjem dnevne promene prečnika kolonije tokom 20 dana kultivacije gljive u Petri kutiji (Ø 90 mm) na Se-obogaćenom agarizovanom modifikovanom sintetičkom medijumu na 25°C.

3.5. Određivanje bioloških aktivnosti ekstrakata testiranih vrsta gljiva

3.5.1. Kultivacija

Tečna kultivacija je vršena u 1000-mL erlenmajerima sa 400.0 mL modifikovanog sintetičkog medijuma obogaćenog selenom, u formi Na_2SeO_3 i inicijalnoj koncentraciji od 1.3 mg/L, koji je bio inokulisan sa 30.0 mL homogenizovanog inokuluma, na sobnoj temperaturi na rotor šejkeru u toku 21 dana. Medijum bez Se je korišćen kao kontrola.

3.5.2. Priprema ekstrakata micelije

Suva Se-obogaćena i neobogaćena micelija (3.0 g) je ekstrahovana mešanjem sa 90.0 mL 96% etanola na 30°C u toku 72 sata. Dobijeni ekstrakti su filtrirani kroz Whatman No. 4 filter papir, koncentrovani pod redukovanim pritiskom u rotor uparivaču (BÜCHIR-114, Switzerland) na 40°C i ponovo rastvoreni u 96% etanolu (za testiranje antioksidativnog potencijala) ili u 5% dimetilsulfoksidu (DMSO) (za analizu antifungalne i citotoksične aktivnosti) do koncentracije od 32.0 mg/mL.

3.5.3. Antioksidativna aktivnost

3.5.3.1. DPPH test

Antioksidativna aktivnost je određivana merenjem stepena izbeljivanja ljubičasto obojenog metanolnog rastvora stabilnog 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil radikala (DPPH•) (Blois, 1958). Smeša od 1800.0 µL 4% metanolnog rastvora DPPH• i 200.0 µL ekstrakta određene koncentracije (serija duplih razblaženja od 32.0 mg/mL do 0.5 mg/mL) je inkubirana 30 minuta u mraku nakon čega je spektrofotometrijski (CECILCE 2501, U.K.) merena njena apsorpcija na 517 nm. Metanol se koristio kao slepa proba. Negativna kontrola je sadržala sve reagense izuzev ekstrakta. Efekat neutralizacije radikala je određivan po formuli:

DPPH• neutrališući efekat (%) = $[(A_0-A_{uzorka})/A_0] \times 100$,

A_0 – apsorbanca negativne kontrole; A_{uzorka} – apsorbanca reakcione smeše. EC_{50} vrednost (mg ekstrakta/mL) predstavlja efikasnu koncentraciju pri kojoj se 50% DPPH

radikala neutrališe i dobija se linearnom regresionom analizom. Komercijalni antioksidans, BHA, je korišćen kao pozitivna kontrola.

3.5.3.2. Određivanje sadržaja fenola

Sadržaj rastvorljivih fenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima Se-obogaćene i neobogaćene micelije određivan je Folin-Ciocalteu reagensom po metodi Singleton i Rossi (1965), korišćenjem galne kiseline kao standarda. 1000.0 µL 10% Folin-Ciocalteu reagensa i 200.0 µL ekstrakta su reagovali u mraku u toku 6 minuta nakon čega je dodato 800.0 µL 7,5% Na_2CO_3. Reakciona smeša je snažno promućkana i inkubirana na rotor šejkeru (100 obrtaja u minuti) u mraku i na sobnoj temperaturi u toku 2 sata. Apsorbanca je merena spektrofotometrijski na 760 nm. Smeša bez ekstrakta je korišćena kao slepa proba. Totalna koncentracija fenolnih jedinjenja je određena kao µg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po mg suvog ekstrakta, korišćenjem jednačine dobijene iz standardnog grafika galne kiseline:

Apsorbanca = 1.966 x sadržaj fenola (µg galne kiseline) + 5.346 (R^2 = 0.991)

3.5.3.3. Određivanje sadržaja flavonoida

Sadržaj flavonoida je određivan korišćenjem metode Park i dr. (1997). 1000.0 µL ekstrakta je razblaženo sa 4300.0 µL smeše koja je sadržala 4100.0 µL 80% etanola, 100.0 µL 10% aluminijum nitrata ($Al(NO_3)3$ x 9 H_2O) i 100.0 µL 1 M vodenog rastvora kalijum acetata (CH_3CO_2K). Reakciona smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi u toku 40 minuta i apsorbanca je merena spektrofotometrijski na 415 nm. Smeša sa etanolom umesto ekstrakta je korišćena kao slepa proba. Količina flavonoida je izražena kao µg ekvivalenta kvercetina (QE) po mg suvog ekstrakta korišćenjem jednačine dobijene iz standardnog grafika kvercetin hidrata:

Apsorbanca = 0.457 x sadržaj flavonoida (µg kvercetin hidrat) – 0.989 (R^2 = 0.957)

3.5.4. Antifungalna aktivnost

Testirane su sledeće vrste mikromicete: *Acremonium strictum* (BEOFB111m), *Aspergillus flavus* (BEOFB221m), *A. fumigatus* (BEOFB232m), *A. niger* (BEOFB252m), *A. terreus* (BEOFB261m), *Candida albicans* (BEOFB811m), *C. krusei*

(BEOFB821m), *C. parapsilosis* (BEOFB831m), *Cladosporium* sp. (BEOFB400m), *Fusarium verticillioides* (BEOFB911m), *Microsporum gypseum* (BEOFB1011m), *Penicillium funiculosum* (BEOFB531m), *Trichoderma viride* (BEOFB612m) i *Trichophyton mentagrophytes* (BEOFB1221m), čije se kulture čuvaju na MA na 4°C u kolekciji kultura Instituta za botaniku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Ove vrste su se kultivisale na Sabouraud dekstroznom agaru (SDA) na temperaturi od 25 ± 2°C u toku 21 dana. Suspenzije spora su pripremane ispiranjem površine agara sa sterilnim 0.9% fiziološkim rastvorom koji je sadržao 0.1% Tween 80 (v/v). Stepen zamućenosti je određivan spektrofotometrijski na 530 nm i broj spora je podešavan na 106 CFU/mL (NCCLS, 1998).

DMSO ekstrakti Se-obogaćene i neobogaćene micelije su sterilisani filtracijom kroz Whatman No. 4 filter papir i 0.2 μm membranski filter. Antifungalni potencijal testiranih ekstrakata je proučavan mikrodilucionom metodom korišćenjem mikrotitracionih ploča sa 96 bunarčića (Sarker i dr., 2007). Serije duplih razblaženja ekstrakata (od 32.0 mg/mL do 0.5 mg/mL) su analizirane. Svaki bunarčić je sadržao Sabouraud dekstrozni bujon (SDB), suspenziju spora, resazurin i ekstrakt određene koncentracije. Smeša bez ekstrakta je korišćena kao negativna kontrola, dok je pozitivna kontrola sadržala komercijalni antimikotik, ketokonazol, umesto ekstrakta. Testirane koncentracije ketokonazola su bile u opsegu od 0.031 mg/mL do 0.002 mg/mL (serija duplih razblaženja). Efekat 5% DMSO na klijanje spora je takođe analiziran njegovim dodavanjem u smešu umesto SDB. Mikrotitracione ploče su inkubirane na 25 ± 2°C u toku 72 sata. Najniža koncentracija ekstrakta bez vidljivog rasta micelije je definisana kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) (Andrews, 2001). Minimalna fungicidna koncentracija (MFC) je najniža koncentracija ekstrakta bez micelijskog rasta nakon reinokulacije 2.0 μL smeše na SDA. Eksperiment je ponovljen tri puta.

3.5.5. Citotoksična aktivnost

3.5.5.1. Ćelijske linije kancera

Ćelijske linije humanog adenokarcinoma grlića materice (HeLa) i humanog karcinoma debelog creva (LS174), dobijene iz American Type Culture Collection (ATCC), su korišćene u ovim proučavanjima. Ove ćelijske linije se čuvaju na

preporučenom Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medijumu obogaćenom sa 100.0 g/L fetalnog goveđeg seruma (FBS) inaktivisanog na 56°C, 3 mM L-glutaminom, 100.0 mg/mL streptomicina, 100 IU/mL penicilina i 25 mM 4-(2 hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic kiselinom (HEPES), pH 7.2 (podešen sa rastvorom bikarbonata). Ćelije su rasle u vlažnoj atmosferi sa 95% vazduha/5% CO_2 (v/v), na 37°C.

3.5.5.2. Tretman ćelijskih linija

Štok rastvori ekstrakata (100.0 mg/mL), napravljeni u 50.0 g/L DMSO, su rastvoreni u obogaćenom RPMI 1640 medijumu do potrebnih radnih koncentracija. Inokulacija neoplastičnih HeLa ćelija (2000 ćelija po bunarčiću) i neoplastičnih LS174 ćelija (7000 ćelija po bunarčiću) vršena je u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarčića. Nakon 24 sata inkubacije i adhezije ćelija, ekstrakti u 5 koncentracija (serija duplih razblaženja) su dodati u bunarčiće. Finalne koncentracije primenjene na ciljne ćelije su bile 200.0 μg/mL, 100.0 μg/mL, 50.0 μg/mL, 25.0 μg/mL i 12.5 μg/mL, izuzev u kontrolnim bunarčićima u kojima je ćelijama bio dodat samo hranljivi medijum. Kulture su inkubirane 72 sata.

3.5.5.3. Određivanje stepena preživljavanja ćelija (MTT test)

Efekat ekstrakata na preživljavanje ćelija kancera određivan je pomoću microculture tetrazolium testa (MTT test), prema metodu Mosmann (1983) koga su modifikovali Ohno i Abe (1991). 20.0 μL MTT rastvora [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide u phosphate-buffering saline] koncentracije od 5.0 mg/mL je dodat u svaki bunarčić. Uzorci su inkubirani na 37°C u vlažnoj atmosferi sa 95% vazduha/5% CO_2 (v/v) u toku 4 sata. Nakon toga, 100.0 μL 10% sodiumdodecylsulfate je dodato ekstraktu da bi se rastvorio nerastvorljivi produkt formazan koji je rezultat konverzije MTT boje živim ćelijama. Broj živih ćelija u svakom bunarčiću je bio proporcionalan intenzitetu svetlosne apsorbance (A) koja je određivana pomoću ELISA čitača ploča na 570 nm 24 sata kasnije. Stopa inhibicije se izračunavala prema formuli:

Stopa inhibicije ćelijskog rasta (%) = $(A_{kontrole} - A_{uzorka})/A_{kontrole}$ x 100

IC_{50} je definisana kao koncentracija ekstrakta koja inhibira preživljavanje ćelija za 50% u poređenju sa kontrolom. *Cis*-diamminedichloroplatinum (*cis*-DDP), komercijalni citostatik, je korišćen kao pozitivna kontrola. Svi eksperimenti su urađeni tri puta.

3.6. Statistička analiza

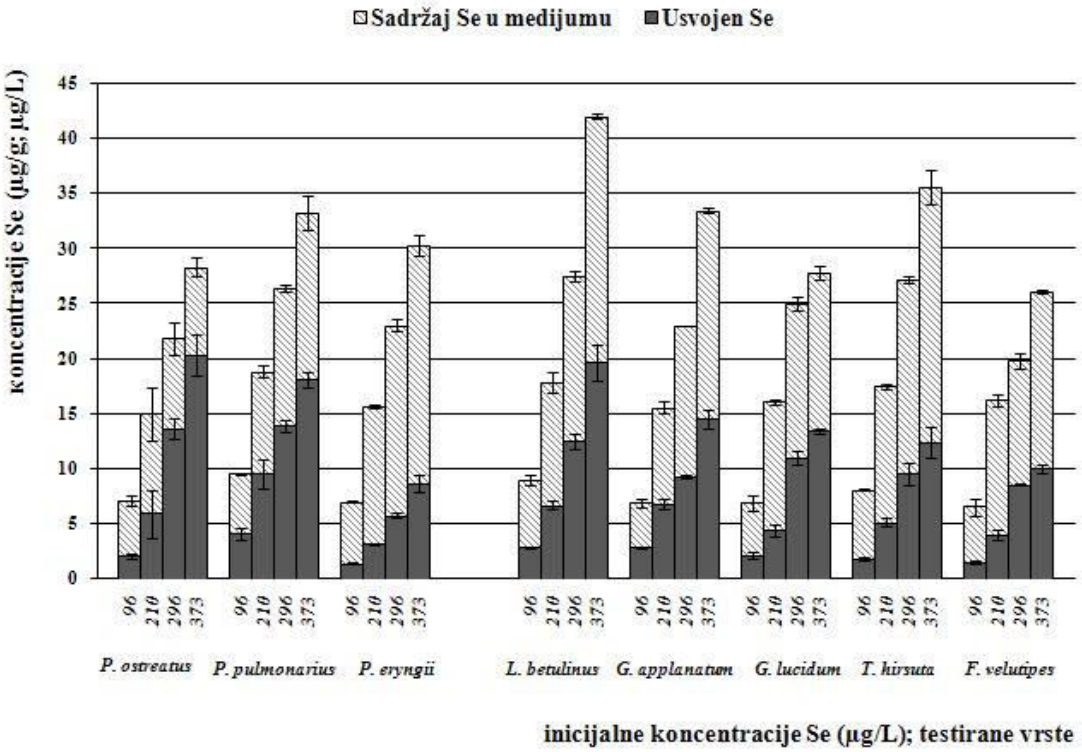
Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna greška rezultata dobijenih iz tri paralelna merenja. Za testiranje značajnih razlika vršena je One-way analysis of variance (ANOVA) korišćenjem STATISTIKA software, version 5.0 (StatSoft, Inc). P-vrednosti manje od 0.01 su se smatrale statistički značajnim.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Prinos biomase i nivo apsorpcije selena kod proučavanih vrsta makromiceta

4.1.1. Sadržaj selena u kultivacionom medijumu

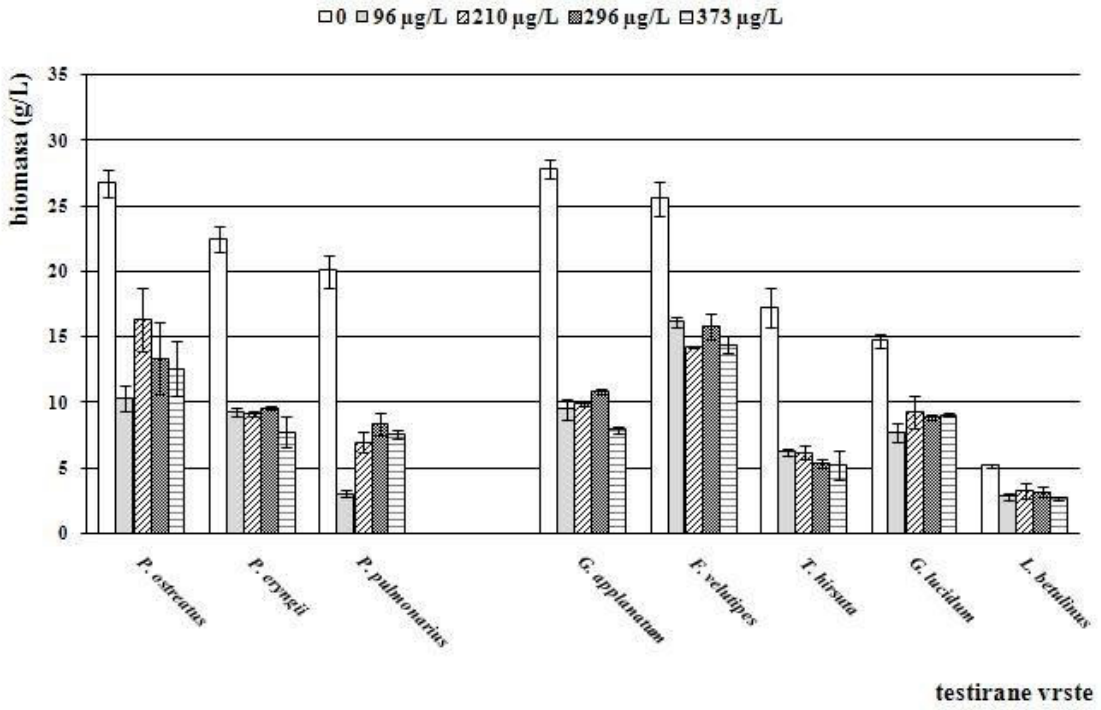
Koncentracije Se u Se-obogaćenom tečnom medijumu nakon sterilizacije a pre inokulacije bile su približno tri puta niže od početnih. U medijumima sa početnim koncentracijama Se od 300.0, 700.0, 1000.0 i 1300.0 µg/L posle sterilizacije je ostalo 96.0, 210.0, 296.0 odnosno 373.0 µg/L. Ove razlike mogu se objasniti procesom metilacije na visokoj temperaturi i pritisku pri čemu nastaje lako isparljiva forma dimetilselenid (Birringer i dr., 2002). Sadržaj Se u medijumu nakon kultivacije kretao se u opsegu od 4.1 µg/L (*G. applanatum*) do 23.1 µg/L (*T. hirsuta*) što pokazuje različite nivoe apsorpcije i metaboličke puteve kod testiranih vrsta (Grafik 1).



Grafik 1. Koncentracije Se apsorbovane od strane micelije odabranih vrsta makromiceta i preostale u medijumu nakon kultivacije. (Podaci predstavljaju srednju vrednost koncentracija tri uzorka. Varijacije su date kao standardne greške).

4.1.2. Efekat koncentracije selena na prinos biomase micelije

Analizirane koncentracije Se pokazale su inhibitorni efekat na prinos biomase testiranih vrsta u poređenju sa kontrolom (Grafik 2). Najveća produkcija biomase zabeležena je kod *G. applanatum* i *F. velutipes* kultivacijom u kontrolnom medijumu, tj. u odsustvu Se (27.8 g/L odnosno 25.6 g/L), a najniža kod *L. betulinus* pod istim uslovima (5.2 g/L). I pored toga što je kultivacija vrsta roda *Pleurotus* trajala samo 9 dana, zbog intenzivnog iskorišćavanja supstrata, produkcija biomase je bila značajnija u poređenju sa ostalim testiranim vrstama (između 20.1 g/L kod *P. pulmonarius* i 26.8 g/L kod *P. ostreatus*).



Grafik 2. Prinos biomase proučavanih vrsta gljiva u zavisnosti od koncentracije Se u medijumu. (Podaci predstavljaju srednju vrednost koncentracija tri uzorka. Varijacije su date kao standardne greške).

Testirane koncentracije Se nisu pokazale značajno različite efekte na produkciju biomase, dok je osetljivost na Se zavisila od vrste ($P<0.01$). Međutim, efekat testiranih koncentracija Se na prinos biomase je bio sličan kod svih proučavanih vrsta. Najbolji producenti biomase su bili *P. ostreatus* (16.3 g/L pri koncentraciji od 210.0 µg/L) i *F.*

velutipes (u opsegu od 14.3 g/L do 16.1 g/L), dok su najslabiji bili *P. pulmonarius* (3.1 g/L pri koncentracije od 96.0 µg/L) i *L. betulinus* (u opsegu od 2.7 g/L do 3.3 g/L).

Predhodna istraživanja su pokazala da različite forme i koncentracije Se utiču na produkciju biomase micelije. Izvori Se su imali različite efekte na prinos micelije kod brojnih vrsta i sojeva roda *Pleurotus* (Stajić i dr., 2006). Naime, kod nekih od njih prisustvo Se je imalo za posledicu povećanje ili smanjenje produkcije u poređenju sa kontrolom, dok je kod nekih prinos bio isti kao u kontroli. Isti efekat su saopštili Malinowska i dr. (2008) i Stabnikova i dr. (2008) tokom kultivacije *Hericium erinaceum* u Na_2SeO_3-obogaćenom medijumu odnosno kvasca u medijumu sa $NaHSeO_3$. Inhibitorni efekat Se na prinos biomase objasnili su Chen i dr. (2006) kao posledicu oksidativnih oštećenja ćelija indukovanih prisustvom Se i produkcijom neezimskih jedinjenja u velikim količinama.

4.1.3. Uticaj koncentracije selena na sposobnost apsorpcije

Selen nije detektovan ni kod jedne testirane vrste nakon kultivacije u medijumu koji nije bio obogaćen ovim elementom. Sposobnost apsorpcije Se je bila u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom u medijumu i značajno je zavisila od vrste ($P<0.01$). Naime, sa povećanjem koncentracije Se u medijumu rastao je i njegov sadržaj u miceliji (Grafik 1). Najveće apsorbovane količine Se zabeležene su kod *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* i *L. betulinus* (u opsegu od 18.1 µg/g do 20.3 µg/g) pri koncentraciji Se od 373.0 µg/L, dok je kod drugih testiranih vrsta ta količina bila od 8.7 µg/g (*P. eryngii*) do 14.5 µg/g (*G. applanatum*). Najniže vrednosti od 1.4 µg/g i 1.5 µg/g zabeležene su kod *P. eryngii* odnosno *F. velutipes* pri koncentraciji Se u medijumu od 96.0 µg/L. Najviši procenat usvojenog Se bio je kod *P. ostreatus* (62.5% pri koncentraciji od 373.0 µg/L) za razliku od ostalih vrsta kod kojih je procenat apsorpcije bio znatno niži (od 14.9% kod *L. betulinus* do 45.5% kod *F. velutipes*). Međutim, najniži nivo apsorbovanog Se utvrđen je kod *L. betulinus*, 8.1% u medijumu sa Se u koncentraciji od 96.0 µg/L.

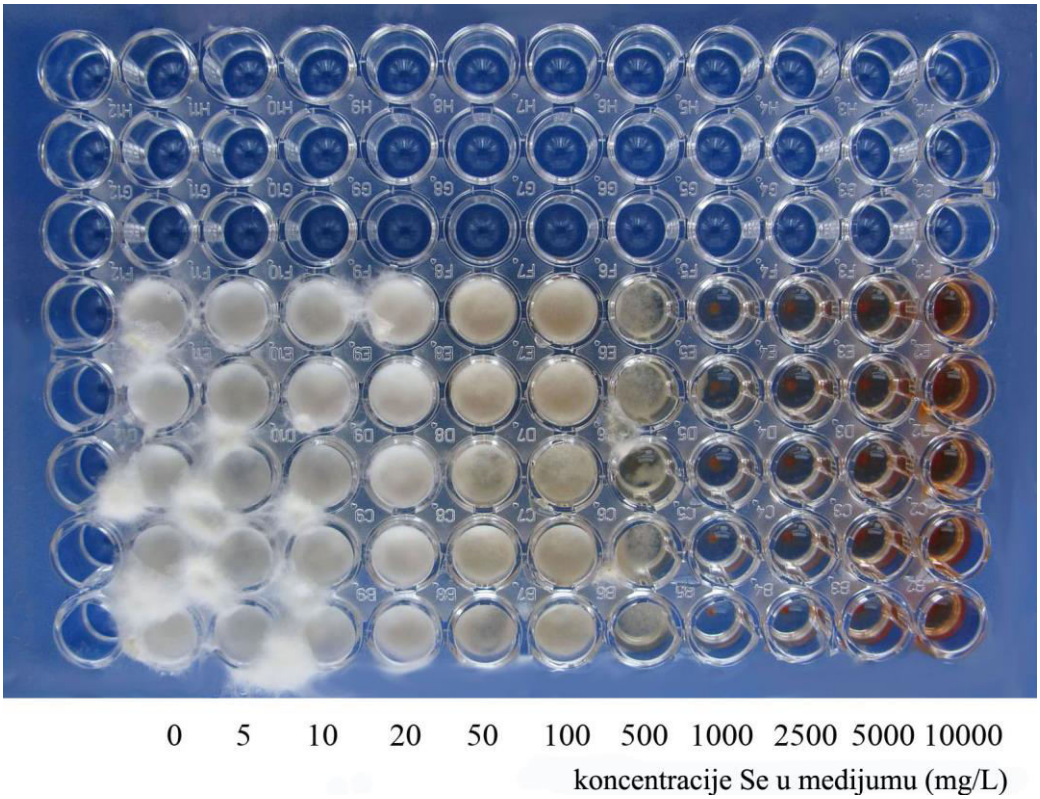
Usvajanje Se zavisi od afiniteta same vrste, metaboličkog puta, forme i koncentracije Se i karakteristika supstrata (sastav, pH, temperatura i dr.) (Dernovics i dr., 2002; Wilburn i dr., 2004; Hartikainen, 2005). Međutim, Shi i dr. (2010) su saopštili da se organski izvori Se znatno bolje usvajaju kod ljudi i životinja zbog niza karakteristika

uključujući manju toksičnost i manju produkciju superoksida a veću biološku efikasnost. Na osnovu ranijih istraživanja, utvrđeno je da gljive imaju visok potencijal akumulacije Se (Falandysz, 2008). Sadržaj proteina, ugljenih hidrata i lipida, kao i sposobnost vezivanja usvojenog Se čini gljive vrednim izvorom hrane (Fairweather-Tait, 1997). Iako je potvrđeno da je micelija čak nekoliko puta efikasnija u usvajanju Se, istraživanja su uglavnom fokusirana na obogaćivanje plodonosnih tela koja se koriste u ishrani (Costa-Silva i dr., 2011). Tako, količina apsorbovanog Se kod *Agaricus bisporus* je bila 160.0 µg/g, kod *G. lucidum* 72.0 µg/g, a kod *L. edodes* 46.0 µg/g (Birringer i dr., 2002; Cocchi i dr., 2006; Falandysz, 2008; Costa-Silva i dr., 2011). Evropski komitet za hranu preporučuje dnevnu dozu Se od 55.0 µg a maksimalnu od 100.0 µg. Imajući u vidu da nedostatak Se prouzrokuje različita oboljenja (Finley, 2006), problem bi se mogao uspešno rešiti obogaćivanjem hrane selenom i uvođenjem dodataka bogatih njegovom organskom formom (Stabnikova i dr., 2008). Shi i dr. (2010) su demonstrirali značajnu efikasnost polisaharida iz Se-obogaćenih plodonosnih tela *G. lucidum* u smanjenju oštećenja srčanog mišića povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima i inhibicije peroksidacije lipida. Činjenica da obogaćivanje hrane Se u iznosu od 2 ppm (2.0 µg/mg) redukuje razvoj tumora za 50-60% (Ip, 1998) opravdava interesovanje za proučavanjem potencijala apsorpcije kod različitih makromiceta.

4.2. Efekat visokih koncentracija selena na morfo-fiziološke karakteristike micelije *Pleurotus ostreatus*

4.2.1. Efekat visokih koncentracija selena na rast i apsorpcioni kapacitet micelije

Rast micelije pri koncentracijama Se od 5.0 , 10.0 i 20.0 mg/L je bio identičan kao u kontrolnom medijumu. U poređenju sa kontrolom prisustvo Se u koncentracijama od 50.0 mg/L i 100.0 mg/L je imalo za posledicu slabiji rast micelije, koncentracija od 500.0 mg/L je značajno inhibirala rast, dok su više kompletno zaustavile rast micelije. Koncentracija Se od 1000.0 mg/L je predstavljala minimalnu inhibitornu koncentraciju (Slika 8).

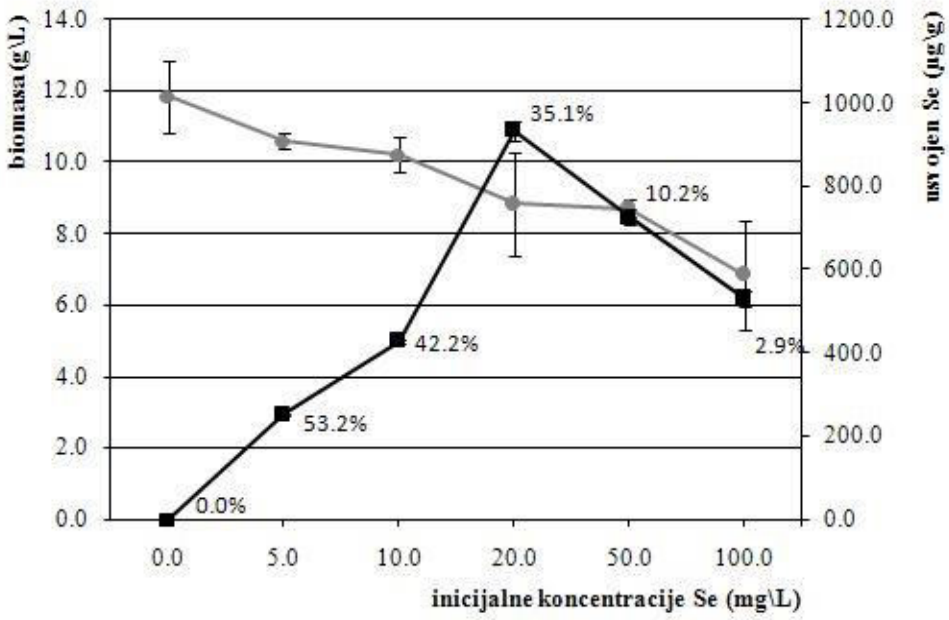


Slika 8. Uticaj različitih koncentracija Se na rast micelije *Pleurotus ostreatus*

Stopa rasta micelije je praćena merenjem prečnika kolonije na agarizovanom sintetičkom medijumu obogaćenom Se u koncentracijama od 0.0 do 500.0 mg/L. Maksimalni dijametar kolonije (Ø90 mm) je zabeležen 13. dana kultivacije u kontroli kao i pri koncentracijama Se od 5.0, 10.0 i 20.0 mg/L. Prosečna stopa rasta micelije u kontroli je rasla sa vremenom kultivacije od 2.0 mm u toku prvih pet dana do 5.0 mm dnevno tokom poslednja četiri dana kultivacije. Nešto niža stopa rasta zabeležena je pri koncentracijama Se od 50.0 mg/L i 100.0 mg/L, 1.5 mm dnevno na početku kultivacije do 3.0 mm tokom preostalog perioda dok je maksimalni rast kolonije dostignut 20. dana inkubacije. Koncentracija Se od 500.0 mg/L je potpuno inhibirala rast micelije čak i nakon 20 dana kultivacije i definisana je kao MIC. Soković i van Griensven (2006) takođe saopštavaju da MIC zavisi od tipa kultivacije.

Produkcija biomase je bila najveća u kontroli (11.8 g/L) a sa povećenjem koncentracije Se je opadala (Grafik 3). Tako, pri koncentraciji od 100.0 mg/L prinos biomase je bio 6.8 g/L a pri 500.0 mg/L produkcija je bila kompletno inhibirana. Mada su dijametri kolonija bili skoro identični u kontrolnom kao i u medijumima obogaćenim sa tri početne koncentracije Se, prinos biomase je bio znatno manji u prisustvu Se

(P<0.01). Uočeno je odsustvo korelacije između efikasnosti apsorpcije Se i njegove koncentracije u medijumu, naime, sa povećanjem koncentracije apsorpcioni kapacitet micelije je opadao. Zabeležene vrednosti usvojenog Se kretale su se u opsegu od 251.2 μg/g (pri koncentraciji od 5.0 mg/L) do 938.9 μg/g (pri koncentraciji od 20.0 mg/L) što je ujedno i maksimalna apsorbovana količina Se (Grafik 3). Na višim koncentracijama, i ako je nivo apsorpcije opadao, sadržaj Se u miceliji je bio viši od dobijenog pri koncentracijama od 5.0 mg/L i 10.0 mg/L (P<0.01). Na osnovu rezultata, moguće je izračunati optimalnu koncentraciju Se u medijumu za produkciju biomase i apsorpciju. Optimalne vrednosti bi bile između 15.0 mg/L i 20.0 mg/L sa prinosom od 9.0 g/L i količinom apsorbovanog Se od oko 800.0 μg/g.



Grafik 3. Produkcija biomase (●) i apsorpcija Se (■) kod *Pleurotus ostreatus* u zavisnosti od količine Se u medijumu. (Podaci predstavljaju srednju vrednost koncentracija tri uzorka. Varijacije su date kao standardne greške).

Dobijeni rezultati pokazuju da se procenat usvojenog Se u biomasi smanjuje sa povećanjem njegove koncentracije. Najviši nivo usvajanja od 53.3% je zabeležen pri početnoj koncentraciji Se od 5.0 mg/L, pri koncentracijama od 10.0 mg/L i 20.0 mg/L dobijene vrednosti su bile 43.6% odnosno 41.3%, dok su značajno opale pri koncentracijama od 50.0 mg/L i 100.0 mg/L (11.2% odnosno 3.6%).

Dobijeni rezultati potvrđuju da su gljive dobri apsorberi Se zbog čega mogu imati važnu ulogu u procesima detoksifikacije životne sredine (Serafin-Munoz i dr., 2007; Falandysz, 2008). Brojna istraživanja su pokazala da različite vrste, čak i sojevi, imaju različitu sposobnost apsorpcije i akumulacije Se u zavisnosti od stadijuma razvića, supstrata, forme i koncentracije Se (Ponce de Leon i dr., 2002; Turlo i dr., 2009). Tako, sadržaj Se u miceliji *Lentinula edodes* i ćelijama *Saccharomyces cerevisiae*, gajenih u medijumu sa Se u koncentraciji od 20.0 mg/L, je bio 748.0 μg/g odnosno 1825.0 μg/g. Suprotno navedenim vrstama *G. lucidum* je imala nizak potencijal inkorporacije Se u plodonosna tela, samo 29% od koncentracije prisutne u medijumu (Zhao i dr., 2004).

Prema podeli Switras (1999), *P. ostreatus* HAI 592 se odlikuje hiperakumulacijom Se, čak više od 100.0 mg/kg suve mase. Suhajda i dr. (2000) su pokazali da efikasnost apsorpcije nije ista tokom kultivacije već može varirati. *S. cerevisiae* je akumulirao Se u koncentracijama od 1200.0 μg/g do 1400.0 μg/g suve mase u toku eksponencionalne faze rasta u medijumu obogaćenom sa Na_2SeO_3 (30.0 μg/mL Se), dok su veće količine uzrokovale jaku inhibiciju rasta (Zhao i dr., 2004). Slične rezultate su dobili i Malinowska i dr. (2008) koji su zabeležili značajnu redukciju prinosa biomase *H. erinaceum* tokom kultivacije u medijumu sa 100.0 mg/L Se, dok koncentracija od 25.0 mg/L nije značajno uticala na rast.

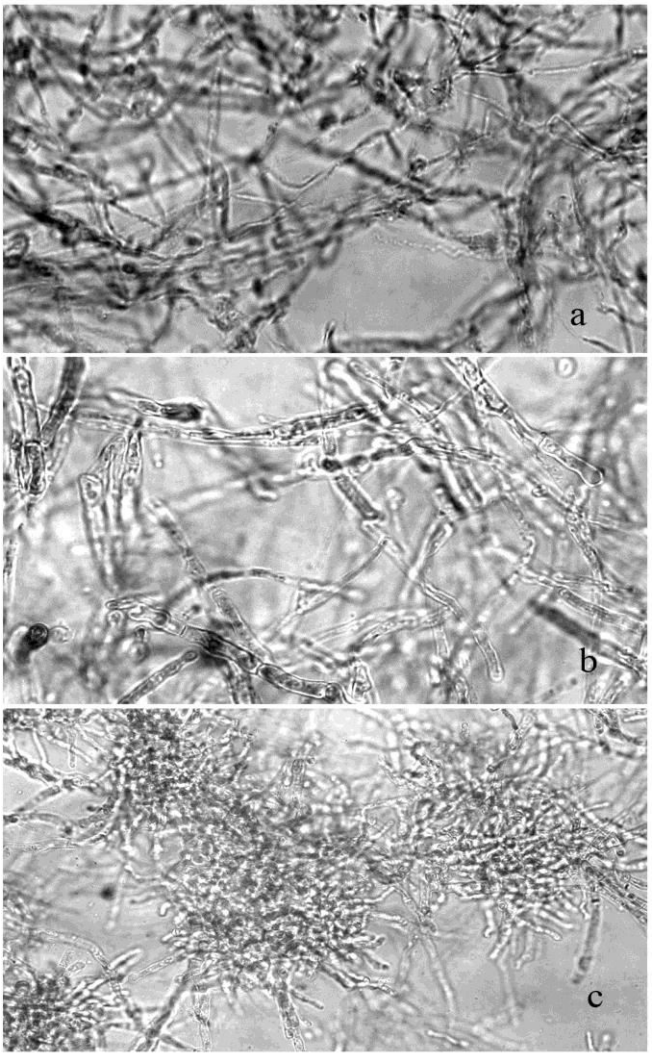
4.2.2. Efekat visokih koncentracija selena na morfologiju i ultrastrukturu micelije

Nakon 9 dana kultivacije *P. ostreatus* u kontrolnom medijumu razvila se bela i gusta micelija koja se nije morfološki razlikovala od one formirane u medijumu obogaćenom Se u koncentracijama od 5.0, 10.0, 20.0 i 50.0 mg/L. Međutim, više koncentracije (100.0 mg/L i 500.0 mg/L) prouzrokovale su pojavu pigmentacije micelije i medijuma karakteristične cigla-crvene boje (Slika 9).

500.0 mg/L 100.0 mg/L Kontrola

Slika 9. Izgled kultura *Pleurotus ostreatus* pri različitim koncentracijama Se u medijumu

U kontrolnom medijumu, hife su bile tipične za *P. ostreatus*, tankozidne, hijalinske, dijametra od 2.00 µm do 5.94 µm, granate, anastomozirane i sa klamp-vezama (Slika 10a). Nasuprot tome, u medijumu obogaćenom sa Se u koncentraciji od 100.0 mg/L, gustina hifa je bila manja, njihov prečnik je varirao između 3.24 µm i 10.50 µm, bile su slabije granate, ćelijski zid je bio tanak sa mnogo izraženijim ekstracelularnim matriksom, bez uočljivih klamp-veza i sa učestalim septama (Slika 10b). Pri najvišoj koncentraciji Se na kojoj je rast bio zabeležen (500.0 mg/L) gustina hifa je bila najmanja a karakteristični "namotaji" hifa su se mogli uočiti. Hife su bile kraće, frekventno septirane, prečnika od 4.30 µm do 7.70 µm, sa izraženijim ekstracelularnim matriksom i bez klamp-veza (Slika 10v). I ako širina hifa nije bila veća od 10.50 µm pri koncentraciji Se od 100.0 mg/L, frekvencija hifa dijametra oko 7.00 µm je bila viša pri koncentraciji od 500.0 mg/L. Mada su navedene koncentracije Se uticale na gustinu i morfologiju hifa njihov najznačajniji efekat je bio odsustvo klamp-veza.



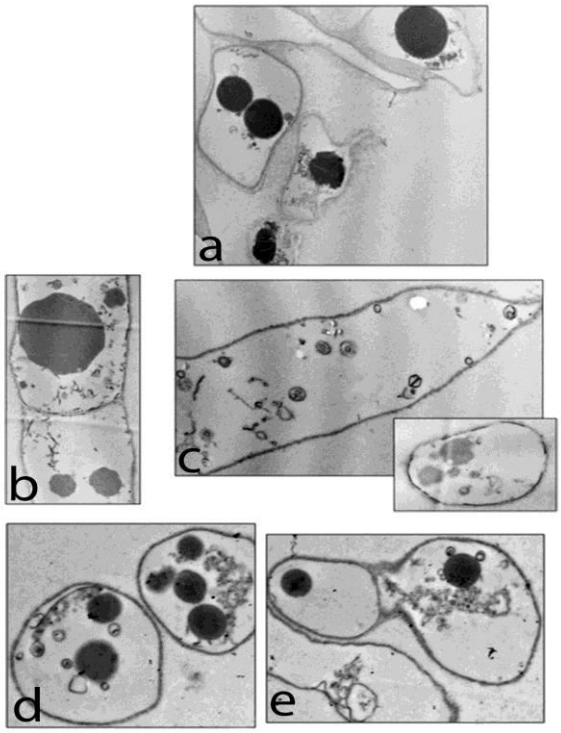
Slika 10. Morfologija hifa u zavisnosti od koncentracije Se u medijumu. **a.** kontrola; **b.** 100.0 mg/L; **c.** 500.0 mg/L. (x630)

Poređenjem ultrastrukturnih karakteristika micelija dobijenih u kontrolnom medijumu (Slika 11a) i onom obogaćenom Se (Slika 11b-d), pokazano je da se apsorbovani Se akumulira uglavnom u ćelijskoj membrani i u vakuolama, dok su na ćelijskom zidu promene bile neznatne. Nasuprot tamnoj ćelijskoj membrani uzoraka dobijenih u medijumu sa 500.0 mg/L Se, koncentracija od 100.0 mg/L je uzrokovala delimično zatamnjenje membrana ćelije i vakuola, koje je verovatno bilo rezultat inkorporacije Se koji kao antioksidativni agens štiti ćelije od peroksidacije lipida prouzrokovane akumulacijom metalnih jona u citosolu *P. ostreatus* (Serafin-Muñozi dr., 2007). Nasuprot ćelijskom zidu koji je ostao gotovo nepromenjen, redukcija ćelijskog

sadržaja je bila u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom Se (Slika 10). Tamne strukture, vidljive i u kontrolnom i u Se-obogaćenom uzorku, mogle bi biti proteinska tela jer se lipidna tela uglavnom ekstrahuju tokom pripreme za TEM (Slika 11b-d). U prisustvu Se broj navedenih struktura je rastao a promene u njihovom obliku, boji i veličini su bile neznatne što ih isključuje kao moguće depoe Se. Pokazano je i da se redukcija jona Se i stvaranje amorfnog Se^o dešavala oko ovih tela. Prema rezultatima Serafin-Muñoz i dr. (2007) polisaharid-hitin strukture u ćelijskom zidu kao i jedinjenja citosola *P. ostreatus* vezuju Se. Zbog toga vezivanje Se za ćelijsku membranu i nagomilavanje u vakuolama mogu biti esencijalni mehanizmi njegove detoksifikacije.

Predhodna proučavanja su pokazala da više koncentracije selenita prouzrokuju prvo akumulaciju Se u miceliji *P.ostreatus*, a u toku faze opadanja rasta selenit se redukuje do amorfnog Se^o zbog čega micelija i medijum dobijaju karakterističnu crvenkastu boju (Korhola i dr., 1986; Gharieb i dr., 1995; White i dr., 1995; Poluboyarinova i dr., 2009). Međutim, pored ovog mehanizma detoksifikacije Brown i Shrift (1982) i Zhao i dr. (2004) su istakli da vrste koje imaju visok potencijal akumulacije Se mogu inkorporirati ovaj element iz neorganskih formi u Se-metilselenocistein i Se-cistationin, dve neproteinske selenoamino kiseline koje se produkuju u toku procesa metilacije H_2Se (Slika 7). Tako, *S. cerevisiae* u prisustvu visokih koncentracija Se u medijumu sadrži selenometionin, selenocistein, Se-metilselenocistein i selenoetionin (Ip, 1998). Šlejkovec i dr. (2000) i Huerta i dr. (2005) su takođe pokazali prisustvo selenocistationa u supernatantu samlevenih plodonosnih tela *Macrolepiota procera*, *Lepista luscina*, *Boletus edulis* i *B. luridus*, dok je Falandysz (2008) našao Se-metilselenocistein kod *L. edodes* i *A. bisporus*.

Intenzivna vakuolarizacija citoplazme, povećana propustljivost ćelijske membrane i brojne male citoplazmatične vezikule sa gustim granulama su takođe zabeležene kod *S. cerevisiae* nakon rasta u medijumu obogaćenom sa Se u koncentraciji od 5.0 μmol/L (Gharieb i Gadd, 2004). Međutim, u poređenju sa kontrolom nikakve promene u ultrastrukturi nisu uočene kod ćelija raslih u prisustvu 10 μmol/L Se-metilselenocisteina.



Slika 11. Ustrastrukturne karakteristike hifa *Pleurotus ostreatus* u zavisnosti od koncentracije Se u medijumu. **a.** kontrola; **b**, **c**. 100.0 mg/L; **d**, **e**. 500.0 mg/L. (x15000).

S obzirom na efekte Se na nivou molekula, Lenz i Lenz (2009) su saopštili da su inhibicija rasta ćelije, smanjenje sinteze i cepanje lanca DNK i smrt ćelije prouzrokovane nekrozom ili akutnom lizom posledice visokih koncentracija selenita. Cepanje molekula DNK i smrt ćelije su takođe bili rezultat toksičnih i mutagenih efekata Na_2SeO_3 na *S. cerevisiae* (Letavayova i dr., 2008; Manikova i dr., 2010). Nasuprot selenitima, Ip (1998) i Letavayova i dr. (2008) su uočili da Se-metilselenocistein samo delimično inhibira stopu rasta i sintezu DNK, ne izaziva cepanje DNK lanaca, a do smrti ćelije pre svega dolazi apoptozom. Prema ovim autorima, mehanizmi aktivnosti selenita i Se-metilselenocisteina su bili različiti, selenit je inhibirao rast ćelije nespecifičnim genotoksičnim efektom, a metilisane forme Se su smanjivale stopu rasta odlaganjem S faze.

Još uvek je nejasno kako neke vrste tolerišu visoke koncentracije Se u spoljašnjoj sredini. Gharieb i Gadd (1998) su predpostavili da bi glavne strategije rezistentnosti na

Se i njegove detoksifikacije kod gljiva bile: (1) prevencija ili redukcija ulaska Se u ćeliju; (2) akumulacija Se u vakuolama i (3) redukcija selenita do Se^o ili njegova metilacija do isparljivih organskih, manje toksičnih, formi.

Sa povećanjem svesti o zaštiti zdravlja, posebna pažnja se posvećuje efikasnoj kontroli emisije Se kao i njegovoj detoksifikaciji korišćenjem ekološki i ekonomski opravdanih procedura. Većina filamentoznih gljiva i kvasaca bi se mogle uspešno koristiti kao bioremediatori zbog (1) visokog kapaciteta apsorpcije Se; (2) velike količine produkovane biomase tokom industrijskih fermentacija i (3) značajne sposobnosti hitina, njegovih derivata kao i egzopolimera koji formiraju kapsule ili sluzave slojeve da vrše bisorpciju koja je bazirana na prisustvu mesta za vezivanje Se (White i dr., 1995). Mada tehnologija mikoremedijacije još uvek nije dobro poznata, rezultati ovog proučavanja pokazuju da *P. ostreatus* poseduje značajan kapacitet apsorpcije i akumulacije Se.

4.3. Antioksidativna aktivnost

4.3.1. Neutralizacija DPPH radikala

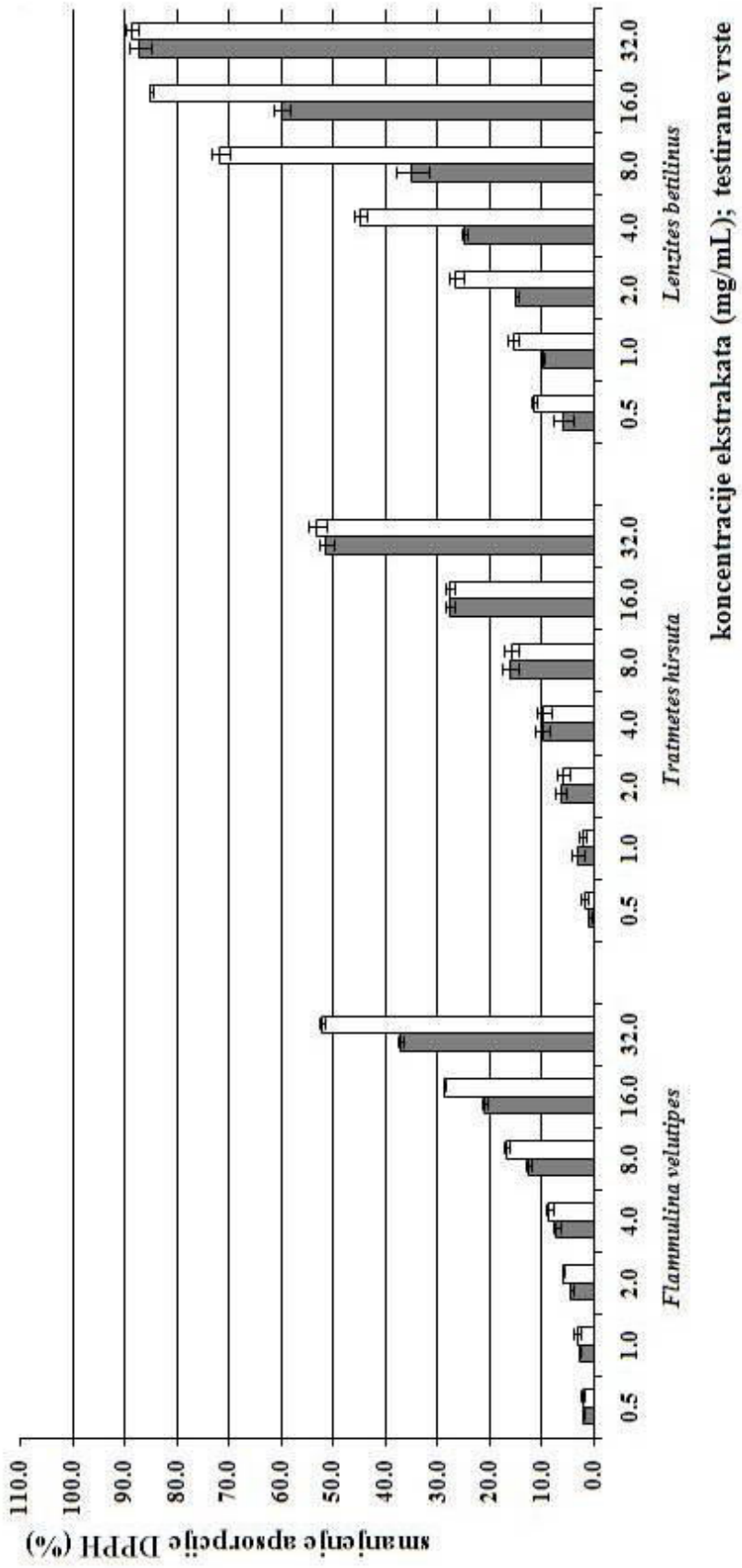
Etanolni ekstrakti i neobogaćene i Se-obogaćene micelije svih proučavanih vrsta makromiceta su imali sposobnost neutralizacije DPPH radikala koja je zavisila od njihove koncentracije, naime na višim koncentracijama efikasnost je bila veća (Grafici 4, 5, 6). Kod svih vrsta, izuzev predstavnika roda *Pleurotus*, ova aktivnost je bila znatno veća u prisustvu Se ali mnogo manja u poređenju sa onom kod komercijalnog antioksidansa, BHA, čija je EC_{50} vrednost iznosila 13.4 μg/mL. Na osnovu EC_{50} vrednosti ekstrakata testiranih jestivih i lekovitih vrsta gljiva, antioksidativni potencijal je opadao sledećim redosledom: *L. betulinus* > *G. lucidum* > *G. applanatum* > *P. pulmonarius* > *P. ostreatus* > *P. eryngii* > *T. hirsuta* > *F. velutipes*.

Ekstrakti *L. betulinus* su bili najefikasniji u hvatanju DPPH radikala (oko 88% pri koncentraciji od 32.0 mg/mL) (Grafik 4). Prisustvo Se u miceliji značajno je povećavalo ovaj potencijal ($P<0.01$) i to do koncentracije ekstrakta od 16.0 mg/mL. Kapaciteti Se-obogaćenog i neobogaćenog ekstrakta su se najviše razlikovali pri koncentraciji od 8.0 mg/mL (71.6% odnosno 34.8%), dok je pri koncentraciji od 32.0 mg/mL razlika bila

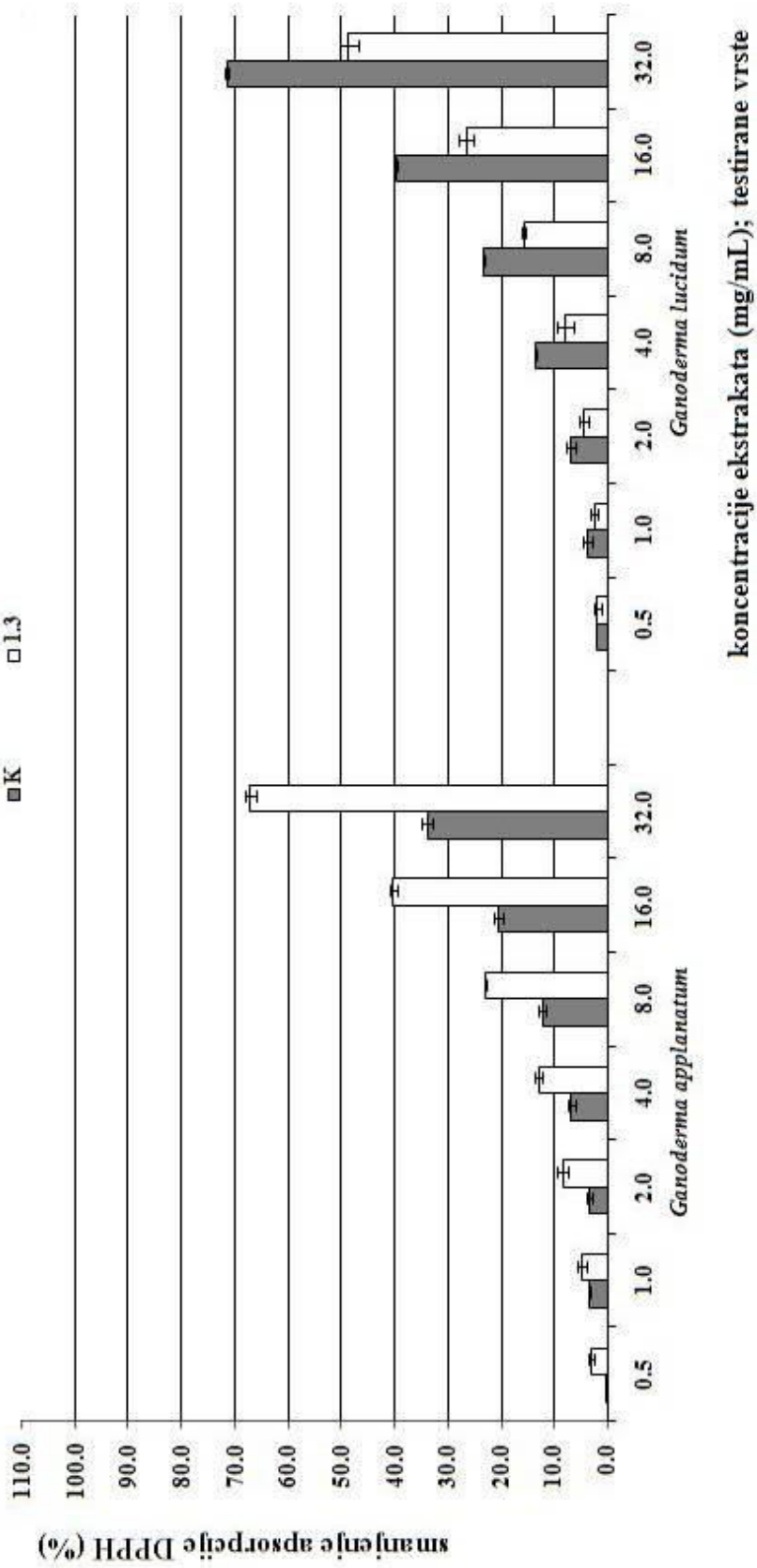
neznatna. Ova visoka efikasnost ekstrakata *L. betulinus* potvrđena je EC_{50} vrednostima. U Se-obogaćenom ekstraktu ova vrednost je bila 6.8 mg/mL a u neobogaćenom 15.9 mg/mL.

Drugi po sposobnosti hvatanja DPPH radikala bili su etanolni ekstrakti vrsta roda *Ganoderma* i to posebno oni obogaćeni Se. Generalno, ekstrakti Se-obogaćene micelije *G. lucidum* su imali viši kapacitet hvatanja radikala nego ekstrakti *G. applanatum* (Grafik 5). Međutim, uprkos sličnom sadržaju Se u miceliji ovih vrsta, 14.0 μg/g (Milovanović i dr., 2013), njegov efekat na antioksidativni kapacitet bio je suprotan, naime stimulatorni kod *G. applanatum*, što je bilo u saglasnosti sa rezultatima Turlo i dr. (2010), odnosno inhibitorni kod *G. lucidum*. Ekstrakti Se-obogaćene micelije *G. applanatum* su bili oko dva puta efikasniji hvatači DPPH radikala od ekstrakata neobogaćene micelije. Dobijene vrednosti u prisustvu Se su bile između 3.1% (pri koncentraciji od 0.5 mg/mL) i 67.1% (pri koncentraciji od 32.0 mg/mL), dok su se u ekstraktima bez Se kretale u opsegu od 1.3% do 33.9%. Kod *G. lucidum* aktivnost je takođe rasla sa povećanjem koncentracije ekstrakta, od 1.4% do 71.6% u neobogaćenim ekstraktima odnosno od 1.3% do 48.6% u Se-obogaćenim (Grafik 5). Ovi rezultati su takođe bili potvrđeni EC_{50} vrednostima koje su kod *G. applanatum* bile 21.5 mg/mL u Se-obogaćenom ekstraktu odnosno 46.9 mg/mL u neobogaćenom, dok su u istim ekstraktima *G. lucidum* ove vrednosti bile 21.1 mg/mL odnosno 31.3 mg/mL.

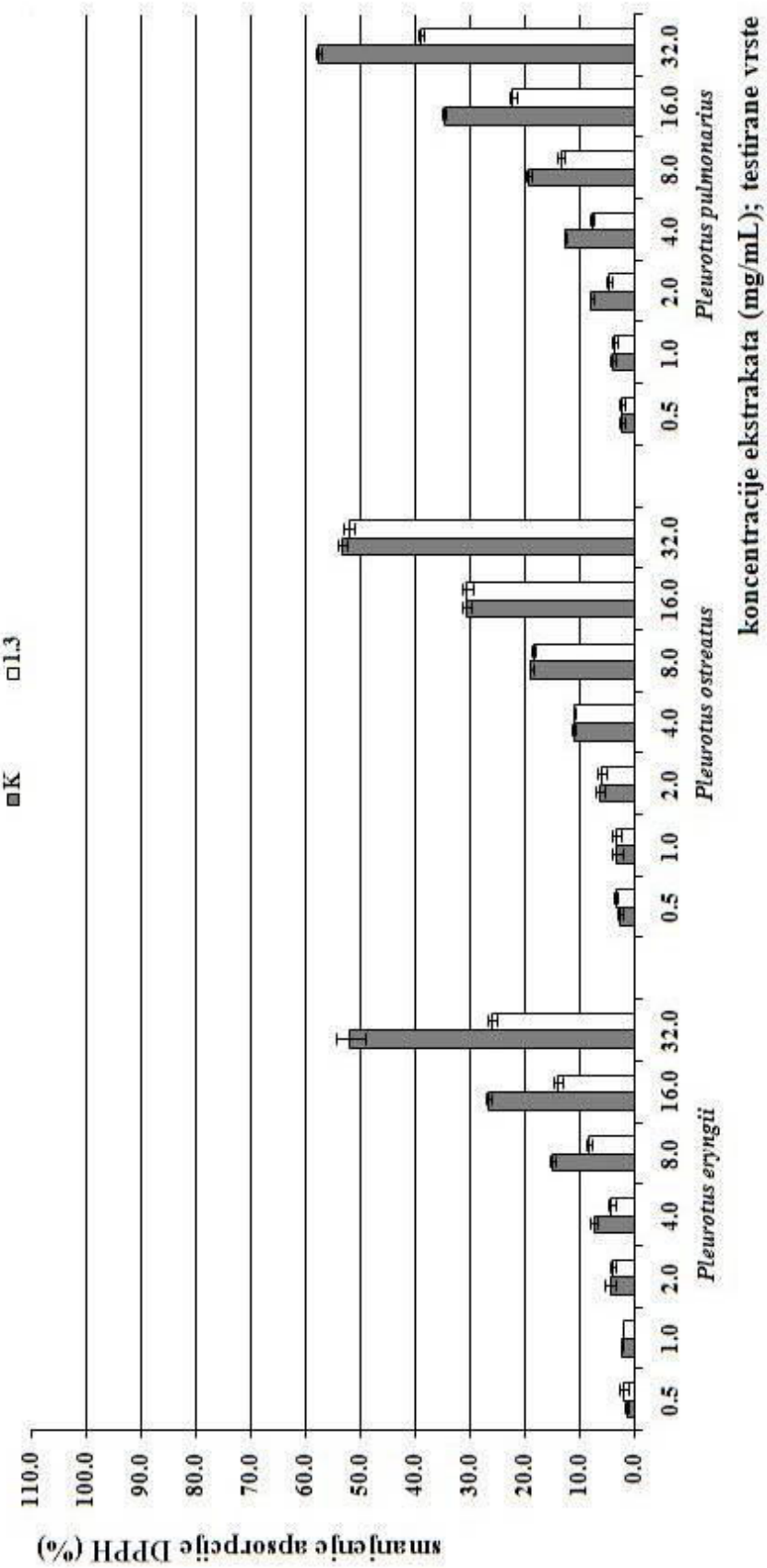
Ekstrakti neobogaćenih micelija proučavanih vrsta roda *Pleurotus* su bili aktivniji u hvatanju DPPH radikala od onih Se-obogaćenih (Grafik 6). Ove razlike u aktivnostima su bile značajne ($P<0.01$) kod *P. eryngii* i *P. pulmonarius*, posebno pri višim koncentracijama ekstrakata (≥4.0 mg/mL), dok su kod *P. ostreatus* bile neznatne. Ekstrakti neobogaćenih micelija su pokazali progresivno povećanje aktivnosti sa koncentracijom. Tako su dobijene vrednosti kod *P. eryngii* bile između 7.3% i 51.8%, a kod *P. pulmonarius* između 12.6% i 57.5% (pri koncentracijama od 4.0 mg/mL odnosno 32.0 mg/mL). Međutim, kod *P. ostreatus* ove razlike su bile neznatne (oko 1%) pri svim testiranim koncentracijama (Grafik 6). EC_{50} vrednosti su takođe potvrdile ovi rezultate. Naime, u ekstraktima micelije *P. eryngii* i *P. pulmonarius* neobogaćene selenom bile su 30.9 mg/mL odnosno 27.1 mg/mL, dok su u Se-obogaćenim ekstraktima bile 63.7 mg/mL odnosno 41.2 mg/mL. Suprotno ovim vrestama, kod *P. ostreatus* razlike su bile minimalne, 28.8 mg/mL odnosno 29.2 mg/mL.



Grafik 4. Kapacitet etanolnih ekstrakata neobogaćene i Se-obogaćene micelije *Flammulina velutipes*, *Trametes hirsuta* i *Lenzites betulinus* da neutrališu DPPH radikale. (Podaci predstavljaju srednju vrednost aktivnosti tri uzorka. Varijacije su predstavljene kao standardne greške).



Grafik 5. Kapacitet etanolnih ekstrakata neobogaćene i Se-obogaćene micelije *Ganoderma applanatum* i *G. lucidum* da neutrališu DPPH radikale. (Podaci predstavljaju srednju vrednost aktivnosti tri uzorka. Varijacije su predstavljene kao standardne greške).



Grafik 6. Kapacitet etanolnih ekstrakata neobogaćene i Se-obogaćene micelije *Pleurotus eryngii*, *P. ostreatus* i *P. pulmonarius* da neutrališu DPPH radikale. (Podaci predstavljaju srednju vrednost aktivnosti tri uzorka. Varijacije su predstavljene kao standardne greške).

Efikasnost neobogaćenih ekstrakata micelije *T. hirsuta* u hvatanju slobodnih radikala je bila oko 50% pri koncentraciji od 32.0 mg/mL a prisustvo Se gotovo da nije uticao na nju (Grafik 4). I kod ekstrakata ove vrste bio je zabeležen trend rasta aktivnosti sa povećanjem njihove koncentracije, koja je posebno visoka bila pri koncentraciji od 32.0 mg/mL (53.2% u prisustvu Se odnosno 51.3% u njegovom odsustvu). EC_{50} vrednost Se-obogaćenog ekstrakta je bila 30.1 mg/mL a neobogaćenog 30.6 mg/mL.

Mada je *F. velutipes* bila najneefikasnija u hvatanju slobodnih radikala, značajne razlike u nivoima aktivnosti ekstrakata neobogaćene micelije i one Se-obogaćene su zabeležene ($P<0.01$). Ekstrakt Se-obogaćene micelije je imao bolji efekat u poređenju sa kontrolom i pokazao je progresivno povećanje kapaciteta na koncentracijama većim od 8.0 mg/mL (od 4% pri koncentraciji od 8.0 mg/mL do 15% pri 32.0 mg/mL) (Grafik 4). Ovi rezultati su takođe bili potvrđeni EC_{50} vrednostima koje su bile 30.5 mg/mL u ekstraktu Se-obogaćene micelije odnosno 43.8 mg/mL u neobogaćenom.

Danas je datoteka antioksidativnog potencijala vrsta ovih rodova veoma bogata i to uglavnom rezultatima dobijenim sa ekstraktima plodonosnih tela i pojedinačnih izolovanih jedinjenja. Međutim, i malobrojni podaci pokazuju značajni nivo aktivnosti ekstrakata micelije. Tako, metanolni i vodeni ekstrakti micelije *G. tsugae* su imali znatno višu sposobnost hvatanja DPPH radikala (85.7% pri koncentraciji od 10.0 mg/mL odnosno 52.9–91.2% pri koncentracijama od 1.0–20.0 mg/mL) od etanolnih i metanolnih ekstrakata plodonosnih tela Italijanskog soja *G. lucidum* (60% odnosno 45% pri koncentraciji od 0.5 mg/mL) mada nižu od komercijalnih antioksidanasa, α-tokoferola i BHA (Mau i dr., 2001, 2005; Saltarelli i dr., 2009). Različiti ekstrakti micelije i plodonosnih tela brojnih vrsta roda *Pleurotus* su se takođe karakterisali visokim antioksidativnim kapacitetom. Sposobnost etanolnih ekstrakata plodonosnih tela i micelije *P. citrinopileatus* da hvataju DPPH radikale je bila visoka (94.9% odnosno 92.8%) kao i etanolnih i vodenih ekstrakata plodonosnih tela *P. ostreatus*, *P. ferulae* i *P. sajor-caju* (EC_{50} vrednosti su bile niže od 14.0 mg/mL) (Lee i dr., 2007; Tsai i dr., 2009; Finimundy i dr., 2013). Ekstrakti plodonosnih tela *P. ostreatus* i *P. florida* su takođe imali visoki potencijal redukcije jona gvožđa odnosno hvatanja •OH radikala i inhibicije peroksidacije lipida (Jose i Janardhanan, 2000; Jayakumar i dr., 2009). Značajnu sposobnost neutralizacije DPPH radikala ekstraktima *F. velutipes*

saopštili su Bao i dr. (2010) koji su pokazali veću efikasnost ekstrakata micelije (skoro 4 puta) u odnosu na plodonosna tela.

Mada su kapaciteti neutralizacije slobodnih radikala i EC_{50} vrednosti etanolnih ekstrakata micelije 8 proučavanih vrsta makromiceta bili znatno niži u poređenju sa onima kod plodonosnih tela i posebno nekih izolovanih jedinjenja, činjenice da se micelija može brže i jeftinije dobiti u velikim količinama kao i da ima veću sposobnost apsorpcije mikro elemenata (Stajić i dr., 2006; Milovanović i dr., 2013), sugerišu da ona treba da bude objekat intenzivnijeg proučavanja.

4.3.2. Sadržaj fenola i flavonoida

Jestive i lekovite vrste gljiva predstavljaju depo brojnih biološki aktivnih jedinjenja koja pojedinačno ili u kombinaciji sa drugima imaju značajan antioksidativni kapacitet i mogu se smatrati potencijalnim prirodnim antioksidansima (Jayakumar i dr., 2009; Liu i dr., 2010; Xia i dr., 2011). Među njima se po aktivnosti ističu fenolna jedinjenja koja nemaju mutageni efekat i imaju važnu ulogu u zaštiti od nekoliko degenerativnih bolesti. Kako su istakli Lee i dr. (2007) njihova zastupljenost u ekstraktima gljiva je različita od vrste do vrste, čak od soja do soja, i u većini slučajeva je u direktnoj korelaciji sa antioksidativnim potencijalom. Totalni sadržaj fenola u Se-obogaćenom ekstraktu *L. betulinus* je bio veći od onog u neobogaćenom (35.0 odnosno 25.7 μg GAE/mg suvog ekstrakta) i u direktnoj korelaciji sa sposobnošću hvatanja DPPH radikala (R^2 vrednost je bila 0.989 u ekstraktu neobogaćene micelije odnosno 0.957 u Se-obogaćenoj). Se-obogaćeni ekstrakti *G. applanatum* i *G. lucidum* su bili skoro dva puta bogatiji fenolnim jedinjenjima od onih neobogaćenih. Naime, totalni sadržaj fenola u neobogaćenim ekstraktima je bio 14.5 odnosno 12.4 μg GAE/mg suvog ekstrakta, a u Se-obogaćenim 34.9 odnosno 18.1 μg GAE/mg suvog ekstrakta i u direktnoj korelaciji sa antioksidativnim kapacitetom (R^2 vrednosti u neobogaćenim ekstraktima *G. applanatum* i *G. lucidum* su bile 0.9958 odnosno 0.9811, a u Se-obogaćenim 0.9947 odnosno 0.9693). Količina produkovanih fenola je samo kod *P. ostreatus* bila veća u neobogaćenim ekstraktima (9.5 u odnosu na 8.9 μg GAE/mg suvog ekstrakta), dok su kod *P. eryngii* i *P. pulmonarius* Se-obogaćeni ekstrakti bili neznatno bogatiji (Tabela 2). Poređenjem efikasnosti ekstrakata micelije vrsta roda *Pleurotus* u hvatanju DPPH

radikala i zastupljenosti fenola u njima uočena je direktna korelacija (R^2 vrednosti su bile od 0.937 do 0.995 u ekstraktima neobogaćene micelije odnosno od 0.977 do 0.999 u Se-obogaćenim ekstraktima). Kao i kod *P. ostreatus*, veći sadržaj fenola u neobogaćenim ekstraktima u odnosu na one Se-obogaćene zabeležen je i kod *T. hirsuta* (12.3 odnosno 8.2 µg GAE/mg suvog ekstrakta). Ekstrakti *F. velutipes*, i to posebno oni Se-obogaćeni, su imali značajnu količinu fenola (14.5 odnosno 9.5 µg/mg suvog ekstrakta) koja je bila u linearnom odnosu sa njihovom efikasnošću u hvatanju radikala (R^2 je bio 0.989 u ekstraktu neobogaćene micelije odnosno 0.957 u onom Se-obogaćenom).

Tabela 2. Sadržaj fenola i flavonoida u ekstraktima micelije proučavanih vrsta makromiceta

Vrste	**Koncentracija fenola (µg GAE/mg suvog ekstrakta)**		**Koncentracija flavonoida (µg QE/mg suvog ekstrakta)**	
	kontrola	**Se-obogaćeni**	**kontrola**	**Se-obogaćeni**
P. eryngii	21.9 ± 3.4	24.2 ± 5.1	2.8 ± 0.7	2.9 ± 0.0
P. ostreatus	9.5 ± 1.2	8.9 ± 0.8	-	-
P. pulmonarius	14.1 ± 1.2	17.9 ± 0.3	-	-
F. velutipes	8.9 ± 1.8	12.9 ± 1.1	-	-
T. hirsuta	12.3 ± 1.1	8.2 ± 1.8	-	-
L. betulinus	25.7 ± 2.1	35.0 ± 5.5	4.3 ± 0.7	5.6 ± 0.6
G. applanatum	14.5 ± 1.4	34.9 ± 6.6	-	-
G. lucidum	12.4 ± 1.0	18.1 ± 0.5	4.6 ± 0.9	4.1 ± 1.1

Za razliku od fenolnih jedinjenja koja su sintetisale sve proučavane vrste makromiceta, flavonoide su produkovali samo *G. lucidum*, *P. eryngii* i *L. betulinus* i to u relativno malim količinama kako u prisustvu tako i u odsustvu Se (Tabela 2). Međutim, direktna korelacija između sposobnosti hvatanja DPPH radikala i zastupljenosti flavonoida u ekstraktima ovih vrsta je bila zabeležena. Tako su dobijene R^2 vrednosti za neobogaćene odnosno Se-obogaćene ekstrakte *G. lucidum* bile 0.977 i 0.987, a za *P. eryngii* u opsegu od 0.958 do 0.990 odnosno od 0.928 do 0.987.

Kako su istakli Saltarelli i dr. (2009) antioksidativna aktivnost se uglavnom bazira na redoks svojstvima fenola koji im omogućavaju da funkcionišu kao redukujući agensi ali i kao donori vodonika. Naime, zahvaljujući prisustvu hidroksilnih grupa koje su donori protona fenolna jedinjenja mogu da reaguju sa slobodnim radikalima transformišući ih u stabilne molekule (Lee i dr., 2007). Povećani antioksidativni kapacitet Se-obogaćene micelije može se objasniti činjenicom da selenomolekuli reaguju sa slobodnim radikalima (•OH, •H) i uspešno ih neutrališu (Shen i dr., 2010). Međutim, Jayakumar i dr. (2008) su otišli još dalje sugerišući da ekstrakti gljiva ispoljavaju antioksidativni efekat na nivou gena uključenih u antioksidativni odbrambeni sistem.

Direktnu zavisnost antioksidativnog kapaciteta od sadržaja fenola potvrdili su brojni rezultati (Chen i dr., 2008; Saltarelli i dr., 2009; Bao i dr., 2010; Kozarski i dr., 2012; Li i dr., 2012). Fenoli su bili odgovorni za visoku antioksidativnu aktivnosti etanolnih ekstrakata *G. lucidum*, *G. atrum* i *G. applanatum* (Saltarelli i dr., 2009; Kozarski i dr., 2012; Li i dr., 2012), ekstrakata plodonosnih tela vrsta roda *Pleurotus* (Yang i dr., 2002; Jayakumar i dr., 2009; Tsai i dr., 2009; Finimundy i dr., 2013), kao i metanolnih ekstrakata neobogaćene i Se-obogaćene micelije *L. edodes* (Turlo i dr., 2010). Turlo i dr. (2010) su istakli da je oko 50% veća koncentracija fenola u Se-obogaćenim ekstraktima rezultat njihovog učešća u detoksifikaciji od selenita. Flavonoidi, i ako nisu prisutni kod mnogih vrsta jestivih i lekovitih gljiva (Karaman i dr., 2009), mogu biti jedni od glavnih nosioca antioksidativne aktivnosti kod vrsta koje ih sintetišu. To su potvrdili Jayakumar i dr. (2009) koji su zabeležili njihove visoke koncentracije u ekstraktima nekih sojeva *P. ostreatus* i linearnu korelaciju između zastupljenosti i antioksidativnog potencijala.

Međutim i neka druga jedinjenja kao što su polisaharidi, proteini, peptidi, amino kiseline, fitosteroli, askorbinska kiselina, nukleotidi i organske kiseline, pojedinačno ili sinergistički, mogu biti nosioci antioksidativne aktivnosti (Chen i dr., 2008). Nasuprot sugestiji Liu i dr. (2010) da jedinjenja velike molekulske mase imaju ograničenu antioksidativnu aktivnost zbog kompleksnih struktura i redukovane sposobnosti prolaska kroz ćelijske membrane, Kozarski i dr. (2012) su pokazali visoku efikasnost polisaharida *G. applanatum* i *G. lucidum* u hvatanju slobodnih radikala što je povezano sa posedovanjem hidroksilnih grupa i sa tendencijom vezivanja za fenolne kiseline.

Visoki nivoi neutralizacije slobodnih radikala ekstraktima polisaharida izolovanih iz ovih vrsta (od 77.5% do 81.9% pri koncentracijama od 1.0 mg/mL do 10.0 mg/mL odnosno 94.8% pri koncentraciji od 2.5 mg/mL) su potvrđeni niskim EC_{50} vrednostima (≤0.1 mg/mL) koje su bile slične onima dobijenim za α-tokoferol i askorbinsku kiselinu (EC_{50}<0.1 mg/mL). Tseng i dr. (2008) su takođe saopštili visoki antioksidativni kapacitet polisaharida izolovanih iz micelije i plodonosnih tela *G. tsugae*. EC_{50} vrednosti polisaharida micelije su se kretale u opsegu od 10.49 mg/mL do 11.22 mg/mL, dok je antioksidativni kapacitet onih iz plodonosnih tela bio čak 100% pri koncentraciji od 20.0 mg/mL, oko 20% veći od vrednosti dobijenih za BHA i α-tokoferol pri istoj koncentraciji (78.1% odnosno 79.2%). Polisaharidi i seskviterpenoidi *F. velutipes* su takođe bili aktivni u neutralizaciji slobodnih radikala (Shi i dr., 2012; Wang i dr., 2012).

4.4. Antifungalna aktivnost

Stepen osetljivosti 14 mikromiceta, među kojima je bilo saproba, biljnih, životinjskih i humanih patogena, na etanolne ekstrakte neobogaćenih i Se-obogaćenih micelija testiranih jestivih i lekovitih vrsta gljiva bio je različit (Tabele 3-5). Analizirani etanolni ekstrakti su imali fungistatički ali ne i fungicidni efekat na 11 testiranih vrsta mikromiceta, dok rast *Cladosporium* sp. i oba prouzrokovača dermatomikoza, *Microsporium gypseum* i *Trichophyton mentagrophytes*, ne samo da nisu inhibirali već su čak i stimulisali. Bazirano na MIC vrednostima etanolnih ekstrakata micelija testiranih makromiceta vidi se da je antifungalni kapacitet opadao sledećim redosledom: *G. applanatum* > *T. hirsuta* > *L. betulinus*, *P. pulmonarius* > *P. eryngii* > *G. lucidum*, *F. velutipes* > *P. ostreatus*.

Ekstrakti Se-obogaćene i neobogaćene micelije *G. applanatum* su pokazali uniformni antifungalni efekat na sve vrste mikromiceta izuzev na *Candida parapsilosis* i *Trichoderma viride* za koje je Se-obogaćen ekstrakt bio dva puta efikasniji. I ako su MIC vrednosti ekstrakata *G. applanatum* i *G. lucidum* bile između 4.0 mg/mL i 16.0 mg/mL, ekstrakti *G. applanatum* su bili znatno aktivniji (Tabela 3). Tako, dok su ekstrakti *G. lucidum* pri koncentraciji od 4.0 mg/mL inhibirali rast jedino *C. albicans*,

ekstrakti *G. applanatum* na toj koncentraciji su pokazali isti efekat na *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Candida* spp., *F. verticilloides* i *T. viride*.

MIC vrednosti ekstrakata Se-obogaćene i neobogaćene micelije *L. betulinus* su bile identične za sve testirane mikromicete izuzev za *A. fumigatus*, *A. niger* i *T. viride* za koje su bile dva puta niže u prisustvu Se (Tabela 4). Kod ekstrakata *T. hirsuta* takođe je zabeležena ista efikasnost protiv većine proučavanih mikrogljiva, dok su protiv *A. strictum*, *A. flavus*, *C. krusei* i *F. verticillioides* aktivniji bili neobogaćeni ekstrakti. Poređenjem MIC vrednosti, pokazalo se da je antifungalni potencijal ekstrakata *T. hirsuta* i *L. betulinus* protiv proučavanih vrsta mikromiceta gotovo identičan (MIC vrednosti su bile 4.0 mg/mL ili 8.0 mg/mL) izuzev u slučaju *A. fumigatus* i *A. niger* kada je ekstrakt *L. betulinus* bio dva puta slabiji antifungalni agens (MIC su bile 16.0 mg/mL odnosno 32.0 mg/mL). *C. albicans* je bila najosetljivija i dobijena MIC ekstrakata je bila 4.0 mg/mL.

Prisustvo Se u miceliji proučavanih vrsta roda *Pleurotus* skoro nije imao nikakav efekat na antifungalnu aktivnost ekstrakata (Tabela 5). Tako, kod *P. ostreatus* MIC vrednosti i Se-obogaćenih i neobogaćenih ekstrakata su bile identične za sve proučavane vrste mikromiceta. Međutim, duplo veća MIC Se-obogaćenog ekstrakta *P. eryngii*, u poređenju sa neobogaćenim, je dobijena za *A. flavus* i *F. verticillioides* (16.0 mg/mL odnosno 8.0 mg/mL) kao i za *T. viride* (8.0 mg/mL odnosno 4.0 mg/mL). Nasuprot *P. eryngii*, ekstrakt Se-obogaćene micelije *P. pulmonarius*, u koncentraciji od 4.0 mg/mL, je značajno inhibirao rast samo *F. verticillioides*. Poređenjem efikasnosti testiranih ekstrakata, *P. pulmonarius* je bila najefikasnija sa MIC od 4.0 mg/mL za 5 vrsta mikromiceta, dok su ekstrakti druge dve vrste pri istoj koncentraciji inhibirale rast samo *T. viride*.

U slučaju *F. velutipes*, MIC Se-obogaćenih ekstrakata su bile niže, izuzev za C. *albicans*, gde je neobogaćeni ekstrakt bio dva puta efikasniji i za *A. strictum* i *T. viride* gde je aktivnost obogaćenih i neobogaćenih ekstrakata bila ista (Tabela 4). Najosetljivije vrste su bile *C. krusei* i *C. parapsilosis*, sa MIC ekstrakta obogaćene micelije od 2.0 mg/mL, dok su najrezistentnije bile *A. fumigatus* i *A. niger* čiji je rast bio inhibiran samo pri koncentraciji neobogaćenog odnosno Se-obogaćenog ekstrakta od 32.0 mg/mL i 16.0 mg/mL.

Tabela 3. Antifungalna aktivnost etanolnih ekstrakata neobogaćene i Se-obogaćene micelije *Ganoderma applanatum* i *G. lucidum* (MIC i MFC) i komercijalnog antimikotika.

Testirane mikromicete	*Ganoderma applanatum*				*Ganoderma lucidum*				Ketokonazol	
	MIC (mg/mL)		MFC (mg/mL)		MIC (mg/mL)		MFC (mg/mL)			
	kontrola	Se-obogaćeni	kontrola	Se-obogaćeni	kontrola	Se-obogaćeni	kontrola	Se-obogaćeni	MIC (mg/mL)	MFC (mg/mL)
Acremonium strictum W. Gams	8.0	8.0	-	-	8.0	8.0	-	-	7.8	15.6
Aspergillus flavus Link	4.0	4.0	-	-	8.0	8.0	-	-	7.8	7.8
Aspergillus fumigatus Fresen.	4.0	4.0	-	-	16.0	16.0	-	-	7.8	15.6
Aspergillus niger Teigh.	16.0	16.0	-	-	16.0	16.0	-	-	15.6	31.3
Aspergillus terreus Trom	8.0	8.0	-	-	8.0	8.0	-	-	15.6	31.3
Candida albicans (C.P.Robin) Berkhout	4.0	4.0	-	-	4.0	4.0	-	-	7.8	15.6
Candida krusei (Castell.) Berkhout	4.0	4.0	-	-	8.0	8.0	-	-	7.8	15.6
Candida parapsilosis (Ashford) Langeron & Talice	8.0	4.0	-	-	8.0	8.0	-	-	7.8	15.6
Cladosporium sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	1.9	3.9
Fusarium verticilloides (Sacc.) Nirenberg	4.0	4.0	-	-	8.0	8.0	-	-	15.6	15.6
Microsporum gypseum (E. Bodin) Guiart & Grigoraki	-	-	-	-	-	-	-	-	1.9	3.9
Penicillium funiculosum Thom	8.0	8.0	-	-	8.0	8.0	-	-	3.9	7.8
Trichoderma viride Pers.	8.0	4.0	-	-	8.0	8.0	-	-	3.9	7.8
Trichophyton mentagrophytes (C.P.Robin) Sabour.	-	-	-	-	-	-	-	-	1.9	3.9

Tabela 4. Antifungalna aktivnost etanolnih ekstrakata neobogaćene i Se-obogaćene micelije *Flammulina velutipes*, *Trametes hirsuta* i *Lenzites betulinus* (MIC i MFC) i komercijalnog antimikotika.

Testirane mikromicete	*Flammulina velutipes*				*Trametes hirsuta*				*Lenzites betulinus*				Ketokonazol	
	MIC (mg/mL)		MFC (mg/mL)		MIC (mg/mL)		MFC (mg/mL)		MIC (mg/mL)		MFC (mg/mL)		MIC (mg/mL)	MFC (mg/mL)
	kontrola	Se-obogaćeni	kontrola	Se-obogaćeni	kontrola	Se-obogaćeni	kontrola	Se-obogaćeni	kontrola	Se-obogaćeni	kontrola	Se-obogaćeni		
Acremonium strictum W. Gams	4.0	4.0	-	-	4.0	8.0	-	-	8.0	8.0	-	-	0.0078	0.0156
Aspergillus flavus Link	8.0	4.0	-	-	4.0	8.0	-	-	4.0	4.0	-	-	0.0078	0.0078
Aspergillus fumigatus Fresen.	32.0	16.0	-	-	8.0	8.0	-	-	32.0	16.0	-	-	0.0078	0.0156
Aspergillus niger Teigh.	32.0	16.0	-	-	8.0	8.0	-	-	16.0	8.0	-	-	0.0156	0.031
Aspergillus terreus Trom	16.0	8.0	-	-	8.0	8.0	-	-	8.0	8.0	-	-	0.0156	0.031
Candida albicans (C.P.Robin) Berkhout	8.0	16	-	-	4.0	4.0	-	-	4.0	4.0	-	-	0.0078	0.0156
Candida krusei (Castell.) Berkhout	8.0	2.0	-	-	4.0	8.0	-	-	4.0	4.0	-	-	0.0078	0.0156
Candida parapsilosis (Ashford) Langeron & Talice	16.0	2.0	-	-	8.0	8.0	-	-	4.0	4.0	-	-	0.0078	0.0156
Cladosporium sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0019	0.0039
Fusarium verticilloides (Sacc.) Nirenberg	8.0	4.0	-	-	4.0	8.0	-	-	8.0	8.0	-	-	0.0156	0.0156
Microsporum gypseum (E. Bodin) Guiart & Grigoraki	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0019	0.0039
Penicillium funiculosum Thom	8.0	4.0	-	-	8.0	8.0	-	-	8.0	8.0	-	-	0.0039	0.0078
Trichoderma viride Pers.	8.0	8.0	-	-	8.0	8.0	-	-	8.0	4.0	-	-	0.0039	0.0078
Trichophyton mentagrophytes (C.P.Robin) Sabour.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0019	0.0039

Tabela 5. Antifungalna aktivnost etanolnih ekstrakata neobogaćene i Se-obogaćene micelije *Pleurotus eryngii*, *P. ostreatus* i *P. pulmonarius* (MIC i MFC) i komercijalnog antimikotika.

Testirane mikromicete	*Pleurotus ostreatus*				*Pleurous eryngii*				*Pleurotus pulmonarius*				Ketokonazol	
	MIC (mg/mL)		MFC (mg/mL)		MIC (mg/mL)		MFC (mg/mL)		MIC (mg/mL)		MFC (mg/mL)			
	kontrola	Se-obogaćeni	kontrola	Se-obogaćeni	kontrola	Se-obogaćeni	kontrola	Se-obogaćeni	kontrola	Se-obogaćeni	kontrola	Se-obogaćeni	MIC (mg/mL)	MFC (mg/mL)
Acremonium strictum W. Gams	8.0	8.0	-	-	8.0	8.0	-	-	4.0	4.0	-	-	0.0078	0.0156
Aspergillus flavus Link	8.0	8.0	-	-	8.0	16.0	-	-	4.0	4.0	-	-	0.0078	0.0078
Aspergillus fumigatus Fresen.	8.0	8.0	-	-	8.0	8.0	-	-	4.0	4.0	-	-	0.0078	0.0156
Aspergillus niger Teigh.	32.0	32.0	-	-	8.0	8.0	-	-	16.0	16.0	-	-	0.0156	0.031
Aspergillus terreus Trom	32.0	32.0	-	-	8.0	8.0	-	-	16.0	16.0	-	-	0.0156	0.031
Candida albicans (C.P.Robin) Berkhout	16.0	16.0	-	-	8.0	8.0	-	-	8.0	8.0	-	-	0.0078	0.0156
Candida krusei (Castell.) Berkhout	8.0	8.0	-	-	8.0	8.0	-	-	4.0	4.0	-	-	0.0078	0.0156
Candida parapsilosis (Ashford) Langeron & Talice	16.0	16.0	-	-	8.0	8.0	-	-	8.0	8.0	-	-	0.0078	0.0156
Cladosporium sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0019	0.0039
Fusarium verticilloides (Sacc.) Nirenberg	8.0	8.0	-	-	8.0	16.0	-	-	8.0	4.0	-	-	0.0156	0.0156
Microsporum gypseum (E. Bodin) Guiart & Grigoraki	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0019	0.0039
Penicillium funiculosum Thom	8.0	8.0	-	-	8.0	8.0	-	-	4.0	4.0	-	-	0.0039	0.0078
Trichoderma viride Pers.	4.0	4.0	-	-	4.0	8.0	-	-	8.0	8.0	-	-	0.0039	0.0078
Trichophyton mentagrophytes (C.P.Robin) Sabour.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0019	0.0039

Osetljivost testiranih vrsta mikromiceta na komercijalni antimikotik, ketokonazol, je bila mnogo veća. Tako, najniža analizirana koncentracija ketokonazola od 0.0019 mg/mL je bila MIC za *Cladosporium* sp., *M. gypseum* i *T. mentagrophytes*, dok je koncentracija od 0.0039 mg/mL bila MIC za *Penicillium funiculossum* i *T. viride* a MFC za *Cladosporium* sp., *M. gypseum* i *T. mentagrophytes*. Rast micelije *A. strictum*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. krusei* i *C. parapsilosis* je bio inhibiran pri koncentraciji ketokonazola od 0.0078 mg/mL koja je takođe bila i MFC za *A. flavus*, *P. funiculosum* i *T. viride*. Koncentracija od 0.0156 mg/mL je bila MIC za *A. niger*, *A. terreus* i *F. verticillioides* a MFC za većinu testiranih vrsta, dok je 0.0313 mg/mL imala fungicidni efekat na *A. niger* i *A. terreus* (Tabele 3-5). Negativna korelacija između koncentracija ekstrakata i komercijalnog antimikotika su zabeležene kod *Cladosporium* sp., *M. gypseum* i *T. mentagrophytes* koje su bile rezistentne na ekstrakte testiranih makromiceta ali najosetljivije na ketokonazol. Razlike u rastu micelije između negativne kontrole i 5% DMSO nisu zabeležene.

Ova skoro ujednačena antifungalna aktivnost ekstrakata neobogaćenih i Se-obogaćenih micelija proučavanih makromiceta može se objasniti sličnim sadržajem polifenolnih jedinjenja (Finimundy i dr., 2013). Fenoli uključujući i flavonoide su jedni od nosioca antimikrobne aktivnosti u ekstraktima jestivih i lekovitih vrsta gljiva pošto inhibiraju klijanje spora (Tim Cushnie i Lamb, 2005). Antimikrobni potencijal polifenola baziran je na prisustvu visoko reaktivnih hidroksilnih grupa kao i drugih delova prstena koji imaju visok afinitet za vezivanje za proteine čime inhibiraju enzimske reakcije mikroorganizma (Havsteen, 1983). Antifungalna aktivnost polifenola ne zavisi samo od strukture već i od polarnosti molekula, naime nedostatak polarnih grupa povećava njihovu lipofilnost što olakšava njihovu difuziju kroz ćelijsku membranu mikroorganizma (Picman i dr., 1995; Barron i Ibrahim, 1996). Međutim, kod nekih vrsta gljiva, na primer kod *Laetiporus sulphureus*, nema pozitivne korelacije između sadržaja polifenolnih jedinjenja i antimikrobnog efekta njihovih ekstrakata (Karaman i dr., 2010).

Dosadašnja istraživanja akcenat su stavljala na proučavanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata plodonosnih tela ili iz njih izolovanih jedinjenja. Nasuprot odsustvu antifungalne aktivnosti ekstrakata plodonosnih tela *G. capense* (Ngai i Ng, 2004), vodeni i metanolni ekstrakti bazidiokarpa *G. lucidum* su se karakterisali značajnom

efikasnošću protiv *A. niger* i *Mucor mucedo* (Sridhar i dr., 2011). Posebno aktivna jedinjenja su bila seskviterpenoidi, ganoderična kiselina i ganomicini, izolovani iz plodonosnih tela *G. atrum* i *G. pfeifferi*, kao i ganodermin iz *G. lucidum* čije su IC_{50} vrednosti za *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* i *Physalospora piricola* bile 15.2 µM, 12.4 µM odnosno 18.1 µM (Saltarelli i dr., 2009; Li i dr., 2012). Za razliku od ekstrakata vrsta roda *Pleurotus* koji ili nemaju nikakvu antimikrobnu aktivnost ili je ona neznatna (Li i dr., 2008), peptidi pleurostrin i eringin izolovani iz plodonosnih tela *P. ostreatus* i *P. eryngii* značajno su inhibirali rast *F. oxysporum* i *Mycosphaerella arachidicola* (Chu i dr., 2005). Nasuprot njima, terpenoidi (enokipodini F, G i I) izolovani iz micelije *F. velutipes* su pokazali slab antifungalni efekat protiv *A. fumigatus* i potpuno odsustvo aktivnosti protiv *C. albicans* (Wang i dr., 2012). Međutim, etanolni ekstrakt posebno Se-obogaćene micelije *F. velutipes* HAI 966 su bili mnogo efikasniji u inhibiciji rasta *Candida* spp. od ekstrakata soja korišćenog u proučavanjima Wang i dr. (2012).

Mada se ekstrakti micelije proučavanih vrsta makromiceta ne mogu pohvaliti dobrom antifungalnom aktivnošću, njihova istraživanja se trebaju nastaviti u pravcu izolovanja i karakterisanja jedinjenja i testiranja njihovog potencijala.

4.5. Citotoksični potencijal

Ekstrakti proučavanih vrsta su pokazali nisku citotoksičnu aktivnost i protiv HeLa i LS174 ćelija u poređenju sa citostatikom *cis*-DDP koji je korišćen kao pozitivna kontrola (Tabela 6). Na osnovu IC_{50} vrednosti najaktivniji protiv HeLa ćelija su bili etanolni ekstrakti i Se-obogaćene i neobogaćene micelije *T. hirsuta* (116.3 µg/mL odnosno 191.4 µg/mL) kao i Se-obogaćene micelije *G. applanatum* (192.9 µg/mL), dok je protiv LS174 ćelija najefikasniji bio neobogaćeni ekstrakt *P. eryngii* (196.1 µg/mL). Citotoksični efekat na HeLa i LS174 ćelije nisu imali neobogaćeni ekstrakt *P. pulmonarius* i Se-obogaćeni ekstrakt *P. ostreatus*, dok neobogaćeni ekstrakt *G. lucidum* nije delovao na LS174 ćelije (>400.0 µg/mL). Testirani ekstrakti *T. hirsuta* i *G. applanatum* su imali znatno niži efekat na LS174 ćelije, kao što su ekstrakti *P. eryngii* bili manje efikasni u zaustavanju proliferacije HeLa ćelija (Tabela 6). Ekstrakti *P. ostreatus* i *P. pulmonarius*, i to posebno Se-obogaćeni, su bili znatno slabiji citotoksični

agensi, naročito protiv HeLa ćelija za koje su se njihove IC_{50} vrednosti kretale od 333.2 µg/mL do čak >400.0 µg/mL. Nizak citostatički efekat je takođe zabeležen i za neobogaćeni i Se-obogaćeni ekstrakt *L. betulinus*, posebno na LS174 ćelije za koje su IC_{50} bile visoke, 379.61 µg/mL odnosno 398.72 µg/mL. IC_{50} ekstrakta neobogaćene micelije *F. velutipes* za HeLa i LS174 ćelije su bile 259.7 µg/mL odnosno 338.5 µg/mL, za čak 360 odnosno 130 puta veće od onih dobijenih za *cis*-DDP (0.62 µg/mL odnosno 2.57 µg/mL) (Tabela 6).

Tabela 6. Citotoksična aktivnost etanolnih ekstrakata neobogaćene i Se-obogaćene micelije testiranih makromiceta i komercijalnog citostatika protiv HeLa i LS174 ćelijskih linija (IC_{50})

	IC_{50} (µg/mL)			
	HeLa		**LS174**	
	kontrola	**Se-obogaćeni**	**kontrola**	**Se-obogaćeni**
P. eryngii	251.3 ± 3.6	335.5 ± 1.8	196.1 ± 2.8	325.9 ± 3.5
P. ostreatus	396.2 ± 1.5	>400.0	381.4 ± 1.2	>400.0
P. pulmonarius	>400.0	333.2 ± 2.5	>400.0	286.8 ± 1.8
F. velutipes	259.7 ± 0.7	331.9 ± 0.5	338.5 ± 0.9	348.5 ± 0.3
T. hirsuta	191.4 ± 1.6	116.3 ± 2.3	303.0 ± 2.6	275.4 ± 0.9
L. betulinus	345.4 ± 1.4	359.9 ± 1.3	379.6 ± 1.4	398.7 ± 3.4
G. applanatum	273.1 ± 1.3	192.9 ± 2.0	231.4 ± 0.5	242.1 ± 1.7
G. lucidum	356.2 ± 2.5	284.3 ± 3.6	>400.0	316.0 ± 1.9
cis-DDP	0.62 ± 0.11		2.57 ± 0.27	

Mada su brojna biološki aktivna jedinjenja (različiti tipovi seskviterpena, polisaharidi, β-D-glukoprotein kompleksi, proteini, lektini, masne kiseline, fenolna jedinjenja, steroidi i steroli) izolovana iz micelije i plodonosnih tela proučavanih makromiceta (Leung i dr., 1997; Ng i Wang, 2004; Chen i dr., 2008; Li i dr., 2008; Saltarelli i dr., 2009; Tong i dr., 2009; Wang i dr., 2012; Yang i dr., 2012; Finimundy i dr., 2013; Yi i dr., 2013), citotoksični potencijal njihovih ekstrakata micelije protiv HeLa, LS174 i ćelija leukemije miša (RAW264.7) je bio veoma nizak (Li i dr., 2012).

Kod većine proučavanih vrsta obogaćivanje micelije Se izazivalo je dodatno smanjenje aktivnosti protiv HeLa i LS174 ćelija. Međutim, ekstrakti ovih vrsta kao i njihova pojedinačna jedinjenja su imali jak antiproliferativni efekat na druge ćelijske linije. Tako su Jayakumar i dr. (2009) zabeležili *in vivo* inhibiciju rasta tumora ekstraktima *P. florida*, a Finimundy i dr. (2013) visoku aktivnost ekstrakata *P. sajor-caju* protiv Hep-2 i HeLa ćelijskih linija. Rastvorljivi homopolisaharidi, izolovani iz plodonosnih tela *F. velutipes*, bili su veoma efikasni u regresiji Sarcoma-180 ćelija *in vivo* a heteropolisaharidi u zaustavljanju proliferacije ćelija kancera pluća (A549) i želudca (BGC-823) (Leung i dr., 1997; Yang i dr., 2012). Seskviterpenoidi ove vrste su imali umerenu citostatičku aktivnost protiv ćelijskih linija humanog kancera jetre (HepG2), dojke (MCF-7), želudca (SGC7901) i A549 (Wang i dr., 2012), dok su steroli izazivali visoku stopu inhibicije (57%) ćelija humanog glioma (U251) (Yi i dr., 2013). Citostatički potencijal lektina izolovanog iz ekstrakta plodonosnih tela *G. capense* protiv splenocita miša, ćelija leukemije (L1210 i M1) i HepG2 je bio čak viši od aktivnosti komercijalnog proizvoda konkavalina A (Ngai i Ng, 2004).

Ekstrakti micelije i bazidiokarpa kao i pojedinačnih jedinjenja gljiva baziraju svoj citotoksični efekat na jednom od tri do sada opisana mehanizma: (1) proliferaciji B-ćelija ili/i T-ćelija (Chen i dr., 2008; Saltarelli i dr., 2009); (2) aktivaciji imunog sistema i na taj način produkciji γ-interferona sa antiproliferativnim efektom na ćelije tumora (Chang i dr., 2010) i (3) inaktivaciji ribozoma (Ng i Wang, 2004). Međutim, bez obzira na mehanizam citotoksične aktivnosti, rezultat tretmana ekstraktima i/ili jedinjenjima jestivih i lekovitih gljiva su promena morfologije ćelija tumora, redukcija njihove veličine i regulacija balansa između proliferacije i apoptoze (Li i dr., 2008; Tong i dr., 2009; Finimundy i dr., 2013).

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Prisustvo Se u medijumu u inicijalnim koncentracijama od 300.0, 700.0, 1000.0 i 1300.0 µg/L uticalo je na prinos biomase micelije i stepen apsorpcije tokom tečne kultivacije:
  - obogaćivanje medijuma Se u odabranim koncentracijama imalo je inhibitorni efekat na prinos biomase testiranih vrsta u poređenju sa kontrolom;
  - najveća produkcija biomase zabeležena je kod *G. applanatum* i *F. velutipes* kultivacijom u kontrolnom medijumu (27.8 g/L odnosno 25.6 g/L);
  - sposobnost apsorpcije Se je bila u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom u medijumu i zavisila je od vrste;
  - najveću sposobnost apsorpcije Se imali su *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* i *L. betulinus* (u opsegu od 18.1 µg/g do 20.3 µg/g) pri koncentraciji Se od 373.0 µg/L, a najmanju *P. eryngii* i *F. velutipes* (1.4 µg/g odnosno 1.5 µg/g pri koncentraciji Se od 96.0 µg/L).
- Visoke koncentracije Se (od 5.0 mg/L do 10000.0 mg/L) uticale su na produkciju micelije, morfologiju i ultrastrukturu hifa, kao i na kapacitet njegove apsorpcije i akumulacije kod *P. ostreatus*:
  - koncentracije od 5.0, 10.0 i 20.0 mg/L nisu imale efekat na rast micelije, u prisustvu 50.0 mg/L i 100.0 mg/L Se rast je bio slabiji, pri 500.0 mg/L značajno inhibiran, dok je 1000.0 mg/L bila minimalna inhibitorna koncentracija;
  - produkcija biomase je bila najveća u kontroli (11.8 g/L) a sa povećenjem koncentracije Se je opadala, pri koncentraciji od 100.0 mg/L prinos biomase je bio 6.8 g/L a pri 500.0 mg/L produkcija je bila kompletno inhibirana;
  - korelacija između efikasnosti apsorpcije Se i njegove koncentracije u medijumu je odsustvovala, naime, sa povećanjem koncentracije stepen apsorpcije je opadao, od 53.3% pri koncentraciji od 5.0 mg/L do 3.6% pri 100.0 mg/L;

- ❖ količina apsorbovanog Se kretala se u opsegu od 251.2 μg/g (pri koncentraciji od 5.0 mg/L) do 938.9 μg/g (pri koncentraciji od 20.0 mg/L);
- ❖ bela i gusta micelija se formirala i u kontrolnom i u medijumu obogaćenom Se u koncentracijama od 5.0, 10.0, 20.0 i 50.0 mg/L, dok se micelija cigla-crvene boje obrazovala pri koncentracijama od 100.0 mg/L i 500.0 mg/L;
- ❖ tankozidne, hijalinske, granate, anastomozirane hife sa klamp-vezama i dijametrom od 2.00 μm do 5.94 μm su bile karakteristične za kontrolni medijum; šire (3.24 μm i 10.50 μm) i slabije granate hife sa tankim ćelijskim zidom a izraženim ekstracelularnim matriksom i bez uočljivih klamp-veza formirale su se pri koncentraciji od 100.0 mg/L, dok su pri koncentraciji od 500.0 mg/L hife bile kraće, frekventno septirane, prečnika od 4.30 μm do 7.70 μm, sa izraženijim ekstracelularnim matriksom, bez klamp-veza, i obrazovale su karakteristične "namotaje";
- ❖ apsorbovani Se akumulirao se uglavnom u ćelijskoj membrani i u vakuolama, dok su promene na ćelijskom zidu bile neznatne;
- ❖ ćelijski sadržaj se redukovao i nivo redukcije je bio u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom Se, a tamne strukture vidljive i u kontrolnom i u Se-obogaćenom uzorku su bila proteinska tela.

- ➢ Etanolni ekstrakti i neobogaćene i Se-obogaćene micelije svih proučavanih vrsta makromiceta su imali sposobnost neutralizacije DPPH radikala:
  - ❖ na osnovu EC_{50} vrednosti ekstrakata antioksidativni potencijal je opadao sledećim redosledom: *L. betulinus* > *G. lucidum* > *G. applanatum* > *P. pulmonarius* > *P. ostreatus* > *P. eryngii* > *T. hirsuta* > *F. velutipes*;
  - ❖ prisustvo Se u miceliji značajno je povećavalo potencijal neutralizacije DPPH radikala;
  - ❖ nivo hvatanja DPPH radikala bio je u direktnoj korelaciji sa sadržajem fenola koji se kretao od 8.9 μg GAE/mg suvog ekstrakta kod *P. ostreatus* do 35.0 μg GAE/mg suvog ekstrakta kod *L. betulinus* i *G. applanatum*;
  - ❖ flavonoide su produkovali samo *G. lucidum*, *P. eryngii* i *L. betulinus* u relativno malim količinama kako u prisustvu tako i u odsustvu Se;

- Etanolni ekstrakti micelije proučavanih makromiceta imali su fungistatički ali ne i fungicidni efekat na 11 testiranih vrsta mikromiceta, dok su na rast *Cladosporium* sp., *Microsporum gypseum* i *Trichophyton mentagrophytes* delovali stimulativno:
  - bazirano na MIC vrednostima ekstrakata antifungalni kapacitet je opadao sledećim redosledom: *G. applanatum* > *T. hirsuta* > *L. betulinus*, *P. pulmonarius* > *P. eryngii* > *G. lucidum*, *F. velutipes* > *P. ostreatus*;
  - osetljivost testiranih mikromiceta na komercijalni antimikotik, ketokonazol, je bila mnogo veća;
  - negativna korelacija između koncentracija ekstrakata i ketokonazola je zabeležena kod *Cladosporium* sp., *M. gypseum* и *T. mentagrophytes*;
- Etanolni ekstrakti micelije proučavanih vrsta su pokazali nisku citotoksičnu aktivnost i protiv HeLa i protiv LS174 ćelija u poređenju sa citostatikom *cis*-DDP:
  - na osnovu IC_{50} vrednosti najaktivniji protiv HeLa ćelija su bili ekstrakti *T. hirsuta* i Se-obogaćen ekstrakt *G. applanatum*, a protiv LS174 ćelija neobogaćeni ekstrakt *P. eryngii*;
  - neobogaćeni ekstrakt *P. pulmonarius* i Se-obogaćeni ekstrakt *P. ostreatus* nisu imali citotoksični efekat na HeLa i LS174 ćelije, a neobogaćeni ekstrakt *G. lucidum* nije delovao na LS174 ćelije.

6. LITERATURA

Akanmu, D., Cecchini, R., Aruoma, O.I., Halliwell, B. (1991). The antioxidant action of ergothioneine. Archives of Biochemistry and Biophysics, 288: 10-16.

Al-Bakri, G.A., Afifi, U.F. (2007). Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. Journal of Microbiological Methods, 68: 19-25.

Ames, B.N., Shigenage, M.K., Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging (cancer/mutation/endogenous DNA adducts/oxygen radicals). Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 90: 7915-7922.

Andrews, J.M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48: 5-16.

Arthur, J.R. (2000). The glutathione peroxidases. Cellular and Molecular Life Sciences, 57: 1825-1835.

Ashida, S., Sato, R., Sato, M. (2005). Screening of edible plants for reducing activity by monitoring their effects on the oxidation of oxymyoglobin. Food Science and Technology Research, 11: 349-354.

Baggio, CH., Freitas, C.S., Martins, D.F., Mazzardo, L., Smiderle, F.R., Sassaki, G.L., Iacomini, M., Marques, M.C.A., Santos, A.R.S. (2010). Antinociceptive effects of (1/3),(1/6)-linked β-glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius* in models of acute and neuropathic pain in mice: evidence for a role for glutamatergic receptors and cytokine pathways. The Journal of Pain, 11: 965-971.

Bao, H.N.D., Ochiai, Y., Ohshima, T. (2010). Antioxidative activities of hydrophilic extracts prepared from the fruiting body and spent culture medium of *Flammulina velutipes*. Bioresource Technology, 101: 6248-6255.

Barron, D., Ibrahim, R.K. (1996). Isoprenylated flavonoids – a survey. Phytochemistry, 43: 921-982.

Beck, M.A., Shi, Q., Morris, V.C., Levander, O.A. (1995). Rapid genomic evolution of a non-virulent coxsackievirus B3 in selenium-deficient mice results in selection of identical virulent isolates. Nature Medicine, 1: 433-436.

Birringer, M., Pilawa, S., Flohé, L. (2002). Trends in selenium biochemistry. Natural Product Reports, 19: 693-718.

Blois, M.S. (1958). Antioxidant determination by the use of stabile free radical. Nature, 181: 1199-1200.

Bobek, P., Galbavy, S. (2001). Effect of pleuran (b-glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon. British Journal of Biomedical Sciences, 58: 164-168.

Brown, T.A., Shrift, A. (1982). Selenium: toxicity and tolerance in higher plants. Biological Reviews, 57: 59-84.

Brown, K.M., Arthur, J.R. (2001). Selenium, selenoproteins and human health: a review. Public Health Nutrition, 4: 593-599.

Brown, G.D., Denning, D.W., Gow, N.A.R., Levitz, S.M., Netea, M.G., White, T.C. (2012). Hidden Killers: Human Fungal Infections. Science Translational Medicine, 4: 165rv13.

Buchman, A.L., Sohel, M., Moukarzel, A., Bryant, D., Schanler, R., Awal, M., Burns, P., Dorman, K., Belfort, M., Jenden, D.J., Killip, D., Roch, M. (2001). Plasma choline in normal newborns, infants, toddlers, and in very-low-birth-weight neonates requiring total parenteral nutrition. Nutrition, 17: 18-21.

Burk, R.F., Hill, K.E. (2005). Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. Annual Review of Nutrition, 25: 215-235.

Cao, Q.Z., Lin, Z.B. (2006). *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide inhibits the growth of vascular endothelial cell and the induction of VEGF in human lung cancer cell. Life Science, 78: 1457-1463.

Chang, H.M., But, P.P. (1986). Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica. Vol.1. Singapore, World Scientific.

Chang, H.H., Hsieh, Y., Yeh, C.H., Tu, Y.P., Sheu, F. (2010). Oral administration of an Enoki mushroom protein FVE activates innate and adaptive immunity and induces anti-tumor activity against murine hepatocellular carcinoma. International Immunopharmacology, 10: 239-246.

Chen, T., Zheng, W., Wong, Y.S., Yang, F., Bai, Y. (2006). Accumulation of selenium in mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose. Bioresource Technology, 97: 2260-2265.

Chen, Y., Xie, M.Y., Nie, S.P., Li, C., Wang, Y.X. (2008). Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. Food Chemistry, 107: 231-241.

Chu, K.T., Xia, L., Ng, T.B. (2005). Pleurostrin, an antifungal peptide from the oyster mushroom. Peptides, 26: 2098-2103.

Cocchi, L., Vescovi, L., Pertini, L.E., Pertini, O. (2006). Heavy metals in edible mushrooms in Italy. Food Chemistry, 98: 277-284.

Costa-Silva, F., Marques, G., Matos, C.C., Barros, A.I.R.N.A., Nunes, F.M. (2011). Selenium contents of Portuguese commercial and wild edible mushrooms. Food Chemistry, 126: 91-96.

Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents, 26: 343-356.

Daniels, L.A. (2004). Selenium: does selenium status have health outcomes beyond overt deficiency? Medical Journal of Australia, 108: 383-386.

Dernovics, M., Stefanka, Z., Fodor, P. (2002). Improving selenium extraction by sequentive enzymatic process for Se-speciation of selenium-enriched *Agaricus bisporus*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 372: 473-480.

Dhillon, K.S., Dhillon, S.K. (2003). Distribution andmanagement of seleniferous soils. Advances in Agronomy. Academic Press. pp. 119-184.

Doll, R., Peto, R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. Journal of National Cancer Institute, 66: 1191-1308.

Dubost, N.J., Ou, B., Beelman, R.B. (2007). Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. Food Chemistry, 105: 727-735.

Erjavec, J., Kos, J., Ravnikar, M., Dreo, T., Sabotic, J. (2012). Proteins of higher fungi – from forest to application.Cell Press Trends in Biotechnology, 30: 259-273.

Fairweather-Tait, S.J. (1997). Bioavailability of selenium. European Journal of Clinical Nutrition, 51: 20-23.

Fairweather-Tait, S.J. (1999). The importance of trace element speciation in nutritional sciences. Fresenius Journal of Analitical Chemistry, 363: 536-540.

Falandysz, J. (2008). Selenium in edible mushrooms. Journal of Environmental Science and Health C, 26: 256-299.Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G. (2002). Feer radicals, antioxidants and nutrition. Nutrition, 18: 872-879.

Fang, Q.H., Zhong, J.J. (2002). Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. Process Biochemistry, 37: 769-774.

Finimundy, T.C., Gambato, G., Fontana, R., Camassola, M., Salvador, M., Moura, S., Hess, J., Henriques, J.A.P., Dillon, A.J.P., Roesch-Ely, M. (2013). Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising in vitro antitumor activity. Nutrition Research, 33: 76-84.

Finkel, T., Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and biology of ageing. Nature, 408: 239-247.

Finley, J.W. (2006). Bioavailability of selenium from foods. Nutrition Reviews, 64: 146-151.

Flohé, L., Andreesen, J. R., Brigelius- Flohé, R., Maiorino, M., Ursini, F. (2000). Selenium, the element of the Moon, in life on Earth. Life, 49: 411-420.

Fu, M., Lin, J., Wu, Z., Lin, Q., Xie, L. (2003). Screening of proteins anti-tobacco mosaic virus in *Pleurotus eryngii*. Wei Sheng Wu Xue Bao, 43: 29-34.

Fujimoto, H., Nakayama, M., Nakayama, Y., Yamazaki, M. (1994). Isolation and characterization of immunosuppressive components of three mushrooms, *Pisolithus tinctorius*, *Microporus flabelliformis* and *Lenzites betulina*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 42: 694-697.

Gao, Z., Chen, Y., Randlett, M.D., Zhao, X., Findell, J.L., Kieber, J.J., Schaller, G.E. (2003). Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. Journal of Biology Chemistry, 278: 34725-34732.

Garcia, M.E., Blanco, J.L. (2000). Mycosis in domestic animals. Revista Iberoamericana de Micolia, 17: 2-7.

Gerhardsson, L., Oskarsson, A., Skerfving, S. (1994). Acid precipitation- effects on trace elements and human health. Science of Total Environment, 153: 237-245.

Gharieb, M.M., Wilkinson, S.C., Gadd, G.M. (1995). Reduction of selenium oxyanions by unicellular, polymorphic and filamentous fungi: cellular location of reduced

selenium and implications for tolerance. Journal of Industrial Microbiology, 14: 300-311.

Gharieb, M.M., Gadd, G.M. (1998). Evidence for the involvement of vacuolar activity in metal(loid) tolerance: vacuolar-lacking and -defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* display higher sensitivity to chromate, tellurite and selenite. BioMetals, 11: 101-106.

Gharieb, M.M., Gadd, G.M. (2004) The kinetics of 75[Se]-selenite uptake by *Saccharomyces cerevisiae* and the vacuolization response to high concentrations. Mycological Research, 108: 1415-1422.

Goldhaber, S.B. (2003). Trace element risk asasessment: essentiality vs. toxicity. Review. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 38: 232-242.

Gould, A.B. (2004). Plant pathogenic fungi. *In:* Plant Pathology Concepts and Laboratory Exercises. eds. Trigiano, R.N., Windham, M.T., Windham, A.S. pp. 75-89.

Gregori, A., Švagelj, M., Pohleven, J. (2007). Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. Food Technology and Biotechnology, 45: 238-249.

Gu, Y.H., Leonard, J. (2006). *In vitro* effects on proliferation, apoptosis and colony inhibition in E-dependent and ER-independent human breast cancer cells by selected mushroom species. Oncology Reports, 15: 417-423.

Gunde-Cimerman, N., Plemenitas, A., Cimerman, A. (1993). *Pleurotus* fungi produce mevinolin, an inhibitor of HMG CoA reductase. FEMS Microbiology Letters, 113: 333-338.

Gunde-Cimerman, N. (1999). Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. (Agaricales s.l., Basidiomycetes). International Journal of Medicinal Mushrooms, 1: 69-80.

Harman, D. (2001). Aging: overview. Annals of the New York Academy of Sciences, 928: 1-21.

Hartikainen, H. (2005). Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 18: 309-318.

Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. Biochemical Pharmacology, 32: 1141-1148.

Haygarth, P.M. (1994). Global importance and global cycling of selenium. *In*: Selenium in the environment. Eds. Frankenberger, W.T. Benson Sally, New York, USA: Marcel Dekker. pp. 1-28.

Huerta, V.D., Sanchez, M.L.F., Sanz-Medel, A. (2005). Qualitative and quantitative speciation analysis of water soluble selenium in three edible wild mushrooms species by liquid chromatography using post-column isotope dilution ICP–MS. Analytica Chimica Acta, 538: 99-105.

Ikekawa, T., Uehara, N., Maeda, Y., Nakanishi, M., Fukuoka, F. (1969). Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. Cancer Research, 29: 734-735.

Ikekawa, T. (1995). Enokitake, *Flammulina velutipes*: antitumour activity of extracts and polysaccharides. Food Review International, 11: 203-206.

Ikuzawa, M., Oguchi, Y., Matsunaga, K., Toyoda, N., Furusho, T., Fujii, T. (1985). Pharmaceutical preparation containing a glycoprotein. German Patent DE, 3: 429-551.

Ip, C. (1998). Lessons from Basic Research in Selenium and Cancer Prevention. Journal of Nutrition, 128: 1845-1854.

Jang, H., Surh, Y.J. (2003). Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function. Biochemical Pharmacology, 66: 1371-1379.

Jayakumar, T., Philip, A.T., Pitchairaj, G. (2007). Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. Experimental Gerontology, 42: 183-191.

Jayakumar, T., Sakthivel, M., Thomas, P.A., Geraldine, P. (2008). *Pleurotus ostreatus*, an oyster mushroom, decreases the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain. Chemico-Biological Interactions, 176: 108-120.

Jayakumar, T., Thomas, P.A., Geraldine, P. (2009). In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. Innovative Food Science Emerging, 10: 228-234.

Jose, N., Janardhanan, K.K. (2000). Antioxidant and antitumor activity of *Pleurotus florida*. Current Science, 79: 941-943.

Kanatsu, N., Terakawa, H., Nakanishi, K., Watanabe, Y. (1963). Flammulin, a basic protein of *Flammulina velutipes* with antitumour activities. Journal of Antibiotics, 16: 139-143.

Karaca, C.H. (2011). Evaluation of natural antimicrobial phenolic compounds against foodborne pathogens. University of Kentucky, Master's Theses. pp. 652.

Karaman, M., Mimica-Dukić, N.M., Matavulj, M. (2009). Lignicolous fungi from northern Serbia as natural sources of antioxidants. Central European Journal of Biology, 4: 387-396.

Karaman, M., Jovin, E., Malbaša, R., Matavulj, M., Popovic, M. (2010). Medicinal and edible lignicolous fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agents. Phytotherapy Research, 24: 1473-1481.

Kasai, A., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Yao, J., Kitamura, M. (2008). Direct, continuous monitoring of air pollution by transgenic sensor mice responsive to halogenated and polycyclic aromatic hydrocarbons. Environmental Health Perspectives, 116: 349-354.

Kim, S.W., Kim, H.G., Lee, B.E., Hwang, H.H., Baek, D.H., Ko, S.Y. (2006). Effects of mushroom, *Pleurotus eryngii*, extracts on bone metabolism. Clinical Nutrition, 25: 166-170.

Kobayashi, H., Matsunaga, K., Fujii, M. (1993). PSK as a chemopreventive agent. Cancer Epidemiology Biomarkers & Preventation, 2: 271-276.

Korhola, M., Vainio, A., Edelmann, K. (1986). Selenium yeast. Annals of Clinical Research, 18: 65-68.

Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Vrvić, M.M., Todorović, N., Jakovljević, D., Griensven, L.V.J.L.D. (2012). Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. Journal of Food Composition and Analysis, 26: 144-153.

Lee, I.K., Yun, B.S., Cho, S.M., Kim, W.G., Kim, J.P., Ryoo, I.J., Koshino, H., Yoo, I.D. (1996). Betulinans A and B, two benzoquinone compounds from *Lenzites betulina*. Journal of Natural Products, 59: 1090-1092.

Lee, W.Y., Park, Y., Ahn, J.K., Ka, K.H., Oark, S.Y. (2006). Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. Enzyme and Microbial Technology, 40: 249-254.

Lee, Y.W., Park, Y., Ahna, J.K., Ka, K.H., Park, S.Y. (2007). Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. Enzyme and Microbial Technology, 40: 249-254.

Lemly, A.D. (1997). Environmental implications of excessive selenium: a review. Biomedical and Environmental Sciences, 10: 415-435.

Lenz, M., Lenz, P.N.L. (2009). The essential toxin: The changing perception of selenium in environmental sciences. Science of the Total Environment, 407: 3620-3633.

Letavayova, L., Vlasakova, D., Vlckova, V., Brozmanova, J., Chovanec, M. (2008). Rad52 has a role in the repair of sodium selenite-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. Mutation Research, 652: 198-203.

Leung, M.Y.K., Fung, K.P., Choy, Y.M. (1997). The isolation and characterization of an immunomodulatory and anti-tumor polysaccharide preparation from *Flammulina velutipes*. Immunopharmacology, 35: 255-263.

Levander, O. A., Morris, U. S. (1984). Dietary selenium levels needed to maintain balance in North American adults consuming self-selected diets. The American Journal of Clinical Nutrition, 4: 331.

Li, Y.R., Liu, Q.H., Wang, H.X., Ng, T.B. (2008). A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. Biochimica et Biophysica Acta, 1780: 51-57.

Li, W.J., Nie, S.P., Liu, X.Z., Zhang, H., Yang, Y., Yu, Q., Xie, M.Y. (2012). Antimicrobial properties, antioxidant activity and cytotoxicity of ethanol-soluble acidic compounds from *Ganoderma atrum*. Food Chemistry and Toxicology, 50: 689-694.

Limón-Pacheco, J., Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. Mutation research**,** 674: 137-147.

Lindquist, U., Niedermeyer, T.H.J., Jülich, W.D. (2005). The Pharmacological potential of mushrooms. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine, 2: 285-299.

Liu, E., Hjelle, B., Morgan, R., Hecht, F., Bishop, J.M. (1987). Mutations of the Kirsten-ras proto-oncogene in human preleukemia. Nature, 330: 186-188.

Liu, X., Zhou, B., Lin, R., Jia, L., Deng, P., Fan, K., Wang, G., Wang, L., Zhang, J. (2010). Extraction and antioxidant activities of intracellular polysaccharide from *Pleurotus* sp. мycelium. International Journal of Biological Macromolecules, 47: 116-119.

Ma, J.Q., Liu, C.M., Qin, Z.H., Jiang, J.H., Sun, Y.Z. (2011). *Ganoderma applanatum* terpenes protect mouse liver against benzo(α)pyren-induced oxidative stress and inflammation. Environmental Toxicology and Pharmacology, 31: 460-468.

Malinowska, E., Krzyczkowski, W., Herolda, F., Lapienis, G., Slusarczykc, J., Suchocki, P., Kuras, M., Turło, T. (2008). Biosynthesis of selenium-containing polysaccharides with antioxidant activity in liquid culture of *Hericium erinaceum*. Enzyme and Microbial Technology, 44: 334-343.

Manikova, D., Vlasakova, D., Loduhova, J., Letavayova, L., Vigasova, D., Krascsenitsova, E. (2010) Investigations on the role of base excision repair and non-homologous end-joining pathways in sodium selenite-induced toxicity and mutagenicity in *Saccharomyces cerevisiae*. Mutagenesis, 25: 155-162.

Manzi, P., Pizzoferrato, L. (2000). Beta-glucans in edible mushrooms. Food Chemistry, 65: 315-318.

Marrot, L., Jones, C., Perez, P., Meunier, J.R. (2008). The significance of Nrf2 pathway in (photo)-oxidative stress response in melanocytes and keratinocytes of the human epidermis. Pigment Cell Melanoma Research, 21: 79-88.

Mau, J.L., Chao, G.R., Wu, K.T. (2001). Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 5461-5467.

Mau, J.L., Tsai, S.Y., Tseng, Y.H., Huang, S.J. (2005). Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae* Murrill. Food Chemistry, 115: 32-36.

Melgar, M.J., Alonso, J., García, M.A. (2009). Mercury in edible mushrooms and underlying soil: Bioconcentration factors and toxicological risk. Science of the Total Environment, 407: 5328-5334.

Mihailović, B.M. (1996). Selen u ishrani ljudi i zivotinja. Veterinarska komora Srbije. pp. 236.

Milovanović, I., Brčeski, I., Stajić, M., Vukojević, J., Knežević, A. (2013). Potential enrichment of medicinal mushrooms with selenium to obtain new dietary supplements. International Journal of Medicinal Mushrooms, 15: 451-457.

Mizuno, T. (1995). Bioactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushroom fungi. Food Reviews International, 11: 7-21.

Mizuno, T.A. (1996). Development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. Food & Food Ingredients Journal of Japan, 167: 69-85.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, 65: 55-63.

Nassir, F., Moundras, C., Bayle, D., Seroudne, C., Gueux, E., Rock, E., Rayassiguier, Y., Mazur, A. (1997). Effect of selenium deficiency on hepatic lipid and lipoprotein metabolism in the rat. British Journal of Nutrition, 78: 493-500.

Nayana, J., Ajith, T.A., Janardhanan, K.K. (2002). Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities of culinary-medicinal mushroom *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. (Agaricomycetideae). International Journal of Medicinal Mushrooms 4: 329-335.

NCCLS. (1998). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi: proposed standard M38-P.Wayne, Pa.: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Nel, A. (2005). Atmosphere. Air pollution-related illness: effects of particles. Science, 308: 804-806.

Ng, T.B., Wang, H.X. (2004). Flammin and velin: new ribosome inactivating polypeptides from the mushroom *Flammulina velutipes*. Peptides, 25: 929-933.

Ngai, P.H.K., Ng, T.B. (2004). A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and

antiproliferative activity toward tumor cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 314: 988-993.

Ngai, P.H.K., Ng, T.B. (2006). A hemolysin from the mushroom *Pleurotus eryngii*. Applied Microbiology and Biotechnology, 72: 1185-1191.

Nobuyuki, I., Shoji, F., Hiroyuki, T. (1985). Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT and other antioxidants. Critical Reviews in Toxicology, 15: 109-150.

Ohno, M., Abe, T. (1991). Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). Journal of Immunological Methods, 145: 199-203.

Ohtsuka, S., Ueno, S., Yoshikumi, C., Hirose, F., Ohmura, Y., Wada, T., Fujii, T., Takahashi, E. (1973). Polysaccharides having an anticarcinogenic effect and a method of producing them from species of Basidiomycetes. UK Patent.

Orskov, H., Flyvbjerg, A. (2000). Selenium and human health. Lancet, 356: 942-943.

Park, Y.K., Koo, M.H., Ikegaki, M., Contado, J.L. (1997). Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. Arquivos de Biologiae Technologia, 40: 97-106.

Picman, A.K., Schneider, F.E., Piceman, J. (1995). Effect of flavonoides on mycelial growth of *Verticillium albo-atrum*. Biochemical Systematics and Ecology, 23: 683-693.

Poluboyarinova, P.A., Vikhrevaa, V.A., Leshchenkoa, P.P., Aripovskiib, A.V., Likhachevc, A.N. (2009). Elemental selenium formation upon destruction of the organoselenium compound DAFS_25 molecule by growing fungal mycelium. Moscow University Biological Science Bulletin, 64: 164-168.

Ponce de Leon, C.A., Bayon, M.M., Paquin, C., Caruso, J.A. (2002). Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods. Journal of Applied Microbiology, 92: 602-610.

Pryor, W.A. (1991). The antioxidant nutrients and disease prevention - what do we know and what do we need to find out? The American Journal of Clinical Nutrition, 53: 391-393.

Quinche, J.P. (1993). The content of eight trace elements in fruit bodies of *Coprinus comatus*. Mycol. Helvetica, 5: 133-142.

Rayman, M.P. (2000). The importance of selenium to human health. Lancet, 356: 233-241.

Reis, F.S., Barros, L., Martins, A., Ferreira, I.C.F.R. (2012). Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. Food and Chemical Toxicology, 50: 191-197.

Ren, G., Liu, X.Y., Zhu, H.K., Yang, S.Z., Fu, C.X. (2006). Evaluation of cytotoxic activities of some medicinal polypore fungi from China. Fitoterapia, 77: 408-410.

Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swansown, A.B., Hafeman, D.G., Hoekstra, W.G. (1973). Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science, 179: 588-590.

Saltarelli, R., Ceccaroli, P., Iotti, M., Zambonelli, A., Buffalini, M., Casadei, L., Vallorani, L., Stocchi, V. (2009). Biochemical characterisation and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from Central Italy. Food Chemistry, 116: 143-151.

Sánchez-Moreno, C. (2002). Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Food Science and Technology International, 8: 121-137.

Sarker, S.D., Nahar, L., Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. Methods, 42: 321-324.

Sarmadi, B.H., Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. Peptides, 31: 1949-1956.

Serafin-Munoz, H.A., Wrobel, K., Gutierrez-Corona, J.F., Wrobel, K. (2007). The protective effect of selenium inorganic forms against cadmium and silver toxicity in mycelia of *Pleurotus ostreatus*. Mycological Research, 111: 626-632.

Shen, Q., Zhang, B., Xu, R., Wang, Y., Ding, X., Li, P. (2010). Antioxidant activity *in vitro* of the selenium-contained protein from the Se-enriched *Bifidobacterium animalis* 01. Anaerobe, 16: 380-386.

Shi, W.L., Han, H., Chen, G.Z., Chen, X., Hong, Y.K., Chen, L.K., Chen, D., Lu, Z. (2010). Extraction, characterization of the polysaccharide extracts from Se-enriched *G. lucidum* (Se-GLP) and its inhibition against oxidative damage in ischemic reperfusion mice. Carbohydrate Polymers, 80: 774-778.

Shi, M., Yang, Y., Guan, D., Zhang, Y. Zhang, Z. (2012). Bioactivity of the crude polysaccharides from fermented soybean curd residue by *Flammulina velutipes*. Carbohydrate Polymers, 89: 1268-1276.

Shimizu, K., Yamanaka, M., Gyokusen, M., Kaneko, S., Tsutsui, M., Sato, J., Sato, I., Sato, M., Kondo, R. (2006). Estrogen-like activity and prevention effect of bone loss in calcium deficient ovariectomized rats by the extract of *Pleurotus eryngii*. Phytotherapy Research, 20: 659-664.

Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colometric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16: 144-158.

Sivaprakasam, E., Kavitha, D., Balakumar, R., Sridhar, S., Suresh, J. (2011). Antimicrobial activity of whole fruiting bodies of *Trametes hirsuta* (Wulf. Fr.) Pil. against some common pathogenic bacteria and fungus. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research, 3: 219-221

Soković, M., van Griensven, L.J.L.D. (2006) Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. European Journal of Plant Pathology, 116: 211-224.

Spolar, M.R., Schaffer, E.M., Beelman, R.B., Milner, J.A. (1999). Selenium-enriched *Agaricus bisporus* mushrooms suppress 7,12-dimethylbenz(/a)anthracene bioactivation in mammary tissue. Cancer Letter, 138: 145-150.

Sridhar, S., Sivaprakasam, E., Balakumar, R., Kavitha, D. (2011). Evaluation of antibacterial and antifungal activity of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst fruit bodies extracts. World Journal of Science and Technology, 6: 8-11.

Stabnikova, O., Ivanova, V., Larionova, I., Stabnikov, V., Bryszewska, A.M., Lewis, J. (2008). Ukrainian dietary bakery product with selenium-enriched yeast. LWT - food Science and Technology, 41: 890-895.

Stajić, M., Milenković, I., Brčeski, I., Vukojević, J., Duletić-Laušević, S. (2002). Mycelial growth of edible and medicinal oyster mushroom [*Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm.] on selenium-enriched media. International Journal of Medicinal Mushrooms, 4: 241-244.

Stajić, M., Brčeski, I., Wasser, S.P., Nevo, E. (2006). Screening of selenium absorption ability of mycelia of selected *Pleurotus* species. Agro Food Industry High-tech, 17: 33-35.

Stamets, P. (2000). Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten Speed Press, Berkeley, CA. pp. 282-325.

Suhajda, A., Hegoczki, J., Janzso, B., Pais, I., Vereczkey, G. (2000). Preparation of selenium yeasts. Preparation of seleniumenriched *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Trace Element in Medical and Biology, 14: 43-47.

Sun, Q., Zhu, S., Cai, M. (1993). Bioavailability of Se in Se enriched mushroom in rats. Acts Nutrimenta Sinica, 15: 426-431.

Switras, S. (1999). The potential of phytoremediation techniques for selenium removal. Restoration and Reclamation Review, 5: 1-7.

Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., Kováříková, E., Čopíková, J. (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. Carbohydrate Polymers, 76: 548-556.

Šlejkovec, Z., Van Elteren, J.T., Woroniecka, U.D., Kroon, K.J., Falnoga, I., Byrne, A.R. (2000). Preliminary study on the determination of selenium compounds in some selenium accumulating mushrooms. Biological Trace Element Research, 75: 139-155.

Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science, 267: 1456-1462.

Tim Cushnie, T.P., Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents, 26: 343-356.

Tong, H., Xia, F., Feng, K., Sun, G., Gao, X., Sun, L., Jiang, R., Tian, D., Sun, X. (2009). Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. Bioresource Technology, 100: 1682-1686.

Tsai, S.Y., Huang, S.J., Lo, S.H., Wu, T.P., Lian, P.Y., Mau, J.L. (2009). Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. Food Chemistry, 113: 578-584.

Tseng, Y.H., Yang, J.H., Mau, J.L. (2008). Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae*. Food Chemistry, 107: 732-738.

Turkoglu, A., Duru, M.E., Mercan, N., Kivrak, I., Gezer, K. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. Food Chemistry, 101: 267-273.

Turlo, J., Gutkowska, B., Herold, F., Cieslak, M., Kazmierczak-Baranska, J. (2009). Isolation, composition analysis, antioxidant activity and cytotoxicity of selenium-enriched polysaccharide fractions isolated from *Lentinula edodes* mycelial cultures. New Biotechnology, 25: S12.

Turlo, J., Gutkowska, B., Herold, F. (2010). Effect of selenium enrichment on antioxidant activities and chemical composition of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. mycelial extracts. Food and Chemical Toxicology, 48: 1085-1091.

Valentine, J.L. (1997). Environmental occurrence of selenium in waters and related health significance. Biomedical and Environmental Sciences, 10: 292-299.

Voet, D., Voet, J.G. (2004). Biochemistry. 3th ed. John Wiley & Sons.

Wang, H., Ng, T.B. (2004). Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. Peptides, 25: 1-5.

Wang, Y., Bao, L., Liu, D., Yang, X., Li, S., Gao, H., Yao, X., Wen, H., Liu, H. (2012). Two new sesquiterpenes and six norsesquiterpenes from the solid culture of the edible mushroom *Flammulina velutipes*. Tetrahedron, 68: 3012-3018.

Wasser, S.P., Weis, A.L. (1999a). Medicinal properties of substances occurring in higher *Basidiomycete* mushrooms: current perspective. International Journal of Medicinal Mushrooms, 1: 31-62.

Wasser, S.P., Weis, A.L. (1999b). Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycete mushrooms: a modern perspective. Critical Review of Immunology, 19: 65-96.

Wang, Y., Bao, L., Liu, D., Yang, X., Li, S., Gao, H., Yao, X., Wen, H., Liu, H. (2012). Two new sesquiterpenes and six norsesquiterpenes from the solid culture of the edible mushroom *Flammulina velutipes*. Tetrahedron, 68: 3012-3018.

Whanger, P., Vendeland, S., Park, Y.C., Xia, Y. (1996). Metabolism of subtoxic levels of selenium in animals and humans. Annals of Clinical Laboratory Science, 26: 99-113.

White, C., Wilkinson, S.C., Gadd, G.M. (1995). The role of microorganisms in biosorption of toxic metals and radionuclides. International Biodeterioration and Biodegradation, 35: 17-40.

Wiberg, E., Wiberg, N., Holleman, A.F. (2001). Inorganic Chemistry. Elsevier.

Wilburn, R.T., Vonderheide, A.P., Soman, R.S., Caruso, J.A. (2004). Speciation of selenium in the mushrooms *Boletus edulis* by high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry with a collision cell. Applied Spectroscopy, 58: 1251-1255.

Xia, F., Fan, J., Zhu, M., Tong, H. (2011). Antioxidant effects of a water-soluble proteoglycan isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 42: 402-407.

Xu, J., Liu, W., Yao, W., Pang, X., Yin, D., Gao, X. (2009). Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activitiers *in vitro*. Carbohydrate Polymers, 78: 227-234.

Yamaç, M., Bilgili, F. (2006). Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelia cultures of some mushroom isolates. Pharmaceutical Biology, 44: 660-667.

Yan, R. (1987). Treatment of chronic hepatitis B with Wulingdan pill. Journal of Fourth Military Medical College, 8: 380-383.

Yang, J.H., Lin, H.C., Mau J.L. (2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. Food Chemistry, 77: 229-235.

Yang, W., Pei, F., Shi, Y., Zhao, L., Fang, Y., Hu, Q. (2012). Purification, characterization and anti-proliferation activity of polysaccharides from *Flammulina velutipes*. Carbohydrate Polymers, 88: 474- 480.

Yaoita, Y., Yoshihara, Y., Kakuda, R., Machida, K., Kikuchi, M. (2002). New sterols from two edible mushrooms, *Pleurotus eryngii* and *Panellus serotinus*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo), 50: 551-553.

Yen, G.C., Wu, J.Y. (1999). Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. Food Chemistry, 65: 375-379.

Yi, C., Sun, C., Tong, S., Cao, X., Feng, Y., Firempong, C.K., Jiang, X., Xu, X., Yu, J. (2013). Cytotoxic effect of novel *Flammulina velutipes* sterols and its oral bioavailability via mixed micellar nanoformulation. International Journal of Pharmaceutics, 448: 44-50.

Ying, Y., Mao, H., Zong, Y., Wen, H. (1987). Icones of medicinal fungi from China. Beijing: Science Press.

Yoon, S.Y., Kim, Y.S., Lee, C.K., Han, S.S. (1994). Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics. Archives of Pharmacal Research, 17: 438-442.

Yu, M.W., Horng, I.S., Hsu, K.H., Chiang, Y.C., Liaw, Y.F., Chen, C.J. (1999). Plasma selenium levels and risk of hepatocellular carcinoma among men with chronic hepatitis virus infection. American Journal of Epidemiology, 150: 367-374.

Yuan, C., Zhou, M., Shangxi, L., Yi, L. (1996). PSP protects macrophages from lipoperoxide accumulation and foam cell formation caused by oxidatively modified low-density lipoprotein. Atherosclerosis, 124: 171-181.

Zhao, L., Zhao, G., Zhao, Z., Chen, P., Tong, J., Hu, X. (2004). Selenium distribution in a Se-enriched mushroom species of the genus *Ganoderma*. Journal of Agricultural Food Chemistry, 52: 3954-3959.

BIOGRAFIJA

Ivan Milovanović rođen je 27.11.1985. godine u Nišu gde je završio osnovnu školu i gimnaziju. Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Nišu upisao je 2004. godine, smer Biologija sa ekologijom, a diplomirao juna 2009. godine sa prosečnom ocenom 8.5. Doktorske studije upisao je 2009. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Eksperimentalna mikologija. Od januara 2011. angažovan je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Karakterizacija i primena metabolita gljiva i utvrđivanje potencijala novih biofungicida“ (ON173032). Kao istraživač pripravnik na katedri za algologiju, mikologiju i lihenologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu zapošljen je 2011. godine, a 2012. je izabran u zvanje istraživača saradnika.

Dosadašnji naučno-istraživački rad Ivana Milovanovića je iz oblasti mikologije. Objavio je 8 naučnih radova u časopisima međunarodnog značaja i 2 u vodećem časopisu nacionalnog značaja i učestvovao sa 8 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima, što ukupno čini 18 bibliografskih jedinica. Aktivni je član Srpskog biološkog društva, Mikološkog društva Srbije, Srpskog Društvo za zaštitu voda i Journal of Food Science.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани Иван Миловановић

број индекса Б 3801/2009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

“Способност апсорпције селена и биолошка активност екстраката мицелије одабраних врста Basidiomycotina”

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

Потпис докторанда

У Београду, 02.06.2014.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Иван Миловановић

Број индекса Б 3801/2009

Студијски програм Експериментална микологија

Наслов рада "Способност апсорпције селена и биолошка активност екстраката мицелије одабраних врста Basidiomycotina"

Ментори др. Мирјана Стајић и др. Јелена Вукојевић

Потписани Иван Миловановић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, 02.06.2014.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: “Способност апсорпције селена и биолошка активност екстраката мицелије одабраних врста Basidiomycotina” која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

(2.) Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 02.06.2014.

1. Ауторство - Дозвољавате 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. Дозвољавате 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 прераде. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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 прераде. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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.