



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ДЕПАРТМАН ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ



Кристина ТЕШАНОВИЋ

**БИОЛОШКА АКТИВНОСТ И ХЕМИЈСКИ САСТАВ АУТОХТЕНИХ ВРСТА
ГЉИВА *Coprinus comatus* (O.F. Müll.) Pers. Gray, 1797 и
Coprinellus truncorum (Scop.) Redhead, Vilgalys & Monclavo, 2001**

- Докторска дисертација -

Нови Сад, 2017.

Пасветлена

*мам ујакну и мајој Миранки
мајој породици велико хвала!*

Захвалница

Захваљујем се **менторима** др **Маји КАРАМАН**, ванредној професорки Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду, пре свега, што ме је љубазно прихватила као кандидата на докторским академским студијама и др **Борису ПЕЈИНУ**, научном сараднику Одсека за науке о живим системима Института за мултидисциплинарна истраживања (IMSI) Универзитета у Београду, на учешћу и помоћи у изради ове докторске дисертације, који су драгоценим саветима и свеукупним залагањем допринели њеном дизајну.

Посебну захвалност дугујем др **Милану МАТАВУЉУ**, редовном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду у пензији, мом првобитном радном руководиоцу (у контексту израде тезе) који је од самог почетка веровао у мене и помога ми око избора тезе.

Члановима Комисије, редовној професорки др **Мирјани БОГАВАЦ** (председнику Комисије), доценткињи др **Јелени МАРКОВИЋ** (члану Комисије), научном сараднику др **Милану ЖИЖИЋУ** (члану Комисије) и научној сарадници др **Александри НОВАКОВИЋ** (члану Комисије), на корисним сугестијама при писању тезе, као и на добронамерности.

Редовној професорки др **Неди МИМИЦИ-ДУКИЋ**, руководиоцу пројекта ОИ 172058 „Биолошки активни природни производи као потенцијални извори нових лекова и дијететских суплемената“ у оквиру којег је урађен значајан број планираних експеримената, такође, велико хвала.

Без даљњег, посебан допринос овој тези пружили су научна саветница др **Јоана ЗАКШЕВСКА** и научни сарадник др **Милан ЖИЖИЋ**, у делу који се односи на NMR спектроскопију – стога се и њима двома, овим путем, срдечно захваљујем. Такође, захвалила бих се стручном сараднику **Милошу БОКОРОВУ** на помоћи око скенинг електронске микроскопије.

Најлепше хвала и научној саветници др **Станислави ГОРЈАНОВИЋ**, научном сараднику др **Ференцу ПАСТОРУ**, као и научној саветници у пензији др **Десанки СУЖЊЕВИЋ**, за помоћ и подршку око одређивања антиоксидативне активности екстраката поларографском методом НРМС.

На овом месту искрено бих се захвалила и ванредној професорки др **Соњи КАИШАРЕВИЋ**, као и доценткињи др **Јелени МАРКОВИЋ**, на несебичној помоћи око експеримента са ћелијским линијама.

Захваљујем се и доценткињи др **Милени РАШЕТИ** на другарству и помоћи око спектрофотометријских анализа антиоксидативне активности екстраката гљива.

Захвалност дугујем и научној саветници др **Драгици ЈАКОВЉЕВИЋ**, на помоћи при карактеризацији полисахаридних екстраката методом FTIR, колеги **Филипу ШИБУЛУ**, истраживачу сараднику који ми је помогао у идентификацији фенолних профила, као и **Марку КЕБЕРТУ** који ми је помогао у идентификацији биогених елемената.

Овим путем захвалила бих се и свим професорима са Катедре за микробиологију Департмана за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду, редовном професору др **Драгану РАДНОВИЋУ**, ванредној професорки др **Јелици СИМЕУНОВИЋ** и ванредном професору др **Петру КНЕЖЕВИЋУ**, свим колегама из собе бр. 24/IV и лаборанткињи **Санди**, на сарадњи и колегијалности. Колегиници **Елеонори БОШКОВИЋ**, на помоћи око молекуларних анализа, а колегиници **Љиљани ЈАЊУШЕВИЋ** на помоћи око извођења теста анти-ацетилхолинестеразне активности, такође, велико хвала. Посебно се захваљујем пријатељима: Јовани, Миломиру, Александри, Мири, Горану, Дајани, Драгани, Милени, Аци, Снежи, Тамари, Јелени, Марији, Наташи, Милани, Варји и Маји, на несебичној помоћи и исказаној подршци.

Највећу захвалност дугујем **својој Породици**, родитељима **Снежани** и **Драгану**, сестри **Данијели**, баки **Ковиљки**, куми **Зорици** - **другу до корица**, и, наравно, свом великом ослонцу и подршци – веренику **Илији**.

Ујаку Миленку и **мојој Миланки** неизрециво хвала – што су веровали у мене и пружили ми огромну љубав и стога ову дисертацију посвећујем у спомен њима.

Нови Сад, јул 2017.

Кристина Тешановић

Садржај

1.	УВОД	1
2.	ОПШТИ ДЕО	2
2.1.	Царство гљива.....	2
2.2.	Значај гљива за човека.....	3
2.3.	Морфологија гљива.....	4
2.4.	Екологија гљива.....	5
2.5.	Физиологија и метаболизам гљива.....	6
2.6.	Секундарни метаболити.....	8
2.7.	Потопљене културе гљива.....	9
2.8.	Нуклеарно-магнетна спектроскопија (NMR).....	11
2.9.	Скенирајућа електронска микроскопија.....	11
2.10.	HydroхоPerhydroхоMercury(II) Complex - НРМС метода.....	12
2.11.	Слободни радикали и оксидативни стрес.....	12
2.11.1.	Систем антиоксидативне заштите.....	13
2.11.2.	Антиоксидативна активност гљива.....	14
2.12.	Антидијабетогена активност гљиве <i>C. comatus</i>	14
2.13.	Антипролиферативна активност гљива.....	15
2.14.	Антимикробна активност макрогљива.....	16
2.15.	Анти-ацетилхолинестеразна активност.....	16
2.16.	Раздео Basidiomycota.....	16
2.16.1.	Класификација рода <i>Coprinus</i>	17
2.16.2.	Класификација рода <i>Coprinellus</i>	20
2.16.3.	<i>Coprinus comatus</i>	22
2.16.4.	<i>Coprinellus truncorum</i>	24
3.	ЦИЉ РАДА	26
4.	ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	28
4.1.	Узорковање гљива.....	28
4.2.	Изолација и култивација мицелије.....	28
4.3.	Молекуларна идентификација.....	30
4.4.	Припрема екстракта гљива.....	31
4.5.	Утицај ванадијума на метаболизам фосфата анализираних гљива.....	32
4.6.	Скенирајућа електронска микроскопија (SEM) мицелија гљива.....	33
4.7.	Одређивање антирадикалске активности анализираних гљива.....	34
4.7.1.	ОН радикал.....	34
4.7.2.	O ₂ ⁻ радикал.....	35
4.7.3.	NO радикал.....	35
4.7.4.	DPPH радикал.....	35
4.7.5.	ABTS радикал.....	35
4.7.6.	Одређивање антиоксидативног капацитета аскорбил радикала (Asc).....	36
4.8.	Одређивање антиоксидативне активности гљива методом НРМС.....	36
4.8.1.	Метода FRAP.....	37
4.9.	Одређивање антимикробне активности екстракта.....	37
4.10.	Анти-ацетилхолинестеразна активност.....	40
4.11.	Ћелијска култура.....	41
4.12.	Тест вијабилности ћелија.....	42
4.13.	Хемијска карактеризација и квантификација анализираних гљива.....	43
4.14.	Одређивање укупног садржаја фенола.....	43
4.15.	LC-MS идентификација и квантификација фенолних киселина.....	43
4.16.	Одређивање укупног садржаја флавоноида.....	44
4.17.	Одређивање укупног садржаја протеина.....	44

4.18.	Одређивање укупног садржаја угљених хидрата	44
4.19.	FTIR спектроскопија полисахарида	44
4.20.	Планарна хроматографија	44
4.21.	Квалитативна и квантитативна елементарна анализа	45
4.22.	GC-MS идентификација и квантификација масних киселина	45
5.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	46
5.1.	Молекуларна идентификација гљива.....	46
5.2.	Метаболизам фосфата	47
5.3.	Утицај ванадијума на метаболизам фосфата.....	54
5.4.	Утицај натријум-метаванадата (NaVO ₃) на раст мицелије	59
5.5.	SEM.....	60
5.6.	Антирадикалска и антиоксидативна активности екстракта гљива.....	62
5.6.1.	Анти-OH радикалска активност.....	63
5.6.2.	Анти-O ₂ радикалска активност	64
5.6.3.	Анти-NO радикалска активност.....	65
5.6.4.	Анти-DPPH радикалска активност.....	65
5.6.5.	Анти-ABTS радикалска активност.....	66
5.6.6.	Анти- аскорбил (Asc) радикал	68
5.7.	Метода НРМС.....	68
5.7.1.	Метода FRAP	70
5.8.	Антимикробна активност екстракта гљива.....	73
5.8.1.	Антифунгална активност.....	77
5.9.	Анти-ацетилхолинестеразна активност екстракта гљива.....	80
5.10.	МТТ тест вијабилности ћелија HepG2	82
5.11.	МТТ тест вијабилности ћелија Rin-5F	87
5.12.	Хемијска карактеризација и квантитативна анализа гљива	92
5.13.	Укупан садржај фенола	92
5.14.	LC-MS идентификација и квантификација фенолних киселина.....	93
5.15.	Укупан садржај флавоноида.....	100
5.16.	Укупан садржај протеина.....	101
5.17.	Укупан садржај угљених хидрата	102
5.18.	Корелације	104
5.19.	Полисахариди	105
5.20.	Садржај макро елемената	111
5.21.	Квалитативно и квантитативно одређивање биогених елемената	111
5.22.	Масне киселине	113
6.	ЗАКЉУЧАК	116
7.	ЛИТЕРАТУРА	120

Листа слика у тексту

- Слика 2.1 Хифа гљиве представника раздела Basidiomycota са карактеристичним кукастим израштајем (модификовано из Fazenda et al. 2008)
- Слика 2.2 Структура ћелијског зида гљива; β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6) глукан, дужина и начин гранања-глукана (Chan et al. 2009)
- Слика 2.3 Филограм рода *Coprinus* (Hopple & Vilgalys 1999)
- Слика 2.4 Филограм рода *Coprinellus* (Nagy et al. 2011)
- Слика 2.5 Мапа распрострањења врсте *C. comatus*
- Слика 2.6 *C. comatus*
- Слика 2.7 Мапа распрострањења врсте *C. truncorum*
- Слика 2.8 *C. truncorum*
- Слика 4.1 Изолована мицелије врсте *C. comatus* на сладном агару
- Слика 4.2 Потопљене културе гљива *C. comatus* и *C. truncorum*
- Слика 5.1. Крива биомасе лиофилизоване мицелије након периода инкубације од 3 - 35 дана
- Слика 5.2 Крива биомасе лиофилизованог филтрата након периода инкубације 3 - 35 дана
- Слика 5.3 Спектар *C. comatus* мицелије са чврсте подлоге након ресуспензије у експерименталном медијуму
- Слика 5.4. Титрациона крива (Hollander et al. 1981)
- Слика 5.5 Спектар *C. truncorum* мицелије са чврсте подлоге након ресуспензије у експерименталном медијуму
- Слика 5.6 Спектар *C. comatus* А, *C. truncorum* В и екстракта *C. truncorum* С са контролним мерењем
- Слика 5.7 Спектар *C. comatus* експоненцијалној фази у течном медијуму
- Слика 5.8 Спектри *C. comatus* и *C. truncorum* са чврсте подлоге након „изгладњивања“
- Слика 5.9 Спектар *C. comatus* и *C. truncorum* (испрекидана линија) и контроле (пуна линија) у течном медијуму са третманом ванадатом)
- Слика 5.10 Додатно мерење спектра *C. truncorum* са перхлорним екстрактом (црвене боје); Спектар представљен испрекиданим линијама је спектар мицелије са додатим G6P и G1P
- Слика 5.11 ⁵¹V NMR записи за *C. comatus* А и *C. truncorum* В са испирањем
- Слика 5.12 Третман мицелије натријум-метаванадатом (NaVO₃) у потопљеној култури
- Слика 5.13 Кукасти израштаји хифе *C. truncorum* након 21 дана раста мицелије у ферментационом медијуму
- Слика 5.14 Кукасти израштаји хифе *C. comatus* након 21 дана раста мицелије у ферментационом медијуму
- Слика 5.15 Кукасти израштаји хифе *C. comatus* након 21 дана раста мицелије у ферментационом медијуму са додатком ванадијума
- Слика 5.16 Компаративни преглед неутралисања ОН радикала екстракта ПТ, М и Ф потопљених култура
- Слика 5.17 Компаративни преглед неутралисања DPPH радикала екстракта ПТ, М и Ф потопљених култура
- Слика 5.18 Компаративни преглед неутралисања АВТS радикала екстракта ПТ, М и Ф потопљених култура
- Слика 5.19 Поларограми основне струје водоник пероксида (i₀), пре (0) и по додатку б аликвота од по 100 μ L (1-6) хининске киселине концентрације 2 \times 10⁻³ М Инсерт: Зависност процента смањења граничне струје од количине хининске киселине
- Слика 5.20 Компаративни приказ антиоксидативних активности ПТ, М и Ф гљива *C.comatus* и *C.truncorum* одређених НРМС методом.
- Слика 5.21 Компаративни преглед редукционог потенцијала екстракта ПТ и М и Ф потопљених култура
- Слика 5.22 Позиције центриола испитиваних екстракта у односу на примењене тестове
- Слика 5.23 Позиције центриола испитиваних екстракта гљива у односу на испољене МИС и МВС вредности
- Слика 5.24 Вијабилност НерG2 ћелија након 24 h (A-C) и 72 h (D-F) третмана са H₂O екстрактима врсте *C. comatus*
- Слика 5.25 Вијабилност НерG2 ћелија након 24 h (A-C) и 72 h (D-F) третмана са H₂O екстрактима врсте *C. truncorum*
- Слика 5.26 Вијабилност НерG2 ћелија након 24 h (A-C) и 72 h (D-F) третмана са ПСХ екстрактима врсте *C. comatus*
- Слика 5.27 Вијабилност НерG2 ћелија након 24 h (A-C) и 72 h (D-F) третмана са ПСХ екстрактима врсте *C. truncorum*
- Слика 5.28 Вијабилност Rin-5F ћелија након 24 h (A-C) и 72 h (D-F) третмана са H₂O екстрактима врсте *C. comatus*
- Слика 5.29 Вијабилност Rin-5F ћелија након 24 h (A-C) и 72 h (D-F) третмана са H₂O екстрактима врсте *C. truncorum*

Слика 5.30 Вијабилност Rin-5F ћелија након 24 h (A-C) и 72 h (D-F) третмана са ПСХ екстрактима врсте *C. comatus*

Слика 5.31 Вијабилност Rin-5F ћелија након 24 h (A-C) и 72 h (D-F) третмана са ПСХ екстрактима врсте *C. truncorum*

Слика 5.32 Упоредни приказ садржаја фенола у анализираним екстрактима

Слика 5.33 Упоредни приказ укупног садржаја флавоноида у анализираним екстрактима

Слика 5.34 Упоредни приказ укупног садржаја протеина у анализираним екстрактима

Слика 5.35 Упоредни приказ заступљености угљених хидрата у анализираним екстрактима

Слика 5.36 FTIR спектар ПСХ екстракта ПТ *C. truncorum*

Слика 5.37 FTIR спектар ПСХ екстракта Ф *C. truncorum*

Слика 5.38 FTIR спектар ПСХ екстракта М *C. truncorum*

Слика 5.39 FTIR спектар ПСХ екстракта ПТ *C. comatus*

Слика 5.40 FTIR спектар ПСХ екстракта Ф *C. comatus*

Слика 5.41 FTIR спектар ПСХ екстракта М *C. comatus*

Слика 5.42 Садржај масних киселина

Листа табела у тексту

- Табела 2.1 Класификација секундарних биомолекула у односу на биогенетско порекло
- Табела 4.1 Узорковане гљиве, локалитет и шифре у микотеци
- Табела 4.2 Састав ферментационог медијума (Hashimoto et al. 1959)
- Табела 4.3 Тестирани сојеви бактерија
- Табела 5.1. Преглед порекла изолата анализираних екстраката
- Табела 5.2 Антибактеријска активност анализираних узорака
- Табела 5.3 Антифунгална активност анализираних узорака
- Табела 5.4 Дејство антибиотика на анализирани сојеве бактерија
- Табела 5.5 Анти-ацетилхолин естеразна активност
- Табела 5.6 Укупан садржај фенолних једињења у MeOH екстрактима
- Табела 5.7 Укупан садржај фенолних једињења у H₂O екстрактима
- Табела 5.8 Укупан садржај фенолних једињења у EtOH екстрактима
- Табела 5.9 Укупан садржај фенолних једињења у CHCl₃ екстрактима
- Табела 5.10 Укупан садржај фенолних једињења у ПСХ екстрактима
- Табела 5.11 Укупан садржај угљених хидрата у анализираним полисахаридним екстрактима
- Табела 5.12 Кооефицијент корелације укупних садржаја
- Табела 5.13 Елементарна анализа одабраних екстраката
- Табела 5.14 Укупан садржај макроелемената у анализираним гљивама
- Табела 5.15 Укупан садржај микроелемената у анализираним гљивама
- Табела 5.16 Метил-естри масних киселина анализираних гљива

Листа скраћеница

AO	Антиоксидативна (активност)
AP	Антирадикалска (активност)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Аденозин три фосфат
CHCl ₃	Хлороформ
DBB	Diazonium blue B
DMSO	Диметил-сулфоксид
EtOH	Етанол
FTIR	Инфрацрвена спектроскопска метода са Фуријеовом трансформацијом
GPC	Глицерофосфохолин
HPMC	Енг. HydroxoPerhydroxoMercury(II) Complex
M	Мицелија
MBC	Минимална бактерицида концентрација
MeOH	Метанол
MFC	Минимална фунгицидна концентрација
MIC	Минимална инхибиторна концентрација
MUFA	Мононезасићене масне киселине
NADP	Никотинамид аденин динуклеотид
NMR	Нуклеарно магнетна резонантна спрктроскопија
Pi	Неоргански фосфати
Pic	Цитоплазматични (цитослони) фосфати
Piv	Вакуоларни фосфати
PolyP	Полифосфати
PUFA	Полинезасићене масне киселине
SEM	Скенирајућа електронска микроскопија
SFA	Засићене масне киселине
SP	Шећерни фосфати
TTC	2,3,5-трифенил тетразолиум хлорид
UDPG	Уридин дифосфат глукоза
UFA	Укупне незасићене масне киселине
V	Ванадијум
V ⁴⁺	Ванидил
V ⁵⁺	Ванадат
ПТ	Плодно тело
Ф	Филтрат

1. УВОД

Највећи део експерименталних истраживања овог рада изведен је у Лабораторији за микробиологију на Департману за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду (PMF UNS).

Детекција фенола методом LC-MS је урађена на Департману за хемију, биохемију и заштиту животне средине, PMF UNS-а, а детекција масних киселина методом GC-MS на Научном институту за прехранбене технологије (FINS). Квантификација микро и макро елемената урађена је на Институту за низијско шумарство и животну средину, Универзитета у Новом Саду (ILFE). Карактеризација и промене фосфатног и енергетског метаболизма мицелије испитивани су методом NMR-а у лабораторији за NMR испитивања Института за општу и физичку хемију (IOFH). Део испитивања антиоксидативне активности методом НРМС урађен је такође на Институту за општу и физичку хемију, док је анти-аскорбил радикалска активност (методом EPR) урађена на Факултету за физичку хемију и Институту за милтидисциплинарна истраживања (IMSI) - Одсек за науке о живим системима, Универзитета у Београду.

Предмет докторске дисертације чини испитивање биолошке активности и хемијског састава две сродне аутохтоне врсте гљива *Coprinus comatus* (O.F. Müll.) Pers. Gray, 1797 (Agaricaceae) и *Coprinellus truncorum* (Scop.) Redhead, Vilgalys & Monclavo, 2001 (Psathyrellaceae). Обе врсте узорковане су на територији Републике Србије и припадају разделу Basidiomycota, а филогенетски посматрано веома су блиске, тачније до 2001. године су биле сврставане у исту фамилију. Врста *C. comatus* је у Републици Кини позната по лековитим својствима већ хиљадама година, док је врста *C. truncorum* мање изучена и има јако мало или нимало података о њеној биолошкој активности.

Општи део укратко описује значај гљива за човека и садржи преглед литературе.

Експериментални део рада обухвата методе којима се утврђује биолошка активност као и методе детекције и хемијске карактеризације екстраката гљива.

Резултати и дискусија садрже тумачење добијених резултата и њиховог значаја у односу на постојећу литературу.

Закључак указује на потенцијалну медицинску употребу две аутохтоне сродне гљиве *C. comatus* и *C. truncorum*, њихову биоактивност након култивације у потопљеном медијуму, као и друге перспективе код овог типа истраживања.

2. ОПШТИ ДЕО

2.1. Царство гљива

Прве гљиве датирају из ере палеозоица пре око 438 милиона година и представљају бројну групу организама који су због својих специфичних особина сврстани у посебно царство (Regnum Fungi) (Woese *et al.* 1990). У зависности од ћелијске организације гљиве се класификују на квасце (једноћелијске гљивице), плесни (филаментозне микроскопске мицелијске гљиве) и макрогљиве које образују крупна плодна тела видљива голим оком, за које је познато да су се појавиле у пенсилванијском периоду пре око 300 милиона година (Chang & Miles 2004).

Данас је познато преко 100 000 врста гљива, премда се претпоставља да их има 15 пута више. Прецизан број врста се не зна, а процене варирају од 500 хиљада па до 9,9 милиона врста, због чега је генерално прихваћен став да постоји око 1,5 милион врста гљива (Wasser, 2002, Blackwell, 2011). Од укупног броја око 14 хиљада чине макрогљиве. Многе од њих су условно јестиве (50%), део припада јестивим и економски значајним гљивама (14%), а мањи проценат поседује значајна фармаколошка својства (5%), док је до данас регистровано само 1% отровних врста, опасних по људски живот (Chang 1999, Wasser & Weis 1999, Wasser, 2002).

Њихови специфични метаболички путеви омогућили су им способност биосинтезе секундарних метаболита разноврстних хемијских структура, од којих је већина биолошки активна (Vukojević, 2002; Chang & Miles, 2004), па је крај 20. века и почетак 21. века обележен процватом истраживања биолошке активности гљива (Wasser & Weis, 1999; Wasser, 2002; Han *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2007; Liu, 2007; Han *et al.* 2008; Han & Liu, 2009; Lv *et al.* 2009; Ma & Fu 2009; Ferreira *et al.* 2009; Karaman 2009a; Asatiani *et al.* 2010; Ding *et al.* 2010; Li *et al.* 2010; Dotan *et al.* 2011; Orhan & Üstün 2011; Reis *et al.* 2011; Ding *et al.* 2012; Smiderle *et al.* 2013; Cohen *et al.* 2014; Karaman *et al.* 2014).

2.2. Значај гљива за човека

Гљиве од давнина привлаче пажњу људи у различитим цивилизацијама и епохама. Њихова терапеутска својства се помињу још пре око 7000 година у кинеској етномедицини (Hobbs, 1995). Источне земље попут Кине, Јапана и Кореје познатије су по традицији коришћења гљива за разлику од западне цивилизације која је дуго година била под утицајем биљне фармакопеје „*De Materia Medica*“ грчког лекара, фармаколога и ботаничара Диоскорида (Magner, 2005, Lindberg, 2008).

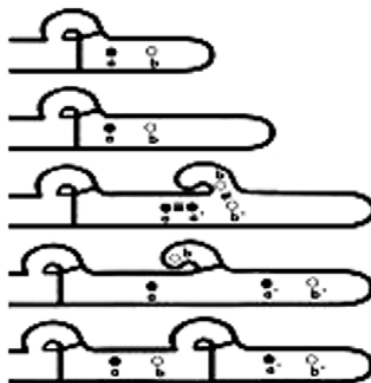
У људској цивилизацији одувек је постојала тежња ка природним средствима за лечење, која би у будућности, поред добро развијене хемијске и фармацеутске индустрије, имала значајну улогу у подизању квалитета и продуживања животног века човека. Гљиве се истичу као један од одличних ресурса биоактивних једињења и својим особинама представљају веома погодан модел за испитивање, а управо су истраживања оваквог типа потребна да би се њихова лековитост научно окарактерисала и евентуално применила у медицинске сврхе. У народној (етно) медицини Далеке Азије сматрају их веома битним у терапији широког спектра обољења (Hobbs, 1995; Lorenzen & Anke 1998; Wasser & Weis, 1999; Powell, 2014). Примера ради, у традиционалној кинеској медицини први писани траг о употреби гљива као антидијабетика потиче из 1550. године (Li *et al.* 2004). Врста *S. comatus* култивише се и у Америци, а последњих година и у Европи углавном у Немачкој, Француској, Холандији и Италији (Chen, 2000). Њена биолошка активност осим у Кини (Cai *et al.* 2004; Han *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2007; Han *et al.* 2009; Zhao *et al.* 2014) проучавана је и у многим другим земљама: Израелу (Asatiani *et al.* 2010;), Судану (Ehssan & Saadabi, 2012), Тајвану (Tsai *et al.* 2009), Румунији (Vamanu, 2014) и Србији (Popović *et al.* 2010, Stojković *et al.* 2013, Tešanović *et al.* 2017).

Сматра се да аутохтоне (самоникле) макрогљиве са подручја Балкана и региона Србије такође представљају одличан извор биоактивних компоненти са терапеутским дејством (Karaman *et al.* 2012a; 2014). Поменуте гљиве утичу на јачање имунитета и општер стања организма - антиоксидативна активност (Karaman *et al.* 2009a, Ferreira *et al.* 2009; Asatiani *et al.* 2010; Li *et al.* 2010; Vaz *et al.* 2011; Cohen *et al.* 2014; Karaman *et al.* 2012a; 2014), помажу у борби против патогених микроорганизама - антимикробна активност (Suay *et al.* 2000; Zenkova *et al.* 2003; Karaman *et al.* 2009b; 2014; Ren *et al.* 2014), дају позитивне ефекте код обољења као што су дијабетес (Han *et al.* 2006; Ding *et al.* 2010; De Silva *et al.* 2012), малигнитет (Wasser, 2003; Cai *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2014), делују хепатопротективно (Popović *et al.* 2010; Powell, 2014) и имају позитивне ефекте у лечењу неуродегеративне Алцхајмерове болести (Alva & Cummings 2008; Gill *et al.* 2009; Barbosa Filho *et al.* 2006; Karaman *et al.* 2009c; Orhan & Üstün 2011).

2.3. Морфологија гљива

Талус односно тело гљиве чини скуп вегетативних ћелија које не формирају права ткива и немају диференциране органе у физиолошком смислу (Chang, 1999). Талус по величини и саставу може бити: *плазмодијалан* (слузаве гљиве), *једноћелијски* (кваци) и *мицелијски* - филаментозан (плесни и макрогљиве тзв. „више гљиве“).

Мицелијски талус представља вегетативно тело већине гљива које је саграђено од хифа, односно ћелија у виду филамената. Хифе могу бити подељене септама односно могу бити *сегментисане* (присутне углавном код „виших гљива“ раздели: Glomeromycota, Ascomycota и Basidiomycota) или *несегментисане* (код „нижих гљива“ раздели Chytridiomycota и Zygomycota). Код несегментисаних хифа протоплазма слободно струји, док се код сегментисаних хифа на септама, тј. попречним преградама налази једна или више пора, које такође омогућавају несметано струјање протоплазме. Присутне су разлике и између септираних хифа унутар раздела Ascomycota и Basidiomycota. Наиме, код Basidiomycota долази до образовања специфичних структура кукастих израштаја (енг. „clamp connection“) који помажу миграцију једара у хифама (Слика 2.1.).



Слика 2.1 Хифа гљиве представника раздела Basidiomycota са карактеристичним кукастим израштајем (модификовано из Fazenda et al. 2008)

Протоплазма је заштићена ћелијским зидом од полисахарида *хитина*, изузев класе Oomycetes (Regnum Chromista) које данас и не припадају царству гљива (Deacon, 2006). Главне компоненте ћелијског зида се разликују између таксономских група, нпр. макрогљиве Basidiomycota садрже хитин и глукане (Ranković, 2003). Његова улога је у заштити од пуцања мембране услед неповољних хипоосмотских услова средине, литичких ензима, других организама и UV зрачења. Уједно може имати и везујућа места за ензиме који дисахариде и мале пептиде разграђују до мономера, ради проласка кроз ћелијску мембрану. Како хифе имају изражен апикални/вршни раст, ћелијски зид је при врху веома

танак, свега 50 nm (Ranković, 2003). Таксономима су од великог значаја основне карактеристике ћелијског зида и облика хифа.

Код Basidiomycota хифе које изграђују плодно тело гљиве означене су као генеративне, скелетне и везујуће хифе (Corner, 1932; Cunningham, 1954). Директно на хифама могу се развити и споре, специфичне врсте ћелија за репродукцију. Споре су веома битне за идентификацију гљива, с обзиром на то да су величина, облик, боја и број спора важни таксономски карактери/показатељи. Споре се осим директно на мицелији могу образовати и на специјалним ћелијама спорофорима или спорокарпима (структурама које носе репродуктивне споре). Основни делови спорокарпа печуркастих гљива су: lat. *pileus* (клубук, капа), lat. *stipes* (дршка, стабло), lat. *lamella* (ламеле су присутне код неких гљива) и lat. *annulus* (прстен, такође присутан само код неких врста гљива – нпр. *Agaricus*, *Amanita*).

2.4. Екологија гљива

Гљиве су хетеротрофни организми који се одликују потребом за органским извором угљеника. Већина гљива преферира глукозу као главни извор угљеника, међутим постоје врсте које имају способност да као извор угљеника користе малтозу, сахарозу или декстрине (Lilly & Barnett, 1951). Постоје изузеци, односно представници гљива који као извор угљеника усвајају сложене шећере као што су скроб, аминокиселине и масти (Mehrotra, 1951, Wills, 1954). Масне киселине могу да служе као добар извор угљеника за печурке које не усвајају шећере као на пример врста *Leptomitus lacteus* (Lilly & Barnett, 1953). Овај начин асимилације одређених једињења је повезан са екологијом врсте (Lilly & Barnett, 1951; Carlile *et al.* 2001; Chang & Miles, 2004; Deacon, 2006). Гљиве могу веома добро да усвајају и алкоhole са шест или три атома угљеника (нпр. манитол и глицерол), одређене шећерне (нпр. глуконска и глукуронска) или органске киселине (нпр. млечна или јабучна киселина) док алдехиди и кетони за гљиве имају мању нутритивну вредност. Ароматична једињења са шест атома угљеника практично се не усвајају од стране гљива; изузетак представља хининска киселина (Lilly & Barnett, 1951). Поред угљеника, есенцијални елементи за опстанак гљива су: азот, кисеоник, фосфор, калијум, магнезијум, сумпор, манган, бакар, гвожђе, цинк, витамини и слободна вода (Carlile *et al.* 2001; Chang & Miles, 2004; Deacon, 2006).

Гљиве су углавном аеробни организми, мада има представника факултативних и облигативних анаероба који потребну енергију добијају ферментацијом или из мутуалистичких симбиотских односа. Веома су битне у разлагању органске материје, тачније представљају примарне органске редуценте у природи чиме помажу кружењу

материје и протицању енергије. На основу начина добијања хране односно неопходне енергије, гљиве се групишу на (Chang & Miles 2004):

1. *Сапробе* - односно сапротрофне врсте које хранљиве материје добијају углавном од мртве органске материје животињског или биљног порекла. Расту на стељи, воћу, поврћу, животињским остацима или на микробијалној биомаси.
2. *Паразите* - користе живу органску материју (углавном биљака, животиња или гљива).
3. *Симбионте* - образују симбиозе мутуалистичког карактера (углавном са алгама у лишајевима и дрвећем као микоризни симбионти).
4. Прелазне облике:
 - Факултативне сапротрофе - живе на биљним органима, али се под одређеним условима могу настанити и на мртвој органској материји,
 - Факултативни паразити - живе на земљишту као сапроби, али у контакту са биљком домаћином могу довести до заразе и даље наставити да се развијају као паразити.

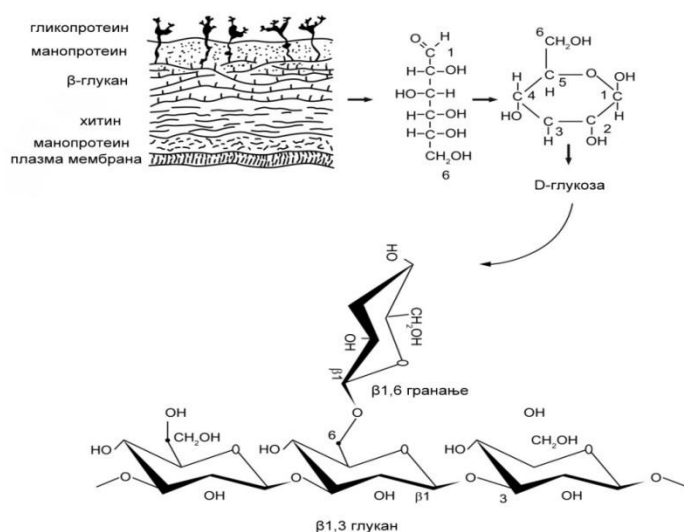
Према потрошњи енергије базираној на методи заснованој на респирацији мицелије установљено је да гљиве имају веома интензиван метаболизам, те се могу сматрати и рекордерима у потрошњи енергије пошто у поређењу са човеком, иста потрошња енергије би се код просечног човека на 20 kg његове тежине сводила на конзумирање 115 kg шећера или 230 kg чоколаде дневно односно количине која је једнака око 2,90 телесне тежине. Тако интензиван метаболизам имају само неке птице које дневно поједу количину хране која премашује њихову тежину 1 до 2 пута (Lilly & Barnett, 1951).

2.5. Физиологија и метаболизам гљива

Поред синтезе примарних метаболита, неопходних за раст и развиће, способне су да продукују додатна различита једињења која су окарактерисана као секундарни метаболити. Они су резултат бројних ензимских реакција које су у корелацији са разноврсним еколошким факторима (Gloer, 1995; Karaman, 2009a), стога гљиве поседују изузетан метаболички потенцијал. Оне су способне да произведу различита биолошки активна једињења као што су полисахариди (Wolf *et al.* 2008; Klaus *et al.* 2011; Ameri *et al.* 2011; You *et al.* 2013), протеини (Xu *et al.* 2011a), полисахаридно-протеински комплекси (Liu, 1999; Cui & Chisti, 2003), липиди (De Silva *et al.* 2012; Ren *et al.* 2012; Mkrtchyan, 2014), али и једињења мање молекулске масе: лектини, лактони (Ng, 2004, Colak *et al.* 2009), терпеноиди, алкалоиди (Zhong & Xiao 2009), стероли (Paoletti, 1989), феноли (Barros *et al.* 2007; Karaman *et al.* 2014) и флавоноиди (Ferreira *et al.* 2009).

Такође имају способност продукције ароматичних органских киселина (Lilly & Barnett, 1951) и дијететских влакана. Дијететским влакнима се сматрају јестиви полисахариди, олигосахариди, лигнини и друге сродне високомолекуларне компоненте које се избацују из људског организма без претходне дигестије, а доприносе правилном функционисању дигестивног тракта (Trowell *et al.* 1976). Садржај дијететских влакана код одређених гљива износи од 2 до 30 g у односу на 100 g суве масе (с.м.) (Manzi *et al.* 2001; Chang & Miles 2004). Што се тиче осталих компоненти највећи садржај код свежих гљива чини вода (75-90%), затим угљени хидрати (око 50% с.м.) и протеини (19-35% с.м.), а најмање масти (1,1-8,3% с.м.). Такође, садрже све есенцијалне аминокиселине потребне човеку, витамине (B1, B2, B7, B3, B5, C, D и провитамин D2,) и минерале (K, Zn, Fe, Mg, Na, P), па се на основу тога могу сматрати здравим намирницама (Chang & Miles, 2004; Mattila *et al.* 2001; Colak *et al.* 2009; Wasser, 2011).

Поред нутритивних особина, за макромолекуле гљива везане су и одређене биолошке активности. Конкретно за полисахариде сматра се да имају учешћа у антитуморској активности, због чега се интензивно ради на карактеризацији и испитивању њиховог фармаколошког потенцијала (Paterson, 2006; Ren *et al.* 2014). По својој хемијској структури биолошки активни полисахариди виших гљива су β -D (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6) глукани (Слика 2.2) који заједно са молекулима хитина, целулозе и гликопротеина чине ћелијски зид виших гљива.



Слика 2.2 Структура ћелијског зида гљива; β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6) глукан, дужина и начин гранања-глукана (Chan *et al.* 2009)

Гљиве имају способност да апсорбују и акумулишу одређене количине микроелемената у својим плодним телима (Kabata-Pendias, 2011, Chang & Miles 2004). Углавном су у питању јони (Au, Ag, As, Br, Cd, Cl, Cs, Cu, Hg, Rb, Se, V и Zn), али могу бити присутни и други елементи (Borovička *et al.* 2006; Falandysz *et al.* 2001). Јони представљају важне кофакторе ензима, а њихово присуство може појачати одређено фармаколошко својство гљиве. Примери за то су врсте које имају способност да усвајају ванадијум (V), метал за који је познато да има антидијабетогено дејство (Crans, 2015) зато што се везују за активна места ензима који метаболишу глукозу и друге шећере. Природно се налази у земљиној кори, има га у човековом окружењу и у микроконцентрацијама је присутан и у његовој исхрани. У човековом организму он се јавља у траговима и токсичан је ако се унесе у већим количинама (преко 10 µg), због чега се не препоручује његова директна употреба као антидијабетика. Међутим одређене гљиве имају способност да га усвајају у облику мање токсичног ванадила, али и ванадата (нпр. врста *Phycomyces blakesleeanus*) (Žižić, 2013) без израженог токсичног дејства на животни циклус саме гљиве, а да при томе она испољава појачано антидијабетогено дејство (Han *et al.* 2006; Ding *et al.* 2012).

Други пример су врсте које апсорбују селен (Se) у више оксидационих облика и могу се сматрати потентним антиоксидансима, обзиром на то да су важни ензими укључени у борбу против оксидативног стреса садрже селен (селен-зависна-глутатион пероксидаза) (Rayman, 2008).

2.6. Секундарни метаболити

У зависности од услова животне средине, физиолошког статуса и генетске предиспозиције, гљиве продукују различите метаболите од којих су најзначајнији антибиотици. Генерално до данас је изоловано и окарактерисано око 4000 секундарних метаболита пореклом од гљива, мада се сматра да их има скоро двоструко више, око 7000 (Hawksworth, 1991). У односу на биогенетско порекло секундарни биомолекули гљива су подељени у следеће категорије (Lorenzen & Anke 1998) (Табела 2.1):

Табела 2.1 Класификација секундарних биомолекула у односу на биогенетско порекло

Секундарни метаболити	Тип једињења	Биолошке и фармаколошке активности
потичу из глукозе:	Полисахариди (β -D-гљукани) Хетерополисахариди (фукогалактан) Гликопротеини (гломалин) Хранљива влакна (хитин) Једињења са ароматичним прстеном:	поседују бројне биолошке и фармаколошке активности од којих је најзначајнија имуномодуларна/ антитуморска (Xu <i>et al.</i> 2011; Zhao <i>et al.</i> 2010)
потичу из шикиматног пута:	Стробилурини Оудемансини Анисалдехид 3-хлоро-анисалдехид и (4-метоксифенил)-1, 2-пропандиол Армиларсин Хинони (омфалон, миценон)	антивирална активност (Lindequist <i>et al.</i> 2005; Paterson, 2006)
потичу из ацетат-малонатног пута:	Полиацетилени (скородонин, агроцибин) Поликетиди (мерулинска киселина, херицени А, В, С)	снажно антивирално деловање (интеракција са вирусним омотачем) (Paterson, 2006)
потичу из ацетат-мевалонатног пута:	Терпени (монотерпени, сесквитерпени, протоилудани, илудани, марасмани, хирсутани, лактарани, секолактарани, изолактарани, терпурани, фоманозини, дитерпени, сестерпени, тритерпени) Стероиди (хебеломична киселина А, В, Е, F)	широк спектар активности: антимикуробна, антивирална, антиинфламаторна, антиоксидативна, антипролиферативна, хепатопротективна, хиполипидемична, хипотензивна активност и нематоцидни ефекат (Cooper <i>et al.</i> 1997)
потичу из аминокиселина:	Пептидне структуре (омфалотин, мускарин, иботенична киселина)	инсектицидна и антивирална активност и нематоцидни ефекат (Varrot <i>et al.</i> 2013)
непознатог биогенетског порекла:	Басидалин Тиромицин Адустин Птерулна киселина Птерулин	антимикуробна активност, антитуморска активност на ћелије леукемије (Ng, 2004; Wang <i>et al.</i> 2014)

2.7. Потопљене културе гљива

Због широког спектра секундарних метаболита које се могу продуковати од стране организма гљиве, незаменљива је употреба гљива у биотехнологији и многим индустријским процесима (Adrio & Demain, 2003; Paragianni, 2004) због чега се гљиве називају „микофабрикама“.

Сматра се да су гљиве које су на вишем еволутивном ступњу способне за сложенији метаболизам/подложне сложенијем метаболизму, а самим тим и производи метаболизма су разноврснији (Lilly & Barnett 1951). За комерцијано узгајање јестивих и лековитих гљива користе се компости од сламе и дрвета, при чему су раније били потребни месеци да се произведе плодно тело гљиве (Solomons, 1975) док су данас ови поступци узгоја упознати тако да се производња плодних тела значајно убрзала (Chang & Miles, 2004).

Ипак, за потребе научних истраживања прибегава се више култивацији мицелије у потопљеним културама (медијим са специфичним саставом), која омогућава да се за релативно кратко време обезбеди значајна количина биомасе или екстрацелуларног продукта у контролисаним лабораторијским условима (Fazenda *et al.* 2008; Elisashvili, 2012). Тако добијена биомаса мицелија или биомаса екстрацелуларних продуката њиховог метаболизма представља уједначен и лако доступан материјал за даља испитивања, употребу у биотехнологији, али и неким индустријским процесима (Adrio & Demain 2003; Paragianni, 2004; Elisashvili, 2012).

Састав медијума и вредности физико-хемијских параметара (pH, температура и аерација) су од пресудног значаја за потопљену култивацију гљива и њихову оптималну производњу биомасе и жељених метаболита (Fazenda *et al.* 2008).

Процењује се да је оптимални температурни опсег за раст/развој мицелије између 24-28°C за већину гљива. Генерално, на температурама изнад 29°C или испод 20°C документован је веома слаб раст мицелије (Chen & Yang 2000; Jang *et al.* 2009). Оптимална температура за култивацију гљива у потопљеној култури може у великој мери варирати између различитих врста и зависи од стимулације производње метаболита од интереса (Elisashvili, 2012).

Аерација и мешање потопљених култура су од великог значаја због адекватног распоређивања хранљивих материја, кисеоника и метаболита у медијуму. Брзина обртаја такође је важан фактор јер превелика брзина може утицати стресно на мицелију, док сувише споро мешање може изазвати слаб проток кисеоника у медијуму. Према истраживањима Yang & Liao (1999), оптимална брзина ротације за производњу биомасе је 100 обртаја/min на лабораторијској тресилици, док је 150 обртаја/min оптимално за производњу егзополисахарида. Због хомогеног састава течног медијума, његов pH има важну улогу при култивацији. Иницијални оптимални pH би требало да буде око 6,5 када се има за циљ већи принос биомасе (Yang & Liao 1999; Jang *et al.* 2009).

Познато је да се хемијски састав гљива разликује код дивље растућих или култивисаних плодних тела гљива - мицелија и ферментационог медијума потопљених култура (Smith *et al.* 2015). Раст у потопљеном медијуму условљен је дефинисаним саставом подлоге који може утицати на путању биосинтезе једињења која се у потопљеном медијуму продукују. Најчешће су то протеини (Mikiashvili *et al.* 2006), полисахариди (Elisashvili, 2012) и феноли (Tešanović *et al.* 2017).

2.8. Нуклеарно-магнетна спектроскопија (NMR)

Нуклеарна магнетна резонанца или NMR спектроскопија представља технику истраживања која се заснива на магнетним особинама одређених атомских језгара (Roberts, 1986). Прецизније, NMR се заснива на апсорпцији радиофреквентног зрачења од стране језгра у јаком магнетном пољу. Свако језгро које има непаран број протона или/и неутрона, поседује спин и придружени магнетни моменат (Roberts, 1986).

Положај NMR сигнала у спектру зависи пре свега од хемијске околине језгра које се испитује кроз присуство околних електрона (e^-) као извора локалног магнетног поља, чија густина зависи од разних фактора као што су електронегативност суседних атома, степен хибридизације или број водоничних веза са суседним атомима. Уношењем у магнетно поље нуклеарни спин бива усмерен у правцу магнетног поља, а спектри се добијају отклањањем укупног магнетног момента језгра применом магнетног поља мање јачине али фреквенције која је приближна фреквенцији ротације испитиваног језгра у спољашњем магнетном пољу. Употребом NMR спектроскопије могу се одредити физичке и хемијске особине атома или молекула и могу се добити детаљне информације о структури, динамици, реакционом стању и хемијском окружењу молекула. Положај измерених сигнала се изражава у јединицама без димензије ppm. Њен значај се огледа у чињеници да се као *in vivo* недеструктивна метода и користи у испитивању структуре органских молекула, и веома често за испитивање метаболичких система (Paudler, 1974). Због тога се сматра веома погодном техником за испитивање физиолошких процеса код гљива. Метаболизам фосфата гљива је веома интересантан с обзиром да специфичност супстрата може утицати на фосфатазне ензиме и самим тим на ток метаболизма (Ezawa *et al.* 2002). Употребом ^{31}P NMR методе може се пратити фосфатни метаболизам, док ^{51}V NMR спектроскопија служи за одређивање различитих облика ванадата (Willsky *et al.* 1984; Crans, 2005).

2.9. Скенирајућа електронска микроскопија

Скенирајућа електронска микроскопија служи за скенирање и анализу површине чврстих узорака. Скенирање површине се остварује усмеравањем уског снопа (примарних) електрона у растер облику (пиксел по пиксел) преко површине узорка. Електронски снап примарних електрона се фокусира на узорак и прелази тачку по тачку. У свакој тачци узорка долази до интеракције електрона примарног снопа и узорка што доводи до губитка енергије електрона у процесима одбијања и апсорпције. Слика се формира детекцијом електрона који су дислоцирани, одбијају се од спољне површине препарата, па се тако

добија 3D слика узорка. Оштрина слике зависи од јачине сигнала са узорка тј. од енергије секундарних електрона (Stokes, 2008).

2.10. HydroxoPerhydroxoMercury(II) Complex - НРМС метода

За мерење антиоксидативне активности екстракта поред стандардних антиоксидативних метода коришћена је и метода НРМС (енг. HydroxoPerhydroxoMercury(II) Complex) заснована на класичној поларографији са капљућом Hg-електродом.

Поларографска НРМС метода (енг. HydroxoPerhydroxoMercury(II) Complex) заснива се на смањењу анодне струје грађења хидроксоперхидроксо-жива(II) комплекса $[\text{Hg}(\text{O}_2\text{H})(\text{OH})]$ на потенцијалу растварања живе у алкалном раствору водоник пероксида, по додатку антиоксиданаса. Метода је развијена и оптимизирана 2011. године у Лабораторији за електрохемију Института за општу и физичку хемију (Београд) под руководством проф Сужњевић (Sužnjević *et al.* 2011).

Присуство индивидуалних фенолних једињења, или комплексних узорака са одговарајућом антиоксидативном активношћу, изазива смањење висине граничне анодне струје и то пропорционално активности испитиваних узорака. Што је активност узорка већа, ово смањење је израженије. Узорци се додају у неколико узастопних запремина чија се оптимална запремина (и/или концентрација) установи прелиминарним мерењем. Критеријум за избор оптималних аликуота је линеарност добијене криве. Процедура је веома једноставна, а мерења су брза, што су, уз чињеницу да метода не захтева скупу инструментацију нити хемикалије, значајне предности у односу на класичне спектрофотометријске методе које се широко примењују. Нагиб линеарног дела криве зависности процента смањења струје пероксида од запремине или масе комплексних узорака, односно количине чистих једињења установљен је као најбољи начин за изражавање антиоксидативне активности.

2.11. Слободни радикали и оксидативни стрес

Слободни радикали престављају атоме, молекуле или јоне који у својој структури садрже један или више неспарених електрона (H, Cl, F, Br, I, NO, OH, O₂). Настају као продукти нормалног метаболичког пута аеробних организама и константно се производе у организму (оксидативна фосфорилација у митохондријама, процес фотосинтезе у хлоропластима, процес фагоцитозе и деловање оксидоредуктаза, цитохром P450 изоензима и флавоензима). Ипак, на њихов настанак могу утицати и одређени егзогени фактори (зрачење, ксенобиотици, различите врсте загађења, тешки метали, алкохол,

дувански дим, хидрогенизоване масти). Неспарени електрони одговорни су за нестабилност и реактивност радикала који се најчешће јављају у форми реактивних кисеоничних врста, мада постоје и друге реактивне врсте: са азотом, угљеником и сумпором (Halliwell, 2001).

Већина радикала бивају одмах неутралисани од стране ћелијских антиоксиданата (ензимских или не-ензимских молекула), међутим хиперпродукцијом реактивних кисеоничних врста или слабљењем ћелијске антиоксидативне одбране организам може да западне у стање *оксидативног стреса* (Machlin, 1987; Valko *et al.* 2007). За оксидативни стрес карактеристична је оксидација реактивних кисеоничних врста што за последицу има оштећења на различитим нивоима (ћелијске мембране, протеина, нуклеинских киселина и цитосолних молекула) (Halliwell & Gutteridge 2008), што даље узрокује прекид нормалне функције ћелије и бројна обољења - неуродегенеративне процесе, дијабетес, поремећаје кардио-васкуларног система, мутагенезу и канцер (Halliwell, 2001; Moylan & Reid 2007; Đukić *et al.* 2008).

2.11.1. Систем антиоксидативне заштите

Антиоксидансом се сматра било које једињење које одлаже, превенира или уклања оксидативно оштећење на циљном молекулу - супстрату и може се синтетисати *in vivo* или узимати путем хране (Halliwell & Gutteridge, 2008). Антиоксиданси су у стању да неутралишу деструктивне, високо реактивне слободне радикале, јер су у могућности да им предају електроне, стабилизујући их. Систем антиоксидативне заштите чине:

- **Ензимски** (каталаза-CAT, глутатион-пероксидаза-GSHPx, глутатион-редуктаза-GSHR, глутатион-S-трансфераза-GST и супероксид дисмутаза-SOD) и
- **Неензимски антиоксиданси** (витамин Е, витамин С, β-каротени, тиолна једињења (глутатион, метион и цистеин), албумин, металотионеин, карнозин, таурин, билирубин, мокраћна киселина, естрогени, креатинин, дихидролипонска киселина, коензим Q, полиамини, флавоноиди и феноли) (Đukić *et al.* 2008; Papas, 1999; Heleno *et al.* 2012).

Оба антиоксидативна система повезана су и делују међусобно, при чему је веома битно да ни један од антиоксиданаса није дефицитаран како би се рад антиоксидативног система дешавао несметано.

2.11.2. Антиоксидативна активност гљива

Антиоксидативна активност представља важну особину гљива (Gessler *et al.* 2007). Сматра се да су фенолна једињења примарно одговорна за ову активност (Puttaraju *et al.* 2006; Ferreira *et al.* 2009; Karaman *et al.* 2010; Li *et al.* 2010; Karaman *et al.* 2014). Продукована једињења пореклом из плодних тела гљива (генератива структура) могу да делују као снажни антиоксиданси те се данас већ користе у превенцији и терапији обољења изазваних оксидативним стресом односно прекомерном продукцијом реактивних кисеоничних врста. Осим плодних тела, мицелија култивисана у потопљеној субмерзној култури (енг. *submerged cultures*) или екстрацелуларни медијум такође представљају зачајан извор антиоксидативних супстанци, по чему гљиве имају предност у односу на биљке код којих се као продуценти биоактивних једињења разликују само надземне и подземне вегетативне структуре. У случају потопљених култура за краћи временски период могу се произвести оптималне количине биоактивних производа (примарних и секундарних метаболита) која су круцијална за даља истраживања и њихову примену (Fazenda *et al.* 2008; Elisashvili, 2012; Tešanović *et al.* 2017).

2.12. Антидијабетогена активност гљиве *C. comatus*

Гљиве показују потенцијал у превенцији и контроли дијабетеса, с обзиром да продукују једињења и ензиме који имају дејство слично инсулину, односно помажу у разградњи шећера и скроба (Kim *et al.* 2005; Kim *et al.* 2010; De Silva *et al.* 2012).

Познато је да врста *C. comatus* поседује супстанце које имају дејство слично инсулину, тј. супстанца 4,5-дихидрокси-2-метокси-бензалдехид, познатији као *коматин*, сматра се једињењем одговорном за антидијабетогено дејство (Ding *et al.* 2010).

У досадашњим *in vivo* студијама антидијабетогеног дејства врсте *C. comatus* установљено је да активна једињења делују као инхибитори неензимске гликозилације (Ding *et al.* 2012). У првом реду, ове супстанце одржавају низак ниво шећера у крви и/или повећавају толеранцију према глукози. Такође, делују и на смањење нивоа фруктозамина, триглицерида и укупног холестерола. Интра- и егзо- полисахариди потопљене културе *C. comatus* могу значајно да утичу на неензимску гликозилацију и то у знатно мањим концентрацијама од метформина, комерцијалног антидијабетогеног лека (Ding *et al.* 2012).

Нарочито значајни резултати везани за антидијабетогено деловање ове гљиве добијени су у студијама са ванадијумом. Ванадијум (V) је микроелемент са потенцијалним терапеутским ефектом с обзиром да може утицати на метаболизам фосфата, масти и угљених хидрата и може испољити инсулин-миметичко дејство (Crans *et al.* 1989). Гљиве су

један од главних путева уласка V у екосистем, па V може значајано утицати на метаболичке промене код гљива (Lepp *et al.* 1987; Kalač & Svoboda, 2000). Најзаступљенији облик ванадијума у природи је ванадат (V^{5+}). Праћењем дистрибуције ванадата (V^{5+}) и ванидила (V^{4+}) у ћелији гљиве добијамо податке о утицају V на фосфатни метаболизам и његову дистрибуцију у ћелији. С обзиром да је орална примена неорганских соли код пацијената оболелих од дијабетеса редукована услед токсичности ванадијума, испитиван је алтернативни унос ванадијума. Показало се да мицелија *C. comatus* обogaћена ванадијумом значајно смањује ниво шећера у крви, спрам нетретиране мицелије овим прелазним металом (Han *et al.* 2006; 2008; Wang *et al.* 2013). При концентрацији 0,40% натријум-метаванадата ($NaVO_3$) у медијуму мицелија *C. comatus* усвојила је 3,53 $\mu\text{g/g}$ ванадијума за који се сматра да није токсичан, па се мицелија обogaћена ванадијумом може разматрати као саплемент исхране или лек код особа оболелих од дијабетеса (Han *et al.* 2008).

2.13. Антипролиферативна активност гљива

Крајем XX века, након првих студија о антитуморском потенцијалу екстраката гљива (Ikegawa *et al.* 1968), константно се повећавала учесталост испитивања антипролиферативне активности гљива. Изолована активна једињења одговорна за антипролиферативну активност су примарни метаболити гљива, полисахариди – углавном β -гљукани са различитим врстама гликозидних веза, (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6) β -гљукани и (1 \rightarrow 3) α -гљукани (Wasser, 2002). Осим β -гљукана присутни су и хетерогљукани са различитим комбинацијма ксилозе, галактозе, манозе, арабинозе или гљукуронске киселине у бочним ланцима. β -гљукани и хетерогљукани остварују протективан ефекат активирањем одбрамбеног имуног одговора организма домаћина првенствено продукцијом ћелија природних убица (енг. *natural killers*), Т-ћелија и макрофага (Zhang *et al.* 2007; Liu, 2007; Smiderle *et al.* 2013).

За врсту *C. comatus* запажена је антитуморска и имуномодулаторна активност (Cui *et al.* 2002; Fan *et al.* 2006). Која се приписује високом садржају 1,3- β -гљукана и може да инхибише стопу раста саркома и Ерлиховог карцинома за 90% (Ying *et al.* 1987). Поред већ поменутих полисахарида и ензим *лаказа* показао је антитуморску (антипролиферативну) активност (Zhao *et al.* 2014). Такође, постоје подаци да хексански екстракт гљиве *C. comatus* инхибише андроген зависни тумор простате. Заправо, студија на ћелијским линијама LNCaP (ATCC, Rockville, MD) указала је на чињеницу да ова гљива може имати терапеутску вредност у случају тумора простате (Dotan *et al.* 2011).

2.14. Антимикробна активност макрогљива

Данас се користи преко 150 антимикробних супстанци пореклом од макрогљива (Karaman *et al.* 2012b). Сматра се да активне супстанце углавном чине ароматична, фенолна и терпеноидна једињења, стероли и ланостаноиди (Karaman *et al.* 2009b; Karaman *et al.* 2012b). Познат је и три циклични дитерпен - *плеуромутилин* изолован из *Pleurotus mutilus* који испољава антибактеријску активност (Lorenzen & Anke 1998). Познато је и да су екстракти гљива активнији према Грам-позитивним бактеријама у односу на Грам-негативне (Ehssan & Saadabi, 2012; Karaman *et al.* 2012; Stojković *et al.* 2013; Ren *et al.*, 2014). Такође, збележена је и антифунгална активност према одређеним врстама плесни, припадника родова *Aspergillus*, *Penicillium* и *Trichoderma* (Stojković *et al.* 2013). Изоловани су одређени антифунгални метаболити стероидне структуре као и тритерпени и фавоноли (Inouye *et al.* 2004), који су своју активност испољили према одређеним врстама гљива, али не и према бактеријама (Karaman *et al.* 2012b).

2.15. Анти-ацетилхолинестеразна активност

Гљиве се потенцијално могу применити као агенси код алтернативни третмана код неуродегенеративних обољења, конкретно у третману Алцхајмерове болести (Orhan & Üstün 2011). Лекови који се тренутно користе у третману Алцхајмерове болести (донепезил, ривастигмин, галантамин) делују на инхибицију ензима ацетилхолин естеразе. Иако су поменути лекови тренутно једни од најчешће примењиваних у терапији, постоје одређена ограничења у њиховој примени због споредних ефеката и терапеутских ограничења. Истраживања на откривању нових природних инхибитора ензима ацетилхолин естеразе представља реалне потребе (Alva & Cummings 2008).

2.16. Раздео Basidiomycota

Разделу (Phyllum) Basidiomycota припадају макроскопске гљиве најчешће са крупним плодним телима, а карактеристично је присуство септиране, разгранате дикарионтске мицелије, полно размножавање и образовање спороносног органа - базидиокарпа са хаплоидним базидиоспорама. Бесполан начин размножавања је редак и одвија се конидијама, оидијама, хламидоспорама и пупљењем (Ranković, 2003). У циклусу развића преовладава дикарионтска фаза када компатибилне хифе фузионишу формирајући фазу коегзистенције два једра у ћелији. Одржавање дикарионтске фазе помаже формирању специфичних структура тзв. "clamp connections" бајпаса, односно кукастих израштаја, који представљају још једну од карактеристика поменутог раздела

(Ranković, 2003). Већина представника овог раздела су јестиве гљиве које имају економски значај, а код око 700 врста су установљене одређене фармаколошке активности (Mizuno, 1999; Wasser, 2002; Ferreira *et al.* 2009).

Раздео обухвата три класе: Hymenomycetes, Gasteromycetes и Teliomycetes и 177 редова са око 25 000 врста, па се по величини налази на другом месту, одмах иза раздела Ascomycota (32 000 врста). Класи Hymenomycetes припада ред Agaricales коме припадају поред тридесет других фамилија и фамилије Agaricaceae (са родом *Coprinus* и врстом *C. comatus*) и Psathyrellaceae (са родом *Coprinellus* и врстом *C. truncorum*) (<http://www.indexfungorum.org>).

Док већи број представника раздела Basidiomycota има способност да разграђује целулозу и лигнин (захваљујући својим ензимским системима), сапротрофни представници рода *Coprinus*, карактеристични су за станишта обogaћена органском материјом (Radnović *et al.* 2007). Род је први описао Kristiaan Persoon 1797. године и дао му име *Coprinus* од грчког „копрос“ што значи „живот на ђубришту“ (пошто су сапроби, помажу распадање органског супстрата и шумске стеље). Коприноидне гљиве су се рано одвојиле у засебан род од осталих гљива због очигледне могућности аутолизе плодног тела током сазревања и продукције спора. Ламеле прве крећу са аутолизом од дна, ка центру плодног тела и доводе до потпуне аутолизе, када се плодно тело претвара у црну, водњикаву масу која подсећа на мастило. Аутолиза или ликвефакција обезбеђује лакше расејавање спора, јер их поставља у најбољи положај за расејавање ветром. Код неких ситнијих врста аутолиза се дешава веома брзо, за неколико сати цело плодно тело се претвори у црну мрљу, ова појава оправдава народне називе - „печурке са мастилом“, „мастиљарка“.

2.16.1. Класификација рода *Coprinus*

Род *Coprinus* припада разделу Basidiomycota, класи Agaricomycetes, реду Agaricales и фамилији Agaricaceae. Последњих година развојем и употребом молекуларних метода у филогенији гљива дошло је до значајних измена у погледу таксономије, па самим тим и код врста рода *Coprinus* (Nagy *et al.* 2011). Наиме, до 2001. године род *Coprinus* је обухватао све врсте гљива које су имале способност аутолизе, али су молекуларне методе у оквиру филогенетских истрага показале другачије. Познато је да се филогенетске анализе не могу заснивати само на морфолошким особинама јер ни једна од њих појединачно није довољно поуздан таксономски карактер. Тако је за род *Bolbitius* познато да има способност аутолизе плодног тела, баш као и *Coprinus*, а не припада коприноидним гљивама. Значи да све печурке које аутолизирају не морају бити блиско генетички повезане, што је потврђено и савременијим методама истраживања.

Данас је генерално прихваћено да је само неколико врста рода *Coprinus* блиско, док су остале врсте прегруписане у три различите секције и представљају далеке рођаке врсте *C. comatus*.

На основу филогенетских анализа ДНК молекула током времена откривене су промене у смислу мутација, модификација и оштећења ДНК које су довеле до промена у морфолошким карактеристикама (боја плодног тела, величина и боја спора, промена ензима који се продукују итд.) (Redhead *et al.* 2001; Hopple *et al.* 1994). Испитивање 47 врста рода *Coprinus* и 19 врста из других фамилија (*Coprinaceae*, *Strophariaceae*, *Bolbitiaceae*, *Agaricaceae*, *Podaxaceae* и *Montagneaceae*) указује да је род *Coprinus* полифилетичан и дели се у три кладе представљене латиничним словима а, б и с - Слика 2.3. (Hopple & Vilgalys 1999). Такође, утврђено је да су врсте у оквиру тадашњег рода *Coprinus* генетички веома удаљене и као такве су се морале раздвојити у засебне родове.

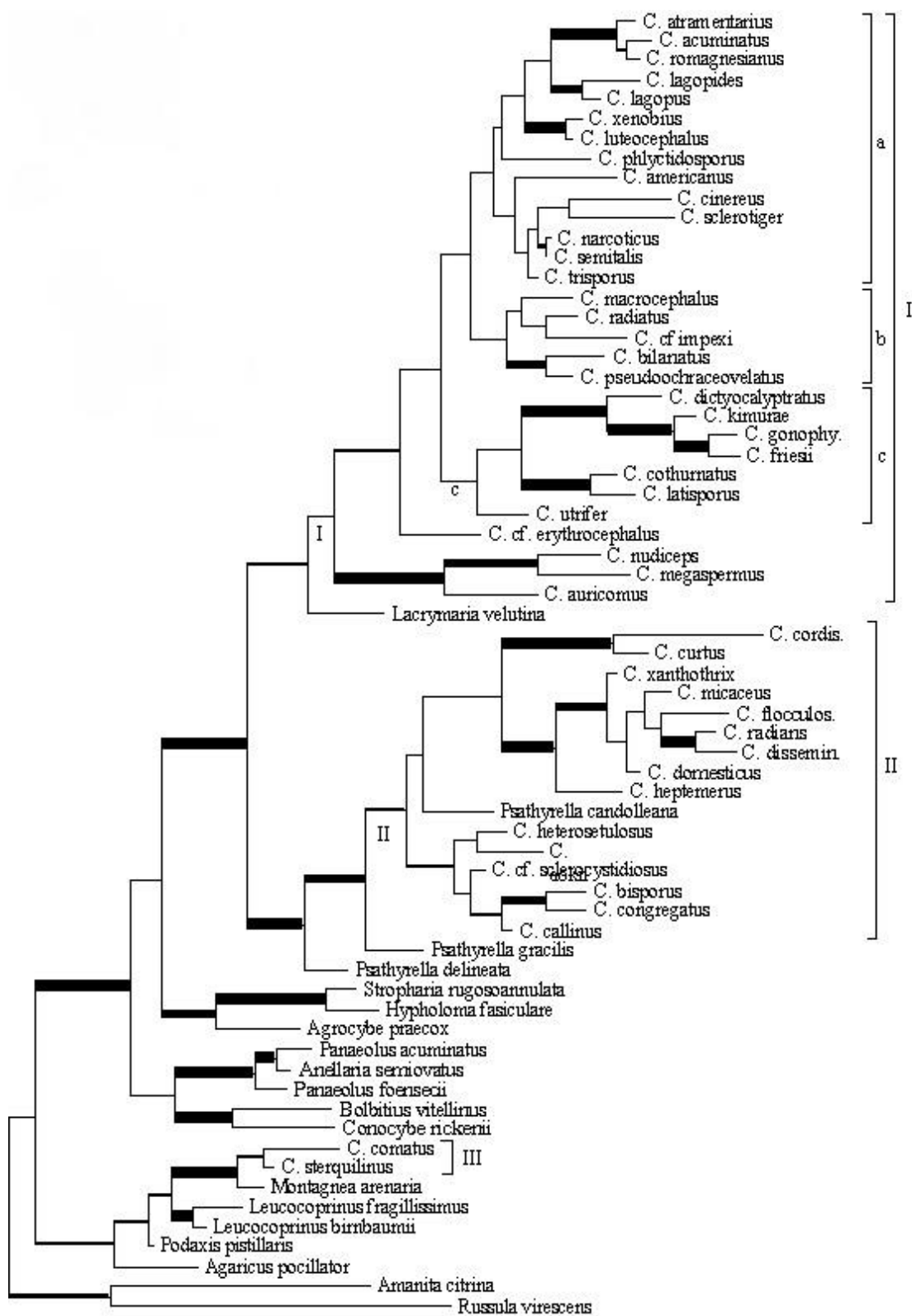
Будући да се опис читавог рода заснивао на карактеристикама гљиве *C. comatus* остале врсте су премештене у нове родове (Schäfer, 2010). Настале промене у систематици су прихваћене 2007. године, тако су према тренутној класификацији све коприноидне врсте подељене у четири рода:

- *Coprinus*,
- *Parasola*,
- *Coprinopsis* и
- *Coprinellus*.

Род *Coprinus* остао је у фамилији *Agaricaceae*, а остала три рода (*Parasola*, *Coprinopsis* и *Coprinellus*) премештени су у фамилију *Psathyrellaceae* (Redhead *et al.* 2001). Род *Coprinopsis* обухвата око 100 врста, *Coprinellus* нешто више од 40 (ту припада и врста *C. truncorum*), а род *Parasola* око 20 врста (Naumann *et al.* 2008).

У вези са новом поделом по родовима већина врста бива преименована, тако да данас често срећемо нове називе врста, са навођењем пређашњег назива обично у загради, док су у неким кључевима задржани само стари називи. Такође, до данас ипак нису све врсте систематизоване јер се молекуларним методама не може добити јасна разлика између појединих врста родова *Coprinellus* и *Parasola*, па ће промене у класификацији тек уследити после детаљнијих генетских студија (Naumann *et al.* 2008).

Врсту *C. comatus* је први пут описао дански природњак Otto Friedrich Müller 1780. године, као врсту *Agaricus comatus*. Нешто касније Christiaan Persoon је описао читав род и преименовао врсту у данашњи познат назив (Nilsson & Persson 1977).



Слика 2.3 Филограм рода *Coprinus* (Hopple & Vilgalys 1999)

2.16.2. Класификација рода *Coprinellus*

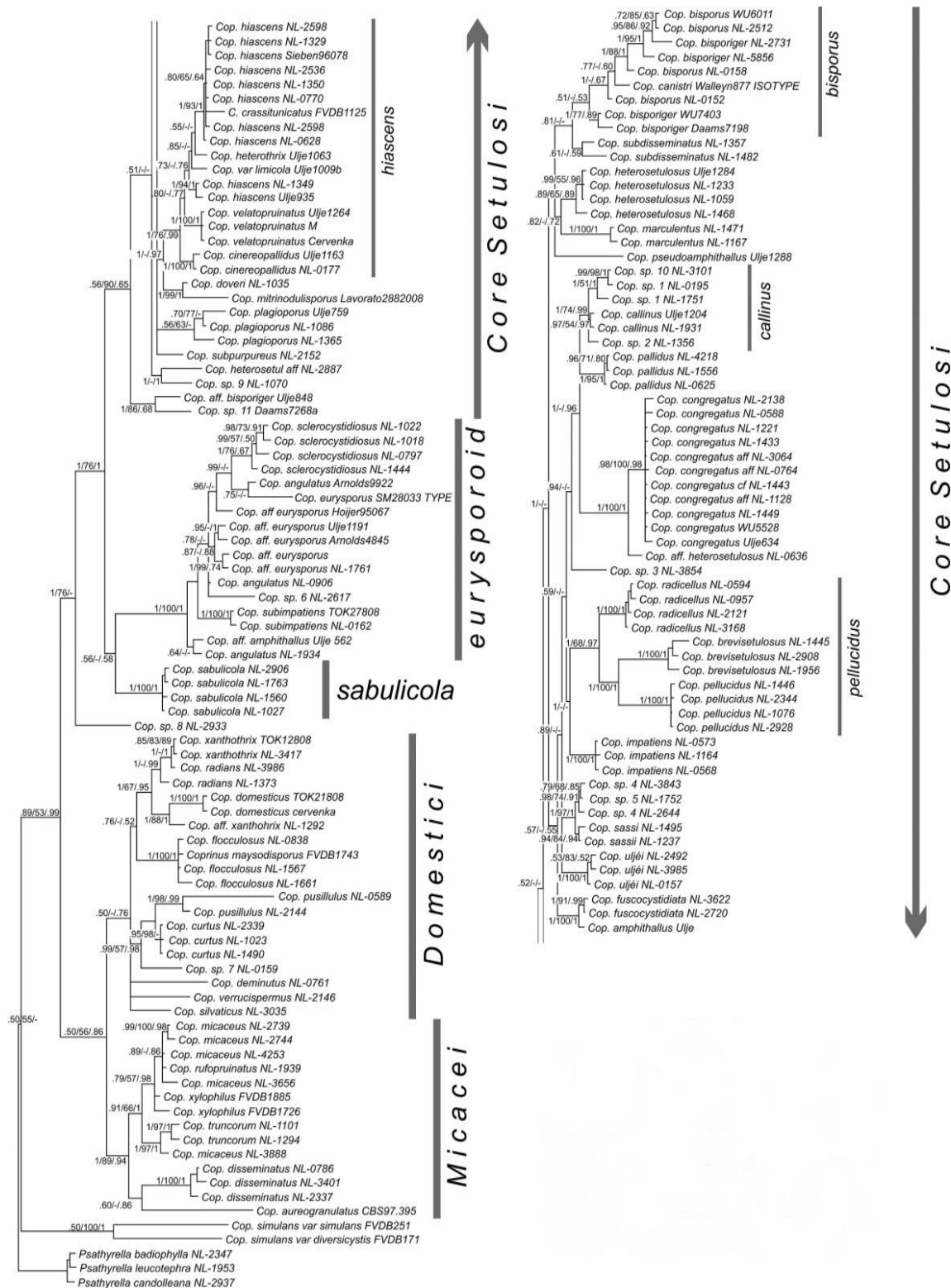
Род *Coprinellus* припада фамилији *Psathyrellaceae*, коју је први описао Petter Karsten 1879. године. Већина врста овог рода су међусобно сличне и захтевају микроскопске анализе за идентификацију. Поред морфолошких анализа и молекуларне студије су спроведене у циљу дефинисања филогенетске структуре рода. Молекуларне студије су се заснивале на употреби ITS региона, LSU или „b-tubulin“ секвенци (Nagy *et al.* 2011), а врсте у оквиру рода су након анализа подељене на три велике кладе:

- Core Setulosi,
- Eurysporoid и
- Micacei/Domestici клада (Слика 2.4).

Клада Micacei/Domestici је подељена на две субкладе, на основу морфолошких карактера. Роду *Coprinellus* између осталих припада и врста *C. truncorum* која се налази у оквиру Micacei/Domestici кладе.

Род *Coprinellus* припада фамилији *Psathyrellaceae*. Од 2001. године на основу молекуларних анализа придодата му је већина врста из некада великог рода *Coprinus*, тако да према савременој класификацији броји 66 врста (Index Fungorum референтна база података, измене од јануара 2016). Врсту је први пут описао италијански физиолог Giovanni Antonio Scopoli 1838. год., а коначан назив врсте су 2001. године дефинисали Redhead, Vilgalys и Moncalvo, група научника из Америке.

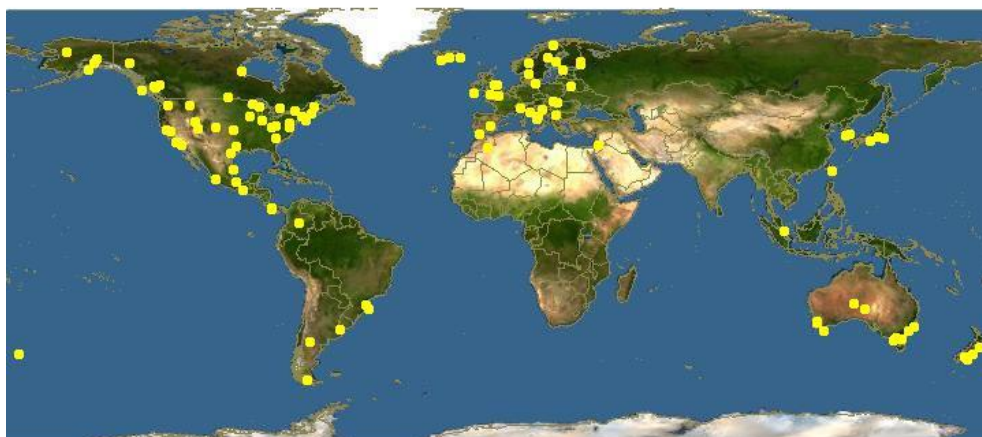
Морфолошки веома подсећа на врсту *Coprinellus micaceus*, међутим постоје извесне макроскопске разлике на нивоу дршке, која је глатка код *C. truncorum*, а прашкаста код *C. micaceus*. Разлике постоје и на основу спора, *C. truncorum* има више елиптичне споре, са пором на средини. Ипак, на основу анализираних ITS1-5,8S-ITS2 секвенци (Ko *et al.* 2001; Keirle *et al.* 2004) сматра се да су ове две врсте конспецифичне, односно да се могу сматрати синонимима, иако то није генерално прихваћен став.



Слика 2.4 Филограм рода *Coprinellus* (Nagy et al. 2011)

2.16.3. *Coprinus comatus*

C. comatus је специфична врста која се лако препознаје по својим особеностима. Налази се углавном на травњацима, поред путева, на земљишту обogaћеном органском материјом и дуж речних токова. Као и већина врста рода *Coprinus* има својствену особину аутолизе зрелог плодног тела. Сапробна је врста, расте у групама (вилаина кола) или појединачно током пролећа и јесени. Плодно тело је висине 5-15 cm, ширине 2-5 cm, овалног до цилиндричног облика када је младо, а затим се шири, подиже, постаје звонасто и аутолизира прелазећи у црну течност. Ламеле су најпре беле или ружичасте боје, а затим постају црне и потпуно аутолизирају. Дршка је дужине 5-20 cm, ширине 1-2 cm и често се сужава при врху, са покретним уским белим прстеном. Споре су елиптичне, црне боје. Врста је распрострањена на територији Европе, Азије, Америке и Аустралије (Слика 2.5). Јестива је док је млада (беле боје) (Слика 2.6). У Кини се култивише као комерцијална. Само током 2006. произведено је 382 000 тона (Li *et al.* 2010).



Слика 2.5 Мапа распрострањења врсте *C. comatus*
(<http://www.discoverlife.org/mp/20m?map=Coprinus+comatus>)

C. comatus има тренутну класификацију према Index Fungorum бази података:

- **Царство:** Fungi
- **Разео:** Basidiomycota
- **Класа:** Agaricomycetes
- **Ред:** Agaricales
- **Фамилија:** Agaricaceae
- **Род:** *Coprinus*
- **Врста:** *C. comatus* ((O.F. Müll.) Pers., (1797))
- **Народни назив:** Велика гњоштарка, чупава гнојиштарка, бели јарчић, мастиљарка



Слика 2.6 *C. comatus*

Станиште: ливаде, ђубришта, шумски пропланци, паркови, сва места на којима има сировог хумуса који се брзо разграђује; расте од пролећа до јесени

Шешир: ваљкастог облика, светло смеђе боје у младости; растом, кожица шешира распуцава стварајући тако чуперке

Листићи: густе, бели, па ружичасте, а кад поцрне долази до аутолизе гљиве – тада се листићи претварају у црну смоласту масу која капље све док се цели шешир не разложи (деликвисцира)

Дршка: ваљкаста, бела, глатка, са белим прстеном

Споре: црне

Сматра се јестивом и лековитом гљивом. Садржи висок проценат минерала, есенцијалне аминокиселине и протеине. Полисахариди, међутим, представљају значајнији састојак (> 50%) са медицинског аспекта (Flik, 2010).

У филтрату њене потопљене културе, поред осталих метаболита, идентификован је и 4,5-дихидрокси-2-метокси-бензалдехид (познатији као *коматин*), инхибитор неензимске гликозилације за који се претпоставља да је одговоран за антидијабетогену активност ове гљиве (Han *et al.* 2006; Ding *et al.* 2010). За *C. comatus* је познато да поседује и антитуморску (Cui *et al.* 2002), имуномодулаторну (Ying *et al.* 1987; Fan *et al.* 2006; Dotan *et al.* 2011; Zhao *et al.* 2014), хепатопротективну (Powell, 2014), антиоксидативну (Asatiani *et al.* 2010; Ferreira *et al.* 2009) и антимицробну (Zenkova *et al.* 2003) активност. Фенолна једињења су се показала одговорним за антиоксидану активност (Vaz *et al.* 2011; Karaman *et al.* 2014), иако неки полисахариди и протеини показују сличне ефекте (Wasser, 2011). Забележена је и нематоцидна активност према врстама *Panagrellus redivivus* и *Meloidogyne arenaria* (Luo *et al.* 2007).

2.16.4. *Coprinellus truncorum*

C. truncorum насељава територију Европе и Северне Америке (Слика 2.7). У литератури нема података о јестивости и сматра се условно јестивом, с обзиром на то да врста *C. truncorum* не продукује микотоксин *коприн* (n-(1-хидрокси циклопропил)-L-глутамин) који је забележен код неколико врста рода *Coprinopsis* (*Coprinopsis atramentaria*, *Coprinopsis erethistes*, *Coprinopsis insignis* и *Coprinopsis variegata*) (Ammirati et al. 1985).



Слика 2.7 Мапа распрострањења врсте *C. truncorum*
<http://www.discoverlife.org/mp/20m?map=Coprinellus+truncorum>

Може се наћи у шумама, али и у урбаним срединама током пролећа, лета и јесени, понекад и током зиме. Расте на земљи, на трулом дрвећу или у близини дрвећа и трулих пањева, особито врбе, често у великим групама (Слика 2.8). Плодно тело је сиве или браон/беж боје, величине до 5 cm, шешир је конусан до 20 mm, радијално избраздана, у почетку прекривена белим гранулама. Ламеле су светле боје, затим постају тамније и на крају аутолизирају, али не у потпуности. Дршка је дужине 2-8 cm, ширине 3-6 mm, горњи део при бази има ситне длачице. Споре су елиптичне, смеђе до црне боје са заобљенијом пором на средини.

Тренутна класификација врсте *C. truncorum* према Index Fungorum бази података:

- **Царство:** Fungi
- **Раздео:** Basidiomycota
- **Класа:** Agaricomycetes
- **Ред:** Agaricales
- **Фамилија:** Psathyrellaceae
- **Род:** *Coprinellus*
- **Врста:** *C. truncorum* (Scop.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo 2000
- **Народни назив:** Врбина гноиштарка



Слика 2.8 *C. truncorum*

Станиште: расте у бусеновима на различитим земљиштима у шумама, парковима и воћњацима у близини трулог дрвећа од пролећа до јесени

Шешир: јајолик, касније у облику звончића, окерсмеђе боје; за време сушног периода белкастоокер

Листићи: слободни, густе, у почетку беле боје, затим сивкастосмеђе и на крају црни

Дршка: ваљкаста, бела, без прстена

Споре: смеђе до црне боје

Врста *C. micaceus* за коју се сматра да је конспецифична са врстом *C. truncorum* продукује биоактивну супстанцу микацеол, стерол са антибактеријском активношћу (Zahid, 2006; Flik, 2010). Такође, продукује једињење (3,3)-4-оксо-2,5-хептадиенедиоичну киселину која делује инхибиторно на ензим глутатион-S-трансферазу, који појачава отпорност ћелија рака према хемотерапеутским агенсима (Ata *et al.* 2009). Иако нема довољно података о биоактивности врсте *C. truncorum* сматра се да продукује слична биолошки активна једињења поменуте врсте *C. micaceus*.

3. ЦИЉ РАДА

Циљ докторске дисертације био је да се проуче биолошки активна једињења аутохтоних примерака врста *C. comatus* и *C. truncorum* са подручја Фрушке горе (Каменички парк, Сремски Карловци и околина Новог Сада) односно њихових плодних тела (ПТ), мицелије (М) и екстрацелуларног медијума - филтрата (Ф) из потопљене културе.

Ради постизања поменутог циља дефинисани су следећи подциљеви:

1. Прикупљање и детерминација аутохтоних врста гљива *C. comatus* и *C. truncorum*,
2. Изолација мицелије и формирање колекције култура гљива,
3. Оптимизација услова за култивацију мицелија у потопљеним културама,
4. Генотипизација и потврда идентитета узоркованих врста плодног тела и изоловане мицелије применом ITS региона ДНК,
5. Припрема екстракта различите поларности (хлороформски, етанолни, метанолни и водени) из генеративних - плодних тела (ПТ) и вегетативних структура - мицелије (М) и филтрата (Ф) потопљених култура,
6. Изолација полисахарида из плодних тела, мицелија и филтрата обе врсте,
7. Примена ^{31}P NMR - нуклеарно магнетне резонантне спрегтроскопије за испитивање метаболизма фосфата и утврђивање утицаја ванадијума на метаболизам фосфата код мицелије гљива у потопљеним културама,
8. Праћење у ком облику се ванадијум налази у ћелијама мицелија гљива, ^{51}V NMR спектроскопијом,
9. Испитивање утицаја ванадијума на раст мицелије у потопљеној култури као и скенинг електронска микроскопија (SEM) мицелија гљива пре и после обогаћења течне подлоге различитим концентрацијама ванадијума (0,1-0,5 g натријум-ортованадата у подлози),
10. Испитивање биолошке активности екстракта: антиоксидативне, антирадикалске, антимикробне, анти-ацетилхолинестеразне као и утицај на вијабилност ћелијских култура хуманих хепатоцита (HepG2) и β ћелија панкреаса пацова (Rin-5F),
11. Хемијска карактеризација релевантних екстракта:
 - Спектрофотометријско одређивање укупног садржаја фенола и флавоноида,
 - LC-MS идентификација и квантификација фенолних киселина,
 - Спектрофотометријско одређивање садржаја укупних протеина и полисахарида,
 - FTIR спектроскопија и планарна хроматографија полисахарида,

- GC-MS идентификација и квантификација масних киселина,
- Квалитативно и квантитативно спектрофотометријско одређивање биогених елемената атомском апсорпционом спектрофотометријом (AAS).

Коначан циљ докторске дисертације је да се на основу претходно дефинисаних подциљева процени терапеутски значај врста гљива *C. comatus* и *C. truncorum* и предвиди њихова потенцијална примена као функционалне хране и у медицинске сврхе.

4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

4.1. Узорковање гљива

Обе врсте су узорковане и детерминисане од 2013. до 2016. године на различитим локалитетима (Табела 4.1).

Материјал је прегледан и детерминисан на Департману за биологију и екологију Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду под супервизијом др Милана МАТАВУЉА, редовног професора у пензији и др Маје КАРАМАН, ванренде професорке. Врсте су идентификоване класичним поступцима таксономске анализе према миколошким карактерима (плодно тело, пресек хименофора, карактеристике спора), а касније и молекуларном анализом ITS региона ДНК (Schoch *et al.* 2012), који се показао најчешће секвенционираним ДНК регионом код гљива у циљу потврде идентитета врсте (Peay *et al.* 2008). Потом су у постојећу колекцију култура гљива на Департману за биологију и екологију депоновани ваучер примерци плодних тела заведеним по шифрама (Табела 4.1).

Табела 4.1 Узорковане гљиве, локалитет и шифре у микотеци

Врста	Датум узорковања	Локалитет	Шифра у микотеци
<i>C. comatus</i>	24.11.2014.	Сремски Карловци	12-00704
<i>C. truncorum</i>	15.09.2015.	Нови Сад – паркинг код Природно-математичког факултета	12-00705
<i>C. comatus</i>	22.10.2014.	Нови Сад – обала Дунава (Бећарац)	12-00716
<i>C. truncorum</i>	06.06.2014.	Фрушка гора – Каменички парк	12-00717
<i>C. truncorum</i>	08.04.2016.	Кампус Универзитета	12-00720
<i>C. truncorum</i>	07.05.2016.	у близини Пољопривредног факултета у Новом Саду Кампус Универзитета	12-00721
		у близини Пољопривредног факултета у Новом Саду	

4.2. Изолација и култивација мицелије

Из свежих детерминисаних плодних тела изолована је мицелија обе врсте. Мицелија је култивисана на сладном агару (Торлак, Београд), 10-14 дана на 26° С и потом посматрана помоћу микроскопа (Слика 4.1).

Бележило се присуство специфичних структура за раздео Basidiomycota тзв. кукастих структура енг. „clamp connections“. Потом је део мицелије (плаг) презервиран у стерилној

дестилованој води у колекцији култура мицелија (FUNGICULT-FCC) под шифрама FCC-007 за врсту *C. comatus* и FCC-039 за врсту *C. truncorum*.

FUNGICULT-FCC колекција култура мицелија гљива се налази у оквиру миколошке збирке Катедре за микробиологију, на Департману за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду основаном од стране проф др Маје КАРАМАН.



Слика 4.1 Изолована мицелије врсте *C. comatus* на сладном агару

Даље је по 5 плагова (исечака мицелије 1x1 cm) култивисано 14 дана у ферментационом медијуму (Табела 4.2) на 26° C, 120 обртаја/min (New Brunswick Scientific, Edison, USA).

Табела 4.2 Састав ферментационог медијума (Hashimoto et al. 1959)

пептон	5,00 g
глукоза	35,00 g
квашчев екстракт	5,00 g
K ₂ HPO ₄	1,00 g
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,50 g
витамин B1	0,05 g
дестилована вода	1 L

Мицелије су након инкубације у потопљеној култури бојене методом „Diazonium Blue B (Sigma Aldrich, D9805) (DBB тест)“. DBB тест бојења користи се за класификацију непознатих изолата јер служи за разликовање мицелија гљива припадника раздела Ascomycota или Deuteromycota од Basidiomycota (Summerbell, 1985; Hutchison & Summerbell, 1990). Дати тест заснива се на присуству различитих ензима у ћелијском зиду. Ензими представника раздела Basidiomycota (екстрацелуларна уреаза,

деоксирибонуклеаза и респираторни коензими Q типа) при реакцији са бојом DBB дају црвен или љубичаст обојен комплекс (позитивна реакција), док код свих Ascomycota дата обојеност изостаје (негативна реакција) (Hagler & Ahearn, 1981). Иако је доста брз начин детекције, DBB бојење мицелије се не сматра стандардизованим тестом јер поред високе канцерогености саме боје постоји и могућност лажно позитивних резултата.



Слика 4.2 Потопљене културе гљива *C. soratus* и *C. truncorum*

4.3. Молекуларна идентификација

Из мицелија обе врсте, као и претходно поменутих плодних тела је изолована хромозомална ДНК према „СТАВ“ протоколу (енг. Chloroform-Isoamyl Alcohol DNA Extraction Protocol) (Doyle & Doyle, 1987; Doyle & Dickson 1987; Cullings, 1992). Концентрација и чистоћа изоловане ДНК одређена је спектрофотометријским мерењем апсорбанци раствора ДНК на 260 и 280 nm (UV BioSpec-nano Shimadzu, Kyoto, Japan). Провера чистоће геномске ДНК је урађена и електрофоретски на 1% агарозном гелу (100 V, 45 min).

Ради молекуларне идентификације врсте урађено је PCR умножавање (енг. PCR-Polymerase chain reaction) ITS региона употребом ITS1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) и ITS4R (TCCTCCGCTTATTGATATGC) прајмера помоћу PCR машине (енг. Thermocycler) (Biometra T Professional Basis, Немачка). Укупна запремина реакције била је 50 μ L: 10 ng/ μ L геномске ДНК, 50 μ M сваког прајмера, 25 mM of MgCl₂, 2 mM dNTPs, 1X PCR buffer и 5 U/ μ L Taq polymerase (Fermentas, Литванија).

Програм PCR реакције је био следећи:

Почетна денатурација 94°C 1 min и 25 s, па 13 пута поновљен циклус денатурације на 95°C, 35 s, везивање прајмера на 55°C, 55 s, елонгација на 72° C 3 min. Девет циклуса су

били идентично поновљени, с тим да је завршна елонгација у десетом циклусу била подешена на 72° C 10 min.

Провера PCR продуката је вршена на 2% агарозном гелу на електрофорези (Biometra, Немачка), са бојом етидијум бромид (Sigma Aldrich, E1510) и маркером за одређивање величине од 50 bp (O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo Scientific). Екстракција умножених ITS продуката урађена је помоћу QIAquick Gel Extraction Kit-а према упутству произвођача (Qiagen, www.qiagen.com).

Секвенцирање добијених PCR продуката је рађено у GATC Biotech компанији (Köln, Немачка). Добијени резултати су обрађени у софтверу *FinchTV* (обрада хроматограма и превођење секвенце у FASTA формат).

Употребом BLAST претраживача (енг *Basic local alligment search tool*) извршено је поређење добијених секвенци са секвенцама из NCBI (енг. *National Center for Biotechnology Information*) базе података. NCBI је највећа и најпосећенија интернационална база података која поред информација о ДНК секвенцама и секвенцама протеина, садржи и научне часописе, али и бесплатне софтверске програме и алате (Pruitt *et al.* 2007). BLAST је програм који се користи за претраживање хомологих секвенци. Он се заснива на математичком моделу матрице који „оцењује“ ниво поклапања секвенци које се пореде (Altschul *et al.* 1990).

4.4. Припрема екстраката гљива

Биолошка активност испитивана је на нивоу екстраката плодног тела (ПТ), мицелије (М) и филтрата екстрацелуларног медијума (Ф) потопљених култура обе врсте. Код потопљених култура након 14 дана инкубације, биомаса (мицелија) културе је профилирана, а мицелија и филтрат лиофилизован до сувог остатка (Christ Alpha 1-2 LD Freeze Dryer, Швајцарска). Испитивани су екстракти различите поларности: хлороформски, етанолни, метанолни, водени али и изоловани полисахариди из ПТ, М и Ф обе врсте.

За припрему екстраката коришћена је лиофилизована биомаса ПТ, М и Ф обе врсте, одмерена на аналитичкој ваги (Ohaus explorer, ex 224M) и екстрахована у различитим органским растварачима (100% хлороформом - CHCl₃, 70% метанолом - MeOH и 80% етанолом - EtOH) и води (H₂O). Одмерено је по 10 g биолошког материјала и 350 ml одговарајућег растварача. Екстракција је трајала 72 h, изузев водених екстраката (екстракција од 24 h), на тресилици (New Brunswick Scientific, Edison, USA; 120 обртаја/min), на собној температури (+25°C). Након екстракције добијена смеша је профилирана кроз филтер папир (Filters Fioroni N°114, Француска).

Сакупљени филтрата су даље упаравани на ротавапору (Büchi, R-210, Швајцарска), при температурама од +50°C (за MeOH и EtOH екстракте) и +40°C (за хлороформски екстракт), док су водени лиофилизирани до сувог остатка. Упарени суви остатак код свих екстраката растворен је у 5% диметил-сулфоксиду (DMSO), изузев код водених (који су били растворени у води), до постизања финалне концентрације екстракта 100 mg/mL. Припремљени екстракти су чувани у стакленим бочицама затворени парафилмом, на температури од -20°C до даље употребе.

Поред наведених екстраката гљива, припремљени су и полисахаридни екстракти, по процедури Rep и сарадници (2014). За дату екстракцију употребљена је лиофилизована биомаса плодних тела гљива и потопљених култура (мицелије и филтрата). Сви узорци најпре су екстраховани у EtOH, након чега су профилирани. Настали талог је потом екстрахован у кипућој дестилованој води, а затим је уследила преципитација/таложње филтрата преко ноћи у EtOH, на +4°C, па центрифугирање у трајању од 15 min на 4000 g (Eppendorf, 5810R). Дати преципитати хидрирани су у води, а затим су дијализирани помоћу црева за дијализу (током 72 h). Даље су били припремљени релевантни екстракти почетне концентрације 100 mg/mL и 50 mg/mL, од којих је касније припремљена серија разблажења за анализирање у експериментима.

4.5. Утицај ванадијума на метаболизам фосфата анализираних гљива

Утицај ванадата V^{5+} на фосфатни метаболизам мицелија гљива са чврсте подлоге и из потопљених култура праћен је помоћу *in vivo* ^{31}P NMR спектроскопије у различитим фазама раста мицелије. Криве раста конструисане су за обе врсте (након 3, 5, 7, 14, 21 и 35 дана инкубације у потопљеном медијуму) да би се одредиле експоненцијалне фазе раста код обе испитиване врсте. Фосфатни метаболизам мицелија праћен је ^{31}P NMR спектроскопијом код две врсте:

- *C. comatus* (обала Дунава- Бећарац, 12-00716) и
- *C. truncorum* (Фрушка гора – Каменички парк, 12-00717).

Врста *C. comatus* има способност апсорпције ванадијума са потенцијалним антидијабетогеним активностима (Han *et al.* 2006; Wang *et al.* 2013). Како би се истражио и разјаснио овај феномен, мицелија испитиваних гљива третирана је ванадатом. ^{51}V NMR спектроскопија употребљена је да се испита који су физиолошки облици V активни у ћелијском систему мицелије. Поред тога, одређен је и утицај ванадијума на раст мицелије у потопљеној култури тако што су у ферментациони медијум додате различите концентрације натријум-метаванадата ($NaVO_3$) (0,1 g, 0,3 g и 0,5 g) након чега је мерена

биомаса и формиране су криве раста на различитим концентрацијама V у односу на контролу.

За потребе мерења мицелије обе гљиве биле су испране дестилованом водом и сакупљене у кивете са експерименталним медијумом који је садржао 110 mM глукозу и 13,3 mM аспарагин, а затим су снимљени спектри фосфатног метаболизма. Потом су направљени 200 mM раствори натријум-ортованадата (Na_3VO_4) и ванидил сулфата (VOSO_4) (хемикалије су добијене од Sigma, Taufkirchen, Немачка). Потом су мицелије третиране са датим растворима и поново су снимани спектри. Коришћен је спектрометар Bucker MSL 400 (Немачка), са надоградњом Apollo (Techmag, USA), при резонантној фреквенцији 161,978 MHz за ^{31}P NMR и 105,169 MHz за ^{51}V NMR.

^{51}V NMR су снимани са статичном сондом и узорком у хоризонталном положају. Дужина пулса је била 14 (45°), а дужина спектра је била 3,6 min (за узорке третиране ванадатом) и 3,6 min (за узорке испране након третмана ванадатом). Сигнали су дефинисани у односу на сигнале помоћног стандарда натријум-метаванадата (pH=12) који у воденом раствору производи мономер (-534,7 ppm) и димер (-560 ppm).

4.6. Скенирајућа електронска микроскопија (SEM) мицелија гљива

Мицелија гљиве се може припремити за SEM тако што се култивише у потопљеном медијуму (ферментациони медијум). Када се постигне одговарајући принос биомасе, експоненцијална фаза раста, део мицелије се у стерилним условима одвоји у мање стерилне бочице. Потом се вишак медијума одлије, а остатак биомасе преко ноћи остави се у фрижидер на $+4^\circ\text{C}$ (модификовано према Iličić *et al.* 2012).

Припрема узорка мицелије гљива за SEM подразумева неколико корака (Iličić *et al.* 2012):

1. префиксација (у раствору 2,8 % глутаралдехида, 24 h, на темп. 20°C)
2. испирање у дестилованој води (dH_2O)
3. дехидратација (у растућим концентрацијама алкохола)
4. екстракција у хлороформу

Префиксација у глутаралдехиду ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$) представља почетни корак припреме узорка; фиксатив има за циљ стабилизацију протеинске основе, односно да очува ћелијску морфологију, спречи раст микроорганизама и да спречи аутолитичке процесе. За добру фиксацију важан је добар одабир фиксатива, али и однос фиксатива и величине узорка. Сматра се да је добар однос фиксатива и узорка тј. мицелије гљиве 1:10. Фиксација са глутаралдехидом не треба да траје дуже од 24 h, на температури од 20°C .

Након префиксације која траје 24 h следи испирање у дестилованој води, а потом дехидратација узорка (мицелије) у растућим концентрацијама алкохола (30, 50, 70, 90 и 100 %) (на сваких сат времена се одлива постојећа и додаје растућа концентрација, до апсолутног етанола). Дехидратација у апсолутном етанолу у траје 24 h, након чега следи сушење узорка.

Узорак који се припрема за SEM мора бити апсолутно сув. За сушење узорка се користи уређај Critical Point Dryer (CPD), који ради у атмосфери са угљен-диоксидам (CO_2) при повећању температуре изнад 32°C . Након сушења узорак се чува у вакууму и непосредно пре скенирања на микроскопу пресвлади се слојем метала. Најчешће се облаже златом или платином у слоју дебљине 2 nm, на тај начин се обезбеђује одбијање електрона са површине узорка чији ће сигнал образовати слику. Потенцијалне промене морфологије мицелије посматране су на SEM и након третмана са натријум-ортованадатом.

4.7. Одређивање антирадикалске активности анализираних гљива

Антирадикалска активност релевантних екстраката одређена је *in vitro* спектрофотометријским тестовима. У свим примењеним методама биолошки потентна једињења гљива (најчешће фенолна једињења) представљају доноре електрона чиме редукују реактивни облик јона слободних радикала. Реакције су праћене спектрофотометријски, променом апсорбанце на карактеристичним таласним дужинама што је праћено и променама боја анализираних узорка (Multiskan GO Thermo Scientific, Финска). За контролу је коришћен растварач уместо екстракта, док су за позитивну контролу коришћени различити комерцијални стандарди у зависности од примењене методе.

Све испитиване концентрације рађене су у трипликату, а коначан резултат је изражен као средња вредност три мерења \pm с.д.

4.7.1. ОН радикал

Капацитет неутралисања хидроксил (ОН) радикала одређен је праћењем реакције деградације деоксирибозе методом Gutteridge-a (Halliwell *et al.* 1987). Хидроксил радикали се прво генеришу Фентоновом реакцијом водоник пероксида (H_2O_2) и Fe^{2+} феро-јона. Потом у анаеробној средини настали ОН радикали одузимају Н-атом од 2-деоксирибозе градећи малондиалдехид (MDA) који реагује са тиобарбитурном киселином (ТВА) градећи обојен ружичаст комплекс који се развија након 10 min кувања на 100°C и потом читава спектрофотометријски на 532 nm. Резултати су изражени преко IC_{50} вредности

(концентрација при којој је неутралисано 50% радикала), а резултат је приказан као средња вредност три одређене $IC_{50} \pm$ с.д. ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

4.7.2. O_2^- радикал

Капацитет неутралисања супероксид анјон радикала испитиваних екстраката одређен је редукцијом нитроблу-тетразолијум плавог (NBT) и никотинамид аденин динуклеотид у присуству феназинметилсулфата (Nishikimi *et al.* 1972). Феназинметилсулфат понаша се као преносилац електрона утичући на механизам редукције, а током његове реоксидације са кисеоником долази до формирања супероксид анјон радикала који редукује NBT у формазан (NBT-H редуковани облик) који је плаве боје. Количина неутралисаних радикала прати се на 560 nm и пропорционална је смањењу интензитета плавог обојења у контроли. Резултати су изражени као вредности IC_{50} односно као средња вредност три одређене $IC_{50} \pm$ с.д. ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

4.7.3. NO радикал

Натријум нитропрусид у воденом раствору представља извор NO радикала при физиолошком рН јер реагујући са кисеоником даје нитритне јоне. Нитритни јони са Griess-овим реагенсом дају пурпурно-ружичасти комплекс, а присуство нитритних јона се одређује при 546 nm (Green *et al.* 1982).

4.7.4. DPPH радикал

Одређивање капацитета неутралисања DPPH радикала изведено је према методи Espin и сарадника (2000). Метода се заснива на трансформацији љубичасто обојеног DPPH радикала који се у присуству антиоксиданаса редукује у DPPH-H форму жуте боје. Након инкубације (30 min у мраку, на собној температури) интензитет апсорбације је праћен на 515 nm. Синтетички антиоксиданс бутиловани хидроксианизол (енг. butylated hydroxyanisole - BHA) је коришћен као позитивна контрола. Капацитет неутралисања радикала је изражен као IC_{50} вредност $\mu\text{g}/\text{mL}$ (концентрација екстракта која је потребна да неутралише DPPH радикала за 50%). Ниже вредности резултата указују на већи капацитет екстраката у хватању слободних радикала.

4.7.5. ABTS радикал

ABTS тест служи за одређивање неутралисања ABTS радикала који настаје у реакцији оксидације 2,2'-азинонбис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонске киселине) са амонијум-персулфатом (Arnao *et al.* 1990). Спектрофотометријски се прати трансформација плаво-

зелено обојеног катјонског радикала ABTS у неутралну, безбојну форму на 734 nm. Резултати су добијени на основу калибрационе криве стандардног раствора тролокса и изражени као mg екв T/g с.м.

4.7.6. Одређивање антиоксидативног капацитета аскорбил радикала (Asc)

Анализа полисахаридних екстраката гљива урађена је на EPR спектрометру (Bruker Elexsys II EPR) у X– области. Детектован је аскорбил радикал (Asc радикал) који је настао у Фентон-овој реакцији у присуству аскорбата. Резултати се изражавају преко процента релативане инхибиције (% RI) (Мојовић, 2006).

4.8. Одређивање антиоксидативне активности гљива методом НРМС

Поларографска мерења у овом раду обављана су поларографским уређајем „PAR“ (Princeton Applied Research) 174A са прикљученим X-Y писачем (Houston Instruments, Omnigraph 2000) за аутоматско бележење поларографских i-E кривих. Електродни систем електролитичке ћелије састојао се од три електроде:

- радне капљуће живине електроде (КЖЕ) капиларних карактеристика (маса живе истекле из капиларе у једној секунди) $m = 2,5 \text{ mg/s}$, при висини Hg резервоара од 75 cm,
- референтне, засићене каломелске електроде (ЗКЕ),
- платинског (Пт) лима као помоћне електроде.

Коришћена је поларографска ћелија запремине 30 mL. Програмирано време капања (τ) КЖЕ од 1 s подешено је инструментом. Брзина промене поларизујућег напона износила је 10 mV/s, а почетни потенцијал био је 0,1 V према ЗКЕ. Промена потенцијала поларизације је усмерена ка негативнијим вредностима потенцијала. Сузбијање капацитивне компоненте струје i-E сигнала вршено је филтером инструмента на позицији 3 s. Струјна осетљивост била је 20 μA (пун отклон скале од 250 mm). Ради уклањања присутног кисеоника струја чистог азота пропуштана је кроз раствор у ћелији у трајању од 30 s. Током снимања одржавана је инертна атмосфера (струја азота изнад раствора). По додатку узорка раствор је 20 s хомогенизован мешањем азотом. Поступак при раду био је следећи. У 20 mL раствора 5 mM пероксида у Clark Lubs пуферу (pH 9,8), узорци су додавани у аликвотима од 100 μL . Прво су снимане i-E криве полазног раствора пероксида, а затим након сваког додатог аликвота. Аликвоти од 100 μL изазивали су равномерно смањење струје пероксида. Мерен је интензитет, тј. висина граничне струје основног анодног пика пероксида (i_{i0}), као и висина пикова добијених по сваком додатку узорка (i_{ir}). Израчунато је

смањење струје пика по сваком додатку појединачно. Процент смањења почетне струје водоник пероксида је израчунат по једначини:

$$HPMC (\%) = \left(1 - \frac{i_p}{i_{p^0}}\right) \times 100$$

Конструисан је график зависности процента смањења граничне струје од запремине, односно масе додатог екстракта, тј. броја молова чистог једињења. Активност узорка изражена је као нагиб праволинијског дела те зависности.

4.8.1. Метода FRAP

FRAP (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power) метода служи за одређивање редукционог потенцијала гљива према Benzie и Strain-у (1999). Редукциони потенцијал израчунат је на основу реакције редукције гвожђе(II)-2,4,5-трипиридил-с-триазин комплекса. Настала Fe^{2+} једињења координисана лигандом дају плаво обојени комплекс Fe^{2+} -TPTZ (гвожђе-трипиридил триазин) који се детектује на таласној дужини од 593 nm. Резултати су добијени на основу калибрационе криве (зависност апсорбанце од концентрације) стандардног раствора аскорбинске киселине, а резултат је изражен као средња вредност три мерења \pm с.д. (mg ек. аскорбинске киселине/g с.м.).

4.9. Одређивање антимицробне активности екстраката

За одређивање антимицробне активности хлороформских ($CHCl_3$), етанолних (EtOH) метанолних (MeOH) и полисахаридних (ПСХ) екстраката гљива ПТ, М и Ф, као и стандардних антибиотика и антимицотика употребљена је микродилуциона метода, *in vitro* (CLSI 2003). Ова метода представља брзу квантитативну методу за одређивање минималне инхибиторне концентрације (MIC) и минималне бактерицидне концентрације (MBC) (Bogavac *et al.* 2015; 2017; Karaman *et al.* 2017). Вредност MIC представља најмању тестирану концентрацију узорка која инхибише раст бактерија, а вредност MBC најмању тестирану концентрацију узорка која доводи до њихове смрти. MIC и MBC вредности се одређују као резултати метаболичких активности бактерија које дефинише једињење 2,3,5-трифенил тетразолијум хлорид (ТТС) који индукује ћелијску респирацију. ТТС се дехидрогеназама вијабилних бактерија редукује до формазана црвене боје, па ако у коморици микротитар плоче не дође до промене боје, значи да нема вијабилних бактерија, те да се дати узорак може даље користити за одређивање вредности MBC. Антибактеријска активност „скринована“ је на десет тестираних сојева бактерија (пет Грам-негативних и пет Грам-позитивних) (Табела 4.3).

Суспензија бактерија у антимикуробном „скрину“ припремљена је према стандарду 0,5 McFarland за бактерије и гљивице рода *Candida* (4950 µL хранљивог/сладног бујона и 50 µL бактерија/*Candida* стандард McFarland суспензије).

Табела 4.3 Тестирани сојеви бактерија

Назив бактерије	Бојење по „Gram“-у
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^{ATCC 35544}	Грам-негативна
<i>Escherichia coli</i> ^{ATCC 11229}	Грам-негативна
<i>Salmonella enteritidis</i> ^{ATCC 13076}	Грам-негативна
<i>Proteus mirabilis</i> ^{ATCC 12453}	Грам-негативна
<i>Proteus mirabilis</i> HI*	Грам-негативна
<i>Staphylococcus aureus</i> HI*	Грам-позитивна
<i>Bacillus subtilis</i> ^{ATCC 6633}	Грам-позитивна
<i>Staphylococcus aureus</i> ^{ATCC 6538}	Грам-позитивна
<i>Enterococcus faecalis</i> ^{ATCC 19433}	Грам-позитивна
<i>Micrococcus luteus</i> ^{ATCC 9431}	Грам-позитивна

* HI изолат хуманог порекла

Сојеви хуманог порекла су добијени са Института за јавно здравље Војводине, љубазношћу пацијената и ред. проф. др Миријане Богавац (употреба одобрена од стране Етичког Одбора Медицинског факултета).

Антибиотици (Sigma, Швајцарска) употребљени за одређивање минималне инхибиторне концентрације бактерија су: ампицилин (група пеницилинских антибиотика, β-лактами), стрептомицин (група аминогликозида), канамицин (група аминогликозида), хлорамфеникол (група аминогликозида). Почетна концентрација антибиотика била је 5 mg/mL. Потом је припремљена серија двоструких разређења, до финалне испитане концентрације 0,01 mg/mL.

Антифунгална активност „скринована“ је на пет култура рода *Candida*:

- *Candida albicans*^{ATCC 10231}
- *Candida albicans* L (лабораторијска)
- *Candida albicans* III (хуманог порекла)
- *Candida albicans* IV (хуманог порекла)
- *Candida albicans* V (хуманог порекла)

За антифунгални „скрин“ плесни анализирани фитопатогене гљиве изоловане су из заражених ченова белог лука (*Allium sativum* L.) и семена соје (*Glycine max* L. Merrill) са симптомима трулежи са огледних поља Института за ратарство и повртарство Универзитета у Новом Саду. Изоловане и окарактерисане културе *Alternaria radwickii*, *Fusarium proliferatum 1*, *Fusarium proliferatum 2*, *Fusarium verticillioides* и *Fusarium graminearum* су

биле засејане на PDA подлози 7 дана на 27°C, ради спорулисања. За бројање спора у суспензији коришћена је класична метода микроскопирања и Bürker Türk-ова комора.

Скупљене споре са подлоге су ресуспендоване у стерилној дестилованој води како би се направила почетна суспензија спора гљива густине око $1,5 \times 10^7$, по следећој формули:

$$\rho = \frac{N_p}{N_k * V_k} * 1000$$

Где су:

- ρ – густина ћелија у суспензији
- N_p – број пребројаних ћелија
- N_k – број комора
- V_k – запремина коморе

Према стандардизованој методи (CLSI 2003, CLSI 2007) у сваки вел микротитар плоче аплицирано је по 10 μL екстракта гљива различите концентрације и 100 μL бактерија/*Candida* суспензије са бујоном. Укупна запремина у велу износила је 101 μL . Једино је у скрину са фитопатогеним гљивама било аплицирано 50 μL екстракта гљива различите концентрације и 50 μL хранљивог бујона (Сладни бујон, Торлак, Србија) са 1 μL суспензије спора фитопатогених гљива. Финални опсег концентрација „скринованих“ екстраката кретао се од 1,13 до 18,18 mg/mL, за бактерије и квасце (*Candida-e*), а антибиотика и антимицотика од 0,01 до 0,50 mg/mL. На сваку бактерију/гљивицу тестирана је серија разређења од пет концентрација екстраката, у три понављања. Затим су микротитар плоче инкубиране у термостату, у трајању од 18-24 h, на температури од +37°C за бактерије и квасце и +26°C за плесни. Као позитивна контрола употребљена је суспензија бактерија/квасаца/спора гљива и бујон, за негативну контролу чист бујон, док је за контролу растварача употребљен растварач и суспензија бактерија/квасаца/спора гљива.

По инкубацији, у бунарчиће са бактеријама је додат 1% ТТС, а микротитар плоче су додатно инкубиране 2 h на истој температури. Појава црвене боје указала је на раст микроорганизама у бунарчићима (Eloff, 1998). Тако је, у ствари, одређена вредност МИС као прва концентрација екстракта при којој није дошло до развоја црвене боје, односно појаве раста. За потребе одређивања вредности МВС, необојена запремина бунарчића по третману ТТС (100 μL) аплицирана је на Петри плочу са хранљивим агаром (Muller-Hinton/сладни агар) која је затим инкубирана у термостату, на температури +37°C. По инкубацији од 24 h за бактерије, 48 h за сојеве гљивице рода *Candida* пребројане су израсле колоније. Док је инкубација за плесни била на темп. +26°C током 72 h, након чега чега је

визуелно праћена појава спора у бунарчићима и први бистри бунарчићи без спорулације су пребацивани на плоче Сланог агара ради утврђивања MFC (минималне фунгицидне) вредности.

Нистатин је коришћен као антимикотик (нистатин таблете, 500.000 i.j., Hemofarm, Вршац, Србија). Дата супстанца спада у полиенске антимикотике и делује на нивоу ћелијске мембране. Конкретно, везује се за стероле (ергостерол) ћелијске мембране и тиме ремети њену пермеабилност заједно са транспортним активностима, што води ка смрти ћелија гљивица.

Припрема антимикотика: 1 таблета (100 mg) раствори се у 20 mL стерилне дециловане H₂O (прерачунавање, 500.000 i.j = 100 mg, шток раствор почетне концентрације 5 mg/mL) дати раствор затим се профилира кроз стерилан филтер Minisart (Sartorius stedim biotech, Немачка) порозности 0,20 µm, због стерилизације раствора таблете.

По истом принципу у сваки вел микротитар плоче било је аплицирано и по 10 µL антибиотика/антимикотика различите концентрације и 100 µL бактерија/Candida суспензије са бујоном. Финални опсег концентрација испитиваних антибиотика и антимикотика кретао се од 0,01 до 0,50 mg/mL.

Сви добијени резултати обрађени су параметријском анализом у програмском пакету STATISTICA (StatSoft, Inc. (2013), version 12.0).

4.10. Анти-ацетилхолинестеразна активност

Спектрофотометријско одређивање ацетилхолинестеразне (AChE) инхибиторне активности у течним условима примењено је према Ellman-у и сарадницима (1961). Укратко, ацетилхолин јодид пореклом из електричне јегуље (Sigma Aldrich EC 3.1.1.7) коришћен је као вештачки супстрат за AChE ензим. Ацетилхолин јодид се под утицајем AChE ензима разлаже на тиохолин и ацетат, а тиохолин даље реагује са дитиобензоатом и гради комплекс жуте боје. После 10 min инкубације, спектрофотометријски је очитана апсорбанца на 412 nm. Резултати су изражени у процентима (%) AChE инхибиторне активности, а активност ензима генерално се изражава као степен тј. количина супстрата (у молима) утрошена од стране познате количине ензимских јединица у одређеном временском интервалу. У овом случају, то би била количина ацетилхолин јодида коју је AChE утрошио за 10 min.

У сваки бунарчић аплицирано је: 20 µL екстраката гљива и 150 µL Елмановог реагенса (са супстратом ацетилхолин јодидом) и инкубира 12 min на 25°C. Након

инкубације 50 μL ензима AChE са фосфатним пуфером рН 8 додато је у плејт (на леду, да би се одложила ензимска рекација) и потом је мерена апсорбанца 15 мерења на сваки min . Као позитивна контрола коришћен је комерцијални терапеутик донезепил (Донецепт, Здравље, Лесковац).

Инхибиција ензимске активности израчунава се на основу измерених апсорбанци, по следећој формули:

$$\text{Инхибиција AChE (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Аузорка}}{\text{Аконтроле}} \right) \times 100$$

Где су:

- Инхибиција AChE (%) – проценат инхибиције ензима ацетилхлоринестеразе изражен у процентима
- Аузорка – апсорбанца узорка при одређеној концентрацији екстракта
- Аконтроле - очитана апсорбанца контроле без екстракта

4.11. Ћелијска култура

Континуална линија хуманих хепатома ћелија изолованих из хепатоцелуларног карцинома јетре (HepG2) (ATCC HB-8065) добијена је од колега из Лабораторије за хуману биомедицину, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Београд. Ћелије су одржаване у T-75 cm^2 фласку са MEM (eng. Minimum Essential Medium Eagle) медијумом (Sigma-Aldrich, Немачка) са додатком NaHCO_3 (1,5 g/L), $\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$ (0,11g/L), стрептомицина (100 mg/L), пеницилина (100 000 IU/L), HEPES пуфера (10 mM) и 10% феталног говеђег серума FBS (енг. Fetal Bovine Serum), рН 7,4.

Ћелијска линија инсулинома бета ћелије пацова (*Ratus norvegicus*) (Rin-5F) (ATCC-CRL-2058) (добијена љубазношћу др Мелите Видаковић, Одељење за молекуларну биологију, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Београд).

Rin-5F ћелије су одржаване у T-75 cm^2 фласку у RPMI 1640 (енг. Roswell Park Memorial Institute (PAA Laboratories GmbH, Немачка) медијуму са, феталним говеђим серумом (10%) и антибиотицима комбинација стрептомицина (100 mg/L) и пеницилина (100 000 IU/L) (Sigma-Aldrich, Немачка).

Обе ћелијске линије гајене су на температури 37°C у атмосфери од 5% CO_2 , а након достизања потпуне конфлуентности, пасажирани су поново.

4.12. Тест вијабилности ћелија

Вијабилност ћелија HepG2 и Rin-5F након третмана екстрактима гљива испитана је 3-(4,5-Диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) тестом (Mosmann, 1983).

HepG2 ћелије сађене су у стерилне плоче са 96 бунарића равнoг дна (Thermo Fisher Scientific), 15.000 ћелија по бунарићу и инкубиране 24 h на 37°C. Након уклањања преконоћног медијума у сваки бунарић додато је 100 µL свежег медијума и 100 µL третмана (екстракта гљива различитих концентрација). Плоче су враћене на инкубацију 37°C у CO₂ инкубатор (са 5% CO₂). На HepG2 ћелијама испитани су ефекти H₂O и ПСХ екстракта ПТ, М и Ф гљива након 24 h и 72 h. Екстракти обе врсте испитани су у распону концентрација 33,30-900 µg/mL за H₂O и нешто нижим концентрацијама 25-450 µg/mL за ПСХ екстракте.

Rin-5F ћелије сађене су у стерилне плоче са 96 бунарића равнoг дна (Sarstedt, Немачка). Сађено је 50.000 ћелија по бунарићу и инкубирано 24 h на 37°C, у CO₂ инкубатору. Након периода инкубације одливен је медијум из бунарића и додато је 100 µL свежег медијума и 100 µL третмана гљива у различитим концентрацијама. Испитани су H₂O и ПСХ екстракти гљива у опсегу концентрација 33,33-900 µg/mL. Инкубација са третманом гљива трајала је 24 и 72 h.

Након инкубације ћелија са екстрактима (у временским периодима од 24 и 72 h) одливен је медијум и додато је 100 µL МТТ-а (Sigma, M5655) који је растворен у медијуму (0,005 mg боје растворено у 1 mL медијума). Принцип МТТ есеја се заснива на редукцији МТТ-а у присуству митохондријалног ензима *сукцинат дехидрогеназе* до формаза (обојеног комплекса) који се детектује спектрофотометријски. Инкубација МТТ-а са ћелијама траје 3 h, на 37°C у CO₂ инкубатору (Series 8000 WJ, Thermo Scientific), након чега је МТТ медијум одливен и у сваки бунарић је додато по 100 µL 0,04 M HCl у изопропанолу након чега је следила инкубација 10 min на 25°C. Апсорбанца је мерена на две таласне дужине: 540 и 690 nm, при чему је 690 nm референтна таласна дужина.

Вијабилност ћелија изражена је у процентима, након поређења са ћелијама које су расле у контроли, за које се сматра да су 100% вијабилне.

4.13. Хемијска карактеризација и квантитификација анализираних гљива

Хемијска карактеризација испитиваних екстраката гљива урађена је спектофотометријским методама за одређивање укупног садржаја фенола, флавоноида, протеина и полисахарида. Такође, примењене су и методе течне хроматографије - масене спектрометрије (LC-MS) за одређивање укупног садржаја фенолних киселина у анализираним екстрактима и гасне хроматографије - масене спектрометрије (GC-MS) за одређивање садржаја масних киселина у анализираним гљивама. Употребом планарне хроматографије и FTIR спектроскопије карактеризовани су ПСХ екстракти гљива, док је атомска апсорпциона спектрофотометрија AAS коришћена за одређивање биогених елемената код обе гљиве.

4.14. Одређивање укупног садржаја фенола

Садржај укупних фенола одређен је по методи Singleton-а и сарадника (1999). Метода је заснована на реакцији фенола са Folin-Ciocalteu-овим реагенсом (смеша Na_2WO_4 , Na_2MoO_4 , HCl , H_3PO_4 и LiSO_4) где се формира обојени комплекс, чија апсорбанција се мери на 760 nm, гална киселина (Sigma-Aldrich, Немачка) је коришћена као стандард. Резултати су изражени као mg ек. галне киселине/g с.м (mg ек. ГК/g с.м).

4.15. LC-MS идентификација и квантификација фенолних киселина

Фенолни профил свих екстраката гљива (конц. 2 mg/mL) и фенолних стандарда (конц. 1,53 - 25,03 ng/mL) анализирани су употребом HPLC-MS/MS методе према Orčić *et al.* (2014) помоћу „Agilent Technologies 1200 Series HPLC куплованог са Agilent Technologies 6410A QqQ ESIMS-ом“. Фенолни стандарди су били квалитета Sigma Aldrich Chem (Steinheim, Немачка), Fluka Chemie GmbH (Buchs, Швајцарска) и Chromadex (Santa Ana, SAD). Једињења су одвојена на Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 mm ×4,6 mm, 1,8 μm) колони (убризгавајући волумен био је 5 μL; на 50°C; проток од 1 mL по min) у градијент моду (0 min 30 % B, 6 min 70 % B, 9 min 100 % B, 12 min 100 % B, стартно време 3 min). Параметри извора јона били су следећи: притисак распршивача гаса 40 psi, проток сушења 9 L по min, темп. 350 °C, капиларни напон 4 kV. Оптимизација осталих параметара је идентична као у раду Orčić *et al.* (2014). Области пикова су одређене Agilent MassHunter Workstation software- Qualitative Analysis (ver. B.04.00.), а калибрационе криве су нацртане у OriginLabs Origin Pro (ver. 8.0).

4.16. Одређивање укупног садржаја флавоноида

Одређивање укупног садржаја флавоноида рађено је према методи Chang и сарадника (2002). Метода се заснива на особинама флавоноида и флавогликозида да са јонима метала дају одговарајуће комплексе, а нарочито је значајан Al-комплекс, који гради обојен комплекс са апсорпционим максимумом на 430 nm. Кверцетин је коришћен као стандард.

4.17. Одређивање укупног садржаја протеина

Квантитативни садржај протеина одређен је помоћу методе по Bradford-у (1976) према калибрационој криви стандардног раствора BSA (енг. bovine serum albumine) (Sigma-Aldrich, Немачка). Садржај протеина је одређиван само у воденим екстрактима, где се очекивало њихово присуство.

4.18. Одређивање укупног садржаја угљених хидрата

Одређивање садржаја угљених хидрата рађено је модификованом методом Monsigny-ја и сарадника (1988) у микротитар плочи, пошто нема методе за директно одређивање укупних полисахарида (Masuko *et al.* 2005).

4.19. FTIR спектроскопија полисахарида

FTIR - инфрацрвена спектроскопска метода са Фуријеовом трансформацијом (енг. Fourier transform infrared spectroscopy) је спектроскопска метода која обухвата инфрацрвену област за карактеризацију полисахарида. За карактеризацију су коришћени лиофилизоване полисахариди (изоловани из ПТ, М и Ф обе испитиване врсте). Од ПСХ направљени пелати са калијум бромидом (KBr) у односу 1:100. FTIR спектри су снимани на спектрофотометру Thermo-Nicolet Model 6700 FT-IR (Thermo Scientific, USA) у спектралној области 4000-400 cm^{-1} у ATR (енг. attenuated total reflectance) моду, коришћењем софтвера OMNIC 7.3.

4.20. Планарна хроматографија

Папирна хроматографија хидролизата полисахаридних узорака рађена је силазном техником на папиру Whatman No.1 у систему развијача (v/v) етил-ацетат-пиридин-вода (2,5:1:2,5 vvv). Шећери су детектовани на папирном хроматограму са сребро нитрат-натријум хидроксидом. Као стандарди су коришћени D-глукуронска киселина, D-галактоза, D-глукоза, D-маноза, D-фукоза, D-ксилоза, D-арабиноза и D-рамноза.

Урађена је и елементарна анализа, односно хемијско разлагање полисахарида на основне молекуле угљеника, водоника, азота и сумпора. Садржај С, Н, N, S анализиран је на аутоматском анализатору „Vario EL III CHNS/O Elementar analyze firme Elementar“.

4.21. Квалитатива и квантитативна елементарна анализа

Атомском апсорпционом спектрофотометријом (AAS) утврђено је присуство одређених макро - (К, Са и Mg) и микро - (Cu, Ni, Cd, Pb, Cr, Mn, Fe и Zn) елемената. Припрема узорка гљива била је према методи Borišev и сарадника (2016). Употребом пламеног атомског апсорпционог спектрофотометра (Atomic Absorption Spectrophotometer, model FS AAS240/GTA120, Varian) са ацетилен-ваздушном пламеном техником (темп. око 2300°C или 2700 °C за детекцију различитих елемената, са катодним лампама при таласним дужинама од 324,8; 285,2 и 422,7 nm). Садржај елемената је изражен у mg/kg суве масе гљиве (с.м.).

4.22. GC-MS идентификација и квантификација масних киселина

Припрема и детекција масних киселина гасном хроматографијом извршена је према методи Milovanović *et al.* (2012). Као растварач употребљен је n-хептан, а за инертизацију и ослобађање метил естара масних киселина од остатака растварача примењивано је упаравање у струји азота. Припремљени узорци анализирани су на гасном хроматографу GC) Agilent 7890A system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) са пламено-јонизујућим детектором (FID – Flame Ionization Detector) и ауто-ињектујућим системом за течности, на капиларној колони од мешане силике (Supelco SP-2560 Capillary GC Column 100 m x 0,25 mm d=0,20 µm). Као гас носач употребљен је хелијум чистоће 99,9997 vol %, при протоку од 1,5 mL/min и притиску од 1,092 bara. Узорци су убризгавани у колону у такозваном „split“ режиму, чији је однос износио 30:1. Примењени температурни режим био је 40, 195, 205 и 230°C. Укупно време анализе износило је 41,311 min.

Пикови метил естара масних киселина идентификовани су поређењем ретенционих времена (RI) из узорка са RI из стандарда „Supelco 37 component fatty acid methyl ester mix“ као и са интерним подацима добијеним у претходним испитивањима масних киселина на гасном хроматографу са масеним детектором. Добијени резултати изражавани су као маса појединачне масне киселине или групе масних киселина (g) у 100 g масних киселина из узорка.

5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

5.1. Молекуларна идентификација гљива

Иницијално мицелија *C. comatus* била је изолована из шешира плодног тела са локалитета Дунава (Бећарац) (12-00716), док је мицелија *C. truncorum* била изолована из шешира плодног тела са локалитета Фрушка гора – Каменички парк (Табела 5.1). Са истог локалитета (Фрушка гора – Каменички парк) од лиофилизованих плодних тела *C. truncorum* направљени су екстракти ПТ, док су екстракти ПТ *C. comatus* добијени са локалитета Сремски Карловци.

Табела 5.1. Преглед порекла изолата анализираних екстраката

Локалитет	Тип екстракта
<i>C. comatus</i>	
Нови Сад – обала Дунава (Бећарац) (12-00716) изолована мицелија Дунав Бећарац - шешир (ДБ-Ш) Сремски Карловци (12-00704) Плодно тело лиофилизовано	CHCl ₃ , MeOH, EtOH, H ₂ O, ПСХ
	CHCl ₃ , MeOH, EtOH, H ₂ O, ПСХ
<i>C. truncorum</i>	
Фрушка гора – Каменички парк (12-00717) изолована мицелије (Каменички парк шешир-КП-Ш) и лиофилизовано плодно тело	CHCl ₃ , MeOH, EtOH, H ₂ O, ПСХ

Анализиране секвенце, две од ПТ (12-00704 и 12-00717) и две од изоловане М (ДБ-Ш и КП-Ш), упоређене су са секвенцама из референтне базе података NCBI - националног центра за биотехнолошке информације Сједињених Америчких Држава.

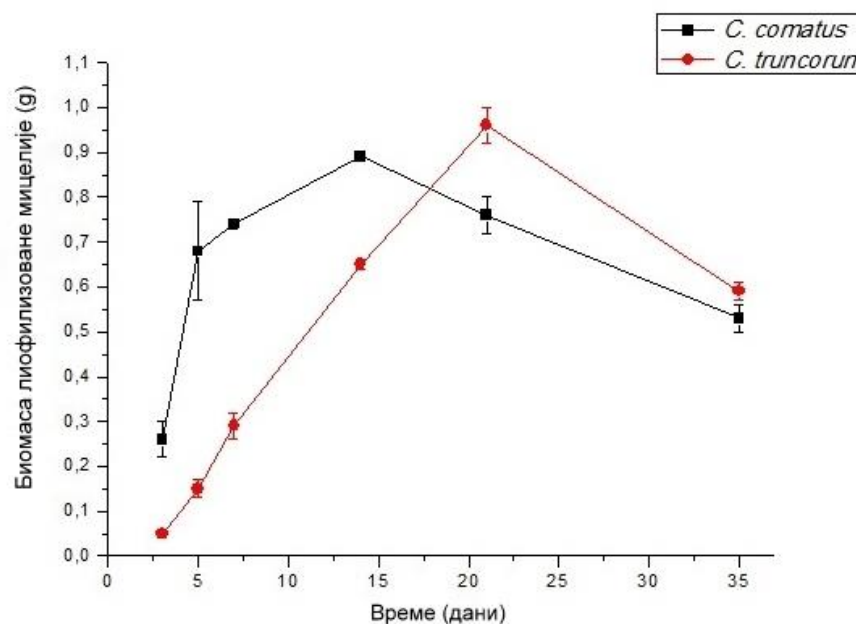
Хроматограми су обрађени у софтверу *FinchTV*, након чега је FASTA формат упоређен у NCBI бази података, где је потврђен идентитет ПТ и М обе врсте. Идентитет секвенци за анализиране врсте у BLAST претраживању био је 99%. На основу резултата секвенцирања потврђен је идентитет врста на молекуларном нивоу.

5.2. Метаболизам фосфата

Познавање метаболизма фосфата од великог је значаја јер детекција фосфорних комплекса открива присуство или одсуство метаболички релевантног елемента, фосфора, за функционисање ћелије. У узорцима мицелија обе гљиве помоћу ^{31}P NMR спектроскопије забележена су следећа једињења одговорна за енергетски статус ћелије:

- аденозин три фосфат (ATP)
- полифосфати (PolyP)
- никотинамид аденин динуклеотид (NADP) и
- уридин дифосфат глукоза (UDPG).

Раст мицелије и утврђивање активне фазе продукције биомасе праћени су преко крива раста мицелије обе врсте (Слика 5.1). Криве су конструисане на основу мерења добијених након 3, 5, 7, 14, 21 и 35 дана раста у потопљеном медијуму. Биомаса и филтрат су након одређеног временског периода филтрирани и лиофилизовани до сувог остатка. За сваку тачку криве рађена су три понављања.



Слика 5.1. Крива биомасе лиофилизоване мицелије након периода инкубације од 3 - 35 дана

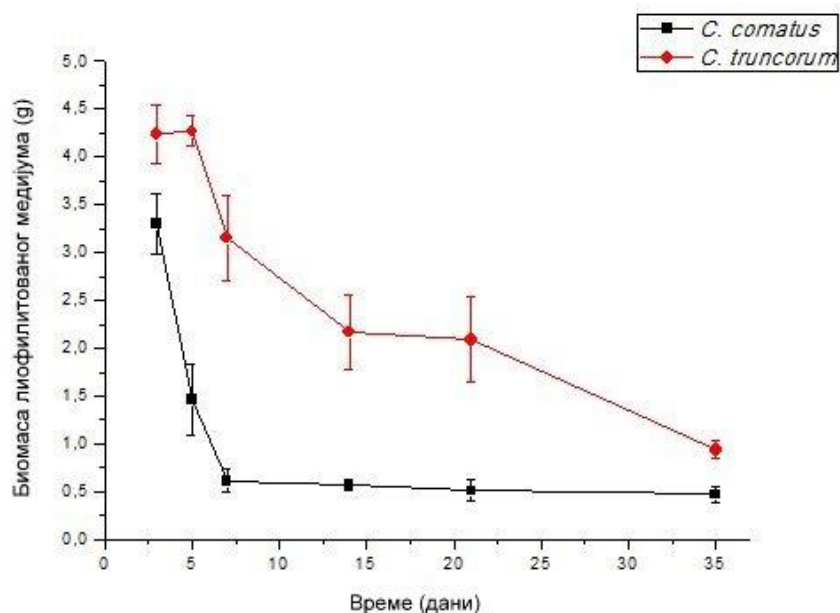
На криви биомасе мицелије (Слика 5.1) разликују се следеће фазе:

- почетна фаза раста мицелије (енг. lag или припремна фаза),
- затим експоненцијална фаза (енг. log или фаза интензивног раста мицелије)
- стационарна фаза и

- фаза одумирања.

Почетна фаза раста мицелије за врсту *C. comatus* трајала је веома кратко, већ након трећег дана раста у ферментационом медијуму уследила је нагла експоненцијална фаза до 7 дана, након чега се експоненцијална фаза наставила, али умеренијим растом. Прецизније, експоненцијална фаза раста мицелије *C. comatus* трајала је од 3. до 14. дана инкубације (укупно 11 дана). Врста *C. truncorum* достигала је експоненцијалну фазу постепено, тако да је експоненцијална фаза трајала од 5. до 21. дана инкубације (укупно 16 дана). Стационарна фаза се код обе врсте скоро не примећује пошто одмах након завршетка експоненцијалне започиње фаза постепеног одумирања. Фаза одумирања за *C. comatus* уследила је већ након 14. дана, а за *C. truncorum* тек након 21. дана култивације.

Од прикупљеног лиофилизованог филтрата направљене су криве које прате потрошњу медијума током времена (Слика 5.2).

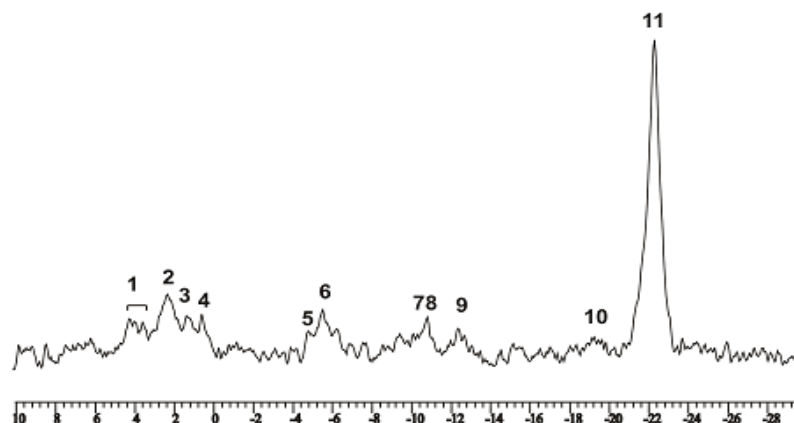


Слика 5.2 Крива биомасе лиофилизованог филтрата након периода инкубације 3 - 35 дана

Врста *C. comatus* за краће време достиже експоненцијалну фазу, али такође раније улази у фазу одумирања, што је у сагласности са потрошњом медијума (Слика 5.2). *C. comatus* бележи већу потрошњу медијума у првих 7 дана, док је код *C. truncorum* потрошња медијума постепена и прати постепено достизање експоненцијалне фазе.

³¹P NMR спектри снимани су за свеже мицелије са чврсте подлоге (*in vivo*) и за ћелијски перхлорни екстракт (*in vitro*) (за *C. truncorum*) у експоненцијалној фази раста, која је била од 3. до 14. дана за *C. comatus*, док је за *C. truncorum* експоненцијална фаза била од 7. до 21. дана инкубације.

На следећој слици приказан је спектар мицелије *C. comatus* са чврсте подлоге (Сладни агар - СЛ, Торлак) одмах након ресуспензије у експерименталном (минималном) медијуму (Слика 5.3).



Слика 5.3 Спектар *C. comatus* мицелије са чврсте подлоге након ресуспензије у експерименталном медијуму

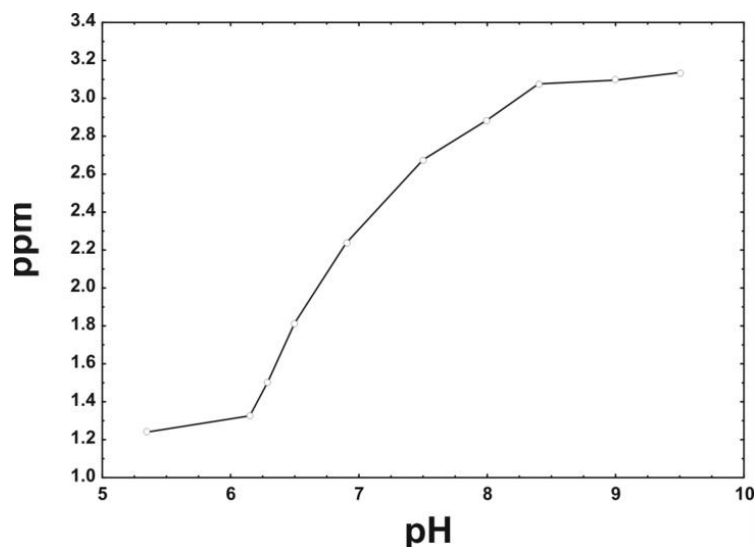
Детектовани су следећи сигнали:

- (1) сигнал позициониран на око 4 ppm припада шећерним фосфатима (енг. *sugar phosphates*, **SP**). Сигнали око 2,3 ppm и 1,2 ppm потичу од неорганских фосфата (енг. *inorganic phosphate*, **Pi**)
- (2) цитоплазматични (цитослони) (**Pic**) и
- (3) вакуоларни (**Piv**).
- (4) рН независни сигнал глицерофосфохолина (енг. *glycerophosphocholine*, **GPC**) се налази на 0,5 ppm и уједно представља интерни стандард редовног позиционирања у односу на друге сигнале у спектру.
- (5) сигнали γ -аденозинтрифосфата (γ -АТФ) и β -аденозиндифосфата (β -АДП) се јављају код -5,1 ppm
- (6) у чијој близини су детектовани сигнали пирофосфата и терминалних полифосфата (PolyP)
- (7) следећа два оближња пика на -10,0 и -10,5 (8) су сигнали настали од α -АТФ (први сигнал) и никотинамид аденин динуклеотида (енг. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, **NADP**) и уридин дифосфат глукозе фосфора (енг. *uridine-diphosphate glucose*, **UDPG**).
- (9) процењује се да сигнал на -12,4 представља други UDPG фосфор,
- (10) док су при -19 и -22,5 ppm присутни резонантни врхови из другог β -АТФ фосфора и (11) језгра дугог полифосфатног (PolyP) ланца.

Нарочито је интересантна област у којој се јављају сигнали неорганских фосфата (Pi) код *S. comatus* (1, 2, 3 и 4) јер код већине мерења у делу спектра који се приписује Pi појављује се сигнал који је подељен на два-три груба врха који је приближно једнаког интензитета и који указују на присуство бар два интрацелуларна депоа Pi. Депои Pi су важни зато што представљају резерву фосфата односно енергије код гљива, а најзначајнију улогу резерве фосфата имају PolyP у вакуоли (Kulaev *et al.* 1999).

Хемијски помак сигнала Pi у ^{31}P NMR спектру се може користити за одређивање интрацелуларног рН и може олакшати тумачење осталих сигнала (Hollander *et al.* 1981).

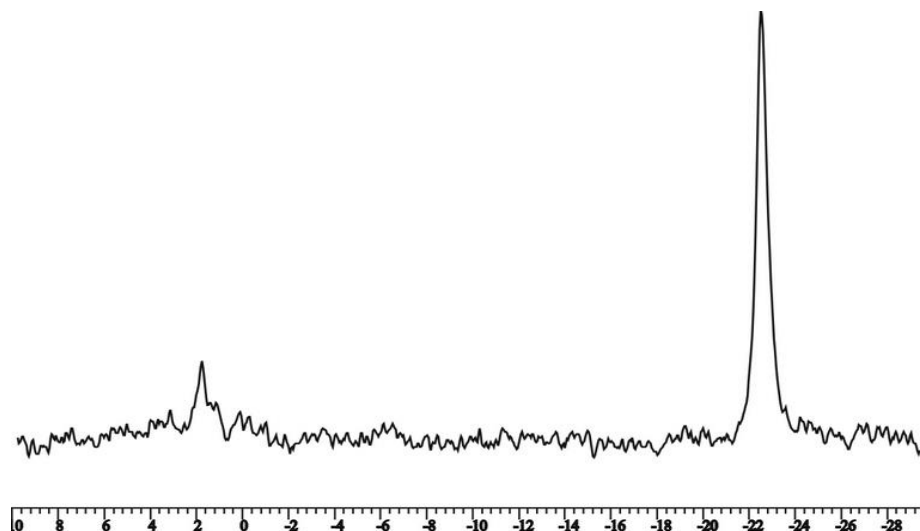
Употребом титрационе криве добијене по раније утврђеној процедури (Hollander *et al.* 1981) (Слика 5.4) сигнал на 2,3 ppm одговара „базнијем“ ћелијском одељку чији рН је процењен на 7,0, док је сигнал неорганских фосфата на 1,2 ppm осликавао „киселији“ ћелијски одељак (претпоставља се вакуоле) чији је рН износио око 6,2. Позиција сигнала SP на 4,2 ppm, који је такође рН-завистан, поклапа се са базнијим рН и у сагласности је са претпоставком да сигнал фосфата на 2,3 ppm потиче из цитосола (Pic). У прилог томе иде чињеница да су фосфатни шећери (SP) углавном акумулирани у цитоплазми (Navon *et al.* 1979; Pilatus & Techel 1991). Такође из добијених спектра може се констатовати значајна концентрација SP, значајних интермедијера метаболизма глукозе, чије промене могу указати на ефективност различитих инхибитора/стимулатора енергетског метаболизма.



Слика 5.4. Титрациона крива (Hollander *et al.* 1981)

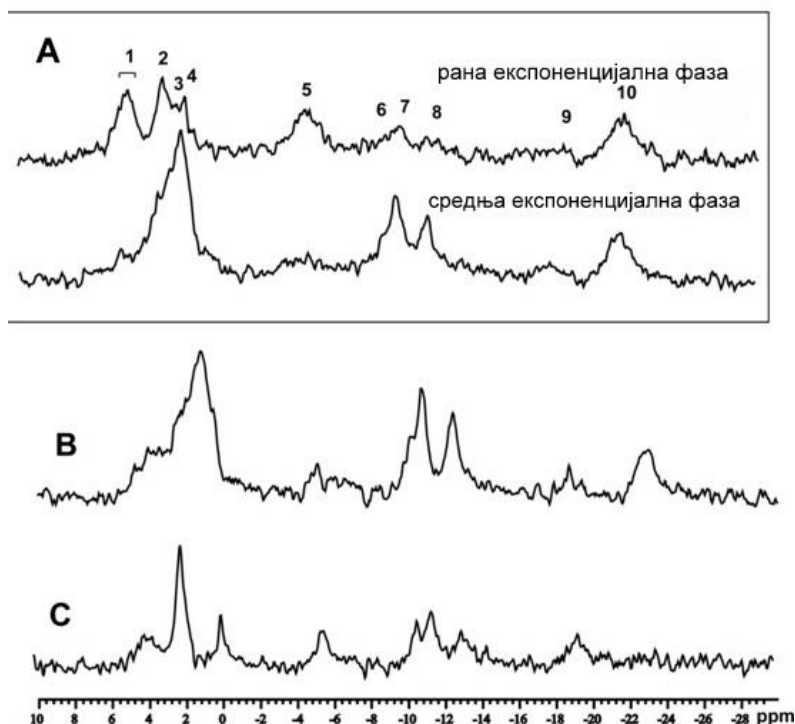
Спектар мицелије *S. truncorum* бележи пикове упоредивих интензитета са мицелијом *S. comatus* (Слика 5.5). Иако су идентични ATP, UDPG и NADP сигнали детектовани примећена је разлика у спектрима између ове две врсте. Она се односи на различите депое Pi. Код врсте *S. comatus* Pi је дистрибуиран у цитоплазми и вакуоли док се код *S.*

truncorum налази у истом одељку или је рН вредност између цитоплазме и вакуоле јако слична, готово идентична.



Слика 5.5 Спектар *C. truncorum* мицелије са чврсте подлоге након ресуспензије у експерименталном медијуму

Спектри врсте *C. comatus* гајене у течном медијуму у раној експоненцијалној фази (Слика 5.6 А) показују такође два пика P_i . Њихова позиција је у складу са рН вредностима цитосола које су добијене код исте врсте гајене на чврстој подлози. Ипак други P_i сигнал позициониран на 1,45 ppm може указивати на нешто „базнији“ (већи рН) у вакуоли. У средњој експоненцијалној фази раста мицелије (Слика 5.6 А доњи спектар) нема значајних разлика у позицији сигнала, али је дошло до промене интензитета нарочито у интензитету сигнала вакуоларних фосфата. Ипак највећа разлика забележена је у концентрацији фосфатних шећера (Слика 5.5 А). Интезитет сигнала SP за *C. comatus* у раној експоненцијалној фази био је већи за 54%. С тим у вези треба споменути да β АТР пик није био детектован у средњој експоненцијалној фази раста *in vivo* спектру, што је вероватно последица ниске осетљивости NMR-а *in vivo* услед ниске концентрације одређеног метаболита (Lyngstad & Grasdalen, 1993). β АТР је иначе индикативан за β АТР ниво услед преклапања остале две АТР резонанце са другим комплексима који садрже фосфор у ћелији (Castro *et al.* 1995).



Слика 5.6 Спектри *C. comatus* А, *C. truncorum* В и екстракта *C. truncorum* С са контролним мерењем

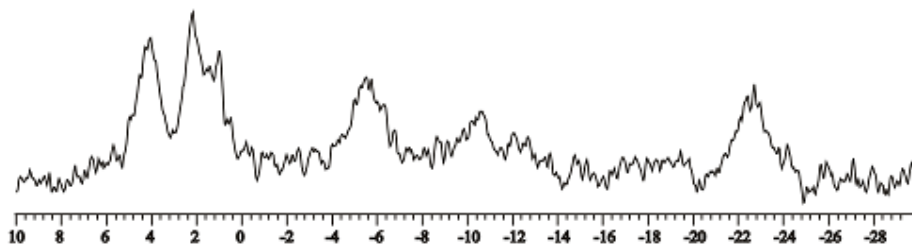
Фосфатне спектре *C. truncorum* гајених у течном медијуму карактерише слична прерасподела сигнала у спектру у средњој експоненцијалној фази приближно исти (Слика 5.6 Б). Због малог приноса биомасе, спектре ове врсте у раној експоненцијалној фази је било тешко снимити. Расподела неорганских фосфата у *C. truncorum* гајеном у течном медијуму је била између два ћелијска одељка, чије су рН вредности биле много сличније него код *C. comatus*. Да би се то потврдило снимани су NMR спектри екстракта мицелије на рН 7,0 (Слика 5.6 С). Ту су се два детектована пика P_i спојила у један пик P_i на око 2,3 ppm. Поменута позиција се поклапа са положајем P_{ic} у *in vivo* експериментима, што је у сагласности са предвиђеним рН вредностима за цитоплазму. Као и у претходним мерењима значајан део фосфата је акумулиран у облику полифосфата PolyP (енг. polyphosphate). Однос PolyP/ P_i код врсте *C. comatus* био за 32% нижи него код *C. truncorum*.

Генерално, на NMR спектру се може детектовати присуство PolyP преко три сигнала односно пика:

- 1. PPt (енг. terminate - терминални),
- 2. PPn (енг. penultimate - претпоследњи) и
- 3. PPs (енг. core residues - централни дуголанчани PolyP).

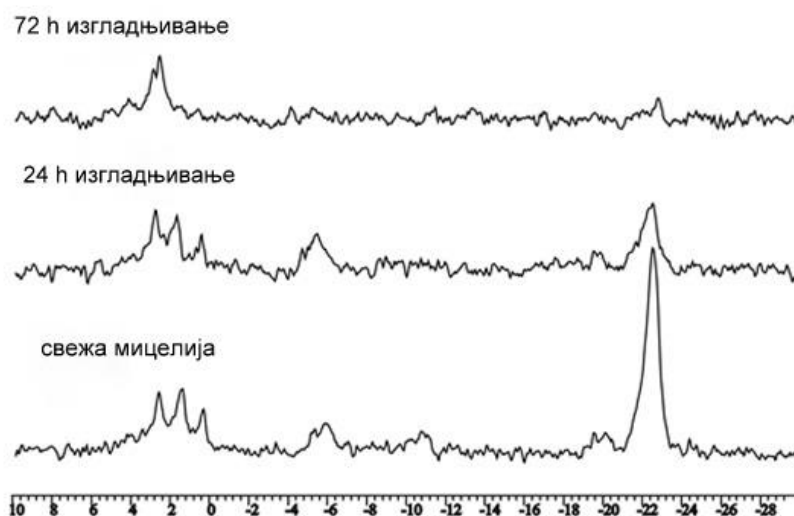
Најпоузданији знак за присуство PolyP у ћелији у погледу NMR детекције је пик концентрисан на око -22 ppm и приписује се PPs сигналу. Овај пик је један од најдоминантнијих сигнала у спектру, што указује на значајну присутност дугих ланаца PolyP у укупном садржају PolyP. PPs сигнал се може користи како за одређивање заступљености дугих ланаца PolyP у мицелији тако и за процену енергетског статуса мицелије. Однос PPs/Pi је у мерењима био око 0,98.

Детектовани сигнали за обе врсте са чврсте подлоге се разликују од сигнала који су добијени мерењем мицелије култивисане у потопљеном медијуму. Главне разлике код обе врсте су забележени екстремно високи пикови пореклом од PPs (Слика 5.7). Сигнал добијен мерењем са чврсте подлоге забележио је већи однос PPs/Pi за 67% у односу на мицелију у потопљеном медијуму. Примећен је и пад у интензитету сигнала SP, код мицелије која је расла на чврстој подлози сигнал се скоро и не детектује.



Слика 5.7 Спектар *C. soratus* експоненцијалној фази у течном медијуму

Интензитет PPs сигнала у спектрима мицелија које су расле на чврстој подлози је добар показатељ улоге PolyP у ћелији (због значајног PPs сигнала). Ниво PPs је након изгладњивања мицелије (медијум без извора угљеника) опао за 33% након 24 h, а чак за 78% након 72 h (Слика 5.8). Након 24 h ниво PPs је био смањен, али се интензитет PPs повећао што значи да је дошло до скраћивања дуголанчаних молекула PolyP услед њиховог трошења. Током даље изложености неповољним условима интензитет оба сигнала значајно је смањен, Pi је био најдоминантнији сигнал у спектру. Ово указује на PolyP као молекуле за складиштења енергије у овој врсти гљиве, а иста функција метаболита је потврђена и у студији са *S. cerevisiae* (Vagabov *et al.* 1998). Истовремено дошло је до нестајања сигнала Piv након потпуног слабљења PolyP пикова. Интензитет Pi је остао готово непромењен, али се сигнал померио, што указује на промену pH ка киселијој вредности и одражава узајамност између PPs и Piv, односно показује да је потреба за енергијом у неповољним условима обезбеђена хидролизом полифосфата. Ово запажање је у складу са улогом PolyP код врста *S. cerevisiae* и *N. crassa* (Yang *et al.* 1993) и *P. blakesleanus* (Žižić *et al.* 2014). Сигнал PPs и PolyP је такође био смањен што објашњава везу између Piv и PPs (дистрибуција Pi у истом одељку).



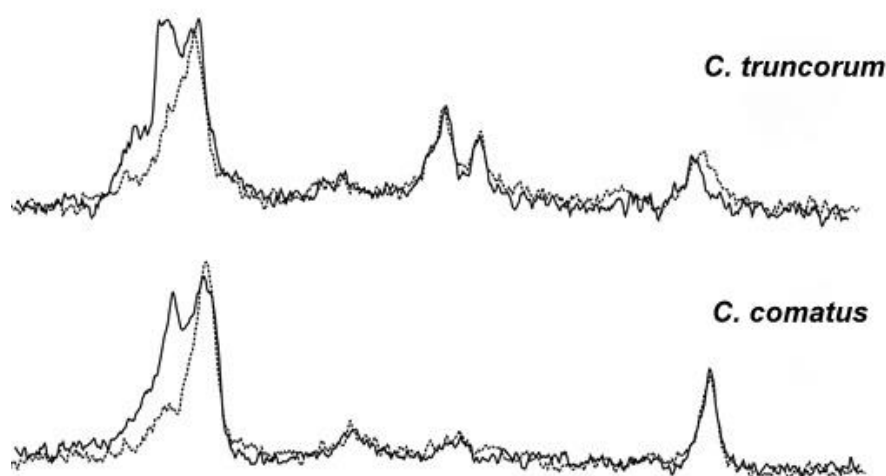
Слика 5.8 Спектри *C. comatus* и *C. truncorum* са чврсте подлоге након „изгладњавања“

Као што је и било претпостављено PolyP код обе испитиване врсте су се налазили у вакуолама, па је претпоставка да се и V као метални катјон акумулира у вакуоли, као и код раније испитиваних врста *P. blakesleanus*, *H. polymorpha* и *S. cerevisiae* (Mannazzu *et al.* 2000; Žižić *et al.* 2013; 2014).

5.3. Утицај ванадијума на метаболизам фосфата

Утицај V на метаболизам фосфата код обе врсте мицелије (са чврсте подлоге) праћен је ^{31}P NMR након третмана са 10 mM натријум-ортованадатом (Na_3VO_4). Прелиминарним мерењима је утврђено да веће количине овог једињења имају токсичан ефекат нарочито код врсте *C. comatus* гајене како на чврстој подлози тако и у течном медијуму. Наиме присуство V^{5+} је довело до промена у спектрима код обе врсте гајене на чврстој подлози. Нарочито су уочљиве промене у пиковима SP и Pi. Сигнал Pi се померио са 2,3 на 3,2 ppm, што указује на промену у повећању pH, док је пик SP веома ослабио. Запажено је и драстично смањење интензитета PPs сигнала што указује на неповољан утицај енергетског статуса ћелије.

Код мицелија које су расле у течном медијуму појавио се нов сигнал позициониран на 2,6 ppm, а сигнал SP је у порасту, што је више изражено код врсте *C. truncorum* (Слика 5.9). На први поглед, нови сигнал се може приписати P_{ic}, услед повећања pH који је настао након додавања V^{5+} . Међутим, потребно је узети у обзир потенцијално накупљање глукоза 1-фосфата (G1P) с обзиром да врста *Coprinus cinereus* има способност синтезе глукозе (Ji & Moore 2002).

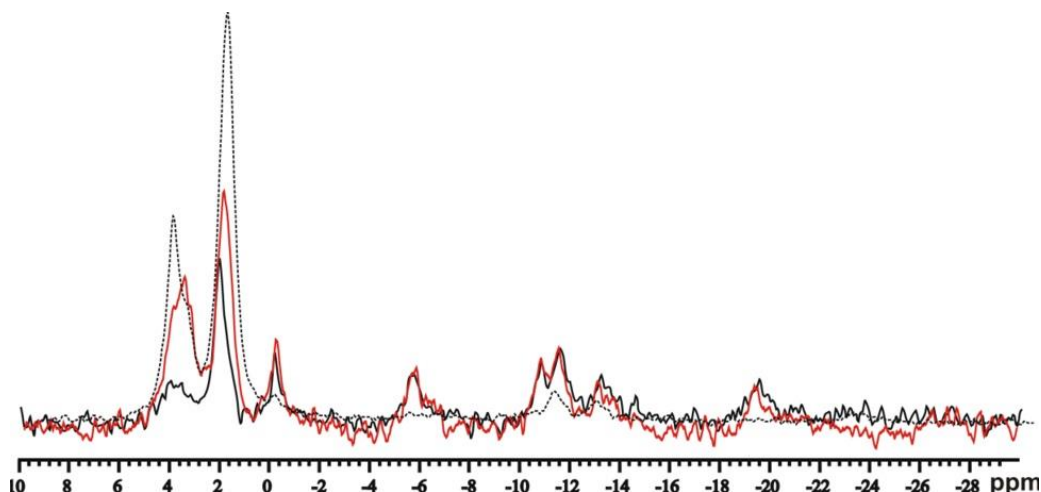


Слика 5.9 Спектар *C. comatus* и *C. truncorum* (испрекидана линија) и контроле (пуна линија) у течном медијуму са третманом ванадатом)

У контролним спектрима посебно код *C. comatus* појавио се сигнал око 4,2 ppm (испрекидана линија – Слика 5.9) који се појављује и у спектру код третмана мицелије (испрекидана линија), али у знатно слабојој мери. Ово указује на то да V^{5+} није изазвао промене рН у цитоплазми, тако да се пик који се појављује на 3,2 ppm може приписати једињењима чији се ниво у ћелији повећава након додатка V^{5+} на рачун P_i у ћелији.

Код врсте *C. truncorum* снимљен је и спектар перхлорног екстракта (рН 7) како би проверили претходне тврдње (Слика 5.10). Поклапање сигнала P_i у екстракту и у *in vivo* мерењима указује на то да је рН у цитоплазми око 7, а сви сигнали су задржали скоро идентичне положаје пикова након третмана са V^{5+} . Једино је сигнал SP (односно хексоза-6-фосфата) показао интензиван пораст, односно V^{5+} је довео до повећања интензитета тог сигнала за 96% (црвени спектар).

Сигнал G1P је био предвиђен на око 2,1 ppm, али је његова близина са сигналом P_i у неутралном рН екстракту отежала тачну идентификацију. Ипак, упоређивањем спектра мицелије третиране са G1P и G6P са спектрима екстракта контролне и третиране мицелије указује на скоро идентичност положаја сигнала у области око 2 ppm, у спектрима екстракта ванадатом третиране мицелије и спектра свежег мицелије третиране фосфатним шећерима. Ова чињеница иде у прилог претпоставци о акумулацији G1P након третмана ванадатом и јавља се вероватно као последица његовог инхибиторског ефекта на ензим фосфоглукомутазу (Tsiani & Fantus 1997).



Слика 5.10 Додатно мерење спектра *C. truncorum* са перхлорним екстрактом (црвене боје); Спектар представљен испрекиданом линијама је спектар мицелије са додатим G6P и G1P

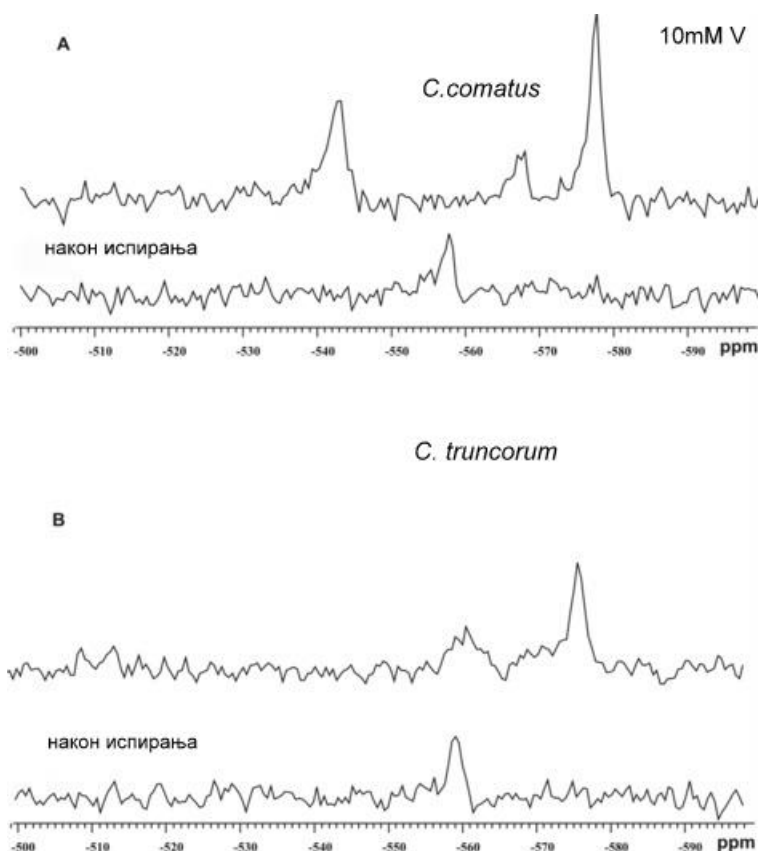
^{31}P NMR мерења показала су промене у концентрацији кључних метаболита који садрже фосфор. Даља идентификација метаболитички активних ванадатних стања је важна због најмање два разлога:

1. због препознавања форме V која условљава повећање концентрације SP
2. због детекције облика V који има токсични ефекат

^{51}V NMR може послужити као недвосмислена метода за одређивање рН у ћелијама које садрже ванадат, јер су сигнали мономера и димера рН зависни и њихова позиција у спектрима одсликава рН услове унутар ћелије (Crans, 2005).

Спектри мицелија обе врсте су мерени након додавања 10 mM Na_3VO_4 (Слика 5.11). Код обе врсте одређено је који облици ванадата су присутни интрацелуларно и које олигомерне врсте ванадата су присутне с обзиром на то да могу утицати на метаболизам. Најистакнутији пик код врсте *C. comatus* потиче од тетрамера ванадата и позициониран је на -577 ppm (Слика 5.11). Поред тога, примећени су сигнали на -559 ppm (мономер), -571 ppm (димер) и -585 ppm пентамер (Rehder, 2008; Žižić *et al.* 2016).

Након испирања (да би се утврдило који облици ванадата се налазе интрацелуларно) само је сигнал мономера на -559 ppm остао у спектру. Присуство мономера указује да је у том облику ванадат присутан у ћелији, док је пик тетрамера једва уочљив након испирања, указујући да је он позициониран екстрацелуларно, што је и очекивано с обзиром на његову величину. Хемијски померај мономера пре и после испирања указује на константност рН у оба узорка и потврђује неутралне услове унутар дела ћелије у којој се акумулише ванадат.



Слика 5.11 ^{51}V NMR записи за *C. comatus* A и *C. truncorum* B са испирањем

Спектри код врсте *C. truncorum* су били упоредиви са спектрима *C. comatus*; након испирања сигнал тетрамера се такође скоро изгубио, што је у складу са претпоставком о малој вероватноћи уласка овог молекула у ћелију (Rehder, 2008).

Овај резултат такође потврђује да је ванадат у облику мономера у ћелији складиштен у одељку чији је рН 7, тј. у цитоплазми. Ово је чињеница која није карактеристична за компартментизацију ванадата у гљивама с обзиром да је код већине он складиштен у вакуоли (Manazzu, 2000, Žižić *et al.* 2015). Такође овим се потврђује да акумулацијом ванадата није промењен рН статус ћелије те првобитна могућност о дислоцирању сигнала цитоплазматичних фосфата након додатка ванадата се потпуно искључује. Са друге стране његова присутност у цитоплазми му омогућује да испољи своја метаболичка дејства на једињења лоцирана у цитоплазми и то пре свега на фосфатне шећере, чија је концентрација директно зависна од активности ензима на које ванадат може да делује на инсулин минетички начин, што би могло имати користи у примени мицелије ове гљиве обогаћене са V у антидијабетогеној терапији.

Након упоређивања са ^{31}P NMR подацима може се закључити да ванадат у концентрацији мањој од 10 mM изазива метаболичке промене (показано као истовремени

пораст G6P и појављивање G1P сигнала) код обе врсте. Додатак веће концентрације ванадата доводи до хидролизе PolyP ланца и нарушавања рН који има негативан утицај на ћелију. Ову чињеницу би требало узети у обзир уколико би се потопљени медијум ове врсте користио као потенцијални извор антидијабетогених агенаса.

На основу проучавања метаболита фосфора у код обе испитиване врсте у овом раду показано је да су најзаступљенија фосфатна једињења PolyP и Pi са значајним присуством SP код мицелије *C. comatus* култивисане у потопљеном медијуму.

Такође је потврђено и да је рН код *C. comatus* у раној експоненцијалној фази у цитоплазми већи (рН 7) него у вакуолама (рН 6,2) што је у складу са забележеним рН код *S. cerevisiae* (рН 6,5-7,5) и *N. crassa* (рН 7,1-7,4) (Yang *et al.* 1993). Разлика у рН вредности два ћелијска компартмента код *C. trunctorum* као и код *C. comatus* у средњој експоненцијалној фази је нешто мања, али у свим случајевима цитоплазматични рН остаје приближно константан.

Највећи садржај дуголанчаних молекула PolyP био је присутан код мицелија са чврсте подлоге. Разлог за високу разлику у садржају PolyP може потицати или од састава медијума или због фазе раста у којој се мицелија налази. Слично је добијено у студији Greenfield *et al.* (1987) са *S. cerevisiae* када је однос PPc/Pi зависио од заступљености угљеника у подлози. Пик за PPc био је значано већи када је медијум био без глукозе код *N. crassa* (Yang *et al.* 1993). Иако не знамо тачан проценат угљеника у подлози у тренутку мерења чињеница је да га има више у течном медијуму него у чврстој подлози, због фаза развоја и природе култивације (на агару је инкубирана мицелија до 10 дана, а у течном медијуму до 35 дана) (Greenfield *et al.* 1987, Yang *et al.* 1993). Ово је важно због предвиђања функције фосфатног складиштења PolyP и указује на то да су два узорка била у различитој фази раста, што се може потврдити и кривом раста добијеном на основу претходних мерења биомасе продуктиване мицелије (Слика 5.1).

Узимајући у обзир функцију складиштења фосфата од стране PolyP изложеност неповољним условима праћена је смањењем садржаја PolyP указујући на то да ови молекули представљају енергијски резервоар код обе испитиване врсте. Исто је добијено и у експериментима са *N. crassa*, *S. cerevisiae* и *P. blakesleeanus* (Yang *et al.* 1993; Žižić *et al.* 2014; 2016). Процес потрошње PolyP у мицелији започео је скраћивањем дугих ланаца PolyP, а касније је била очигледна деградација Pi.

Главне промене које су настале услед третмана са V⁵⁺ се односе на то што је код врсте *C. trunctorum* дошло до значајног пораста пика SP, док је код *C. comatus* забележена мала промена пика SP. Повећање интензитета SP сигнала указује на дејство V⁵⁺ на ензиме

који су укључени у процесе метаболизма глукозе (Žižić *et al.* 2013; 2014). Третман са 10 mM V^{5+} није довео до драстичнијих промена у рН, што потврђују и резултати добијени ^{51}V NMR.

Одржавање рН вредности је један је од главних услова за правилно функционисање већине ћелијских ензима (Greenfield *et al.* 1987). Код *C. comatus* PolyP су идентификовани и као регулатор рН вредности, што је показано разградњом PolyP након излагања „базнијој“ рН средини. Слично је и у другим студијама (Castro *et al.* 1955). Индукована рН деградација PolyP зависи од почетног нивоа PolyP (Chen, 1999), па је ниво смањења интезитета сигнала P_{ic} био више изражен у узорку који је растао на чврстој подлози, јер је ниво P_{ic} био знатно виши него у случају узорка култивисаног у потопљеном медијуму. Уочен механизам детоксикације V^{5+} није био идентичан као код раније испитаних врста *P. blakesleeanus* и *H. polymorpha* где је V био везиван у вакуолама (Mannazzu *et al.* 1997; Žižić *et al.* 2013; 2014).

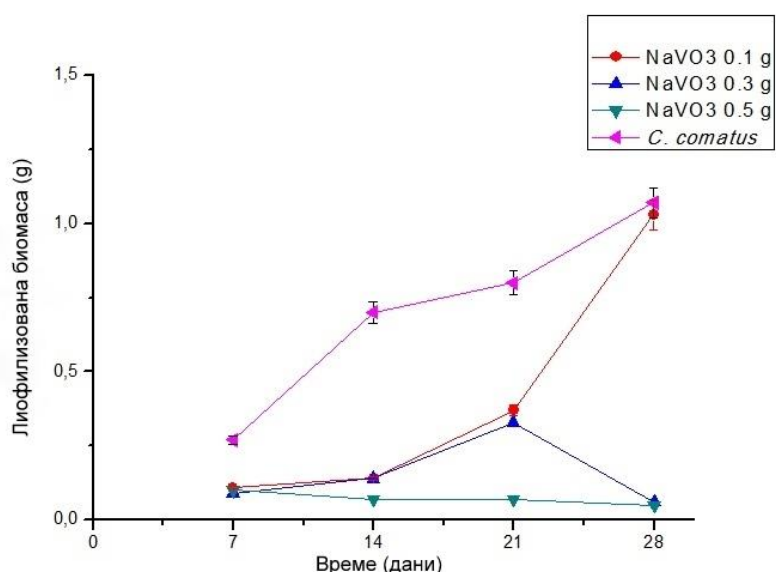
Код испитиваних врста, применом P NMR и V NMR техника примећено је слабљење пика P_{Pc} (за 23%), уместо пораста који је код ранијих студија био случај (Mannazzu *et al.* 2000; Žižić *et al.* 2013; 2014). Ово даље имплицира да је *C. comatus* делимично редуковала ванадат у нетоксичан облик, али га није транспортовала у вакуоле, а с обзиром на то да је *C. comatus* јестива гљива присутне форме ванадијума могу утицати на појачање антидијабетогеног ефекта (Han *et al.* 2006; Ma & Fu 2009; Lv *et al.* 2009). За врсту *C. truncorum* се може предвидети да има сличан ефекат. Поред тога, значајно повећање пика SP код *C. truncorum* указује на јасан метаболички ефекат у ћелији, нпр. при складиштењу вишка глукозе присутне у супстрату (Ji & Moore 2002). Техником V NMR је утврђено да резистентност на ванадат није произашла само из редукције ванадата (V^{5+}) до ванадила (V^{4+}) због присуства сигнала ванадата унутар ћелије.

Мономер ванадата је једини облик који је откривен интрацелуларно, што имплицира да врста *C. comatus* има способност усвајања ванадијума када је присутан и као ванадат или ванидил у супстрату. Оба поменута облика ванадијума могу да изазову негативне ефекте на принос биомасе, међутим потенцијално могу имати и позитиван допринос као антидијабетички агенс при коришћењу ове гљиве као нутрицеутика или фармаеутика у форми капсула (Wang *et al.* 2013).

5.4. Утицај натријум-метаванадата ($NaVO_3$) на раст мицелије

Испитан је утицај натријум-метаванадата ($NaVO_3$) на раст мицелије у потопљеној култури (Слика 5.12). Различите концентрације $NaVO_3$ (0,1 g, 0,3 g и 0,5 g) додате су у медијум након чега је мерена биомаса продуковане мицелије и формиране су криве у односу на контролу без третмана са $NaVO_3$. Експеримент је рађен у три независна понављања и средња вредност мерења је узета као резултат.

Врста *C. truncorum* није испољила способност раста на ванадијуму, док се мицелија *C. comatus* показала култивабилном на NaVO_3 (Слика 5.12).



Слика 5.12 Третман мицелије натријум-метаванадатом (NaVO_3) у потопљеној култури

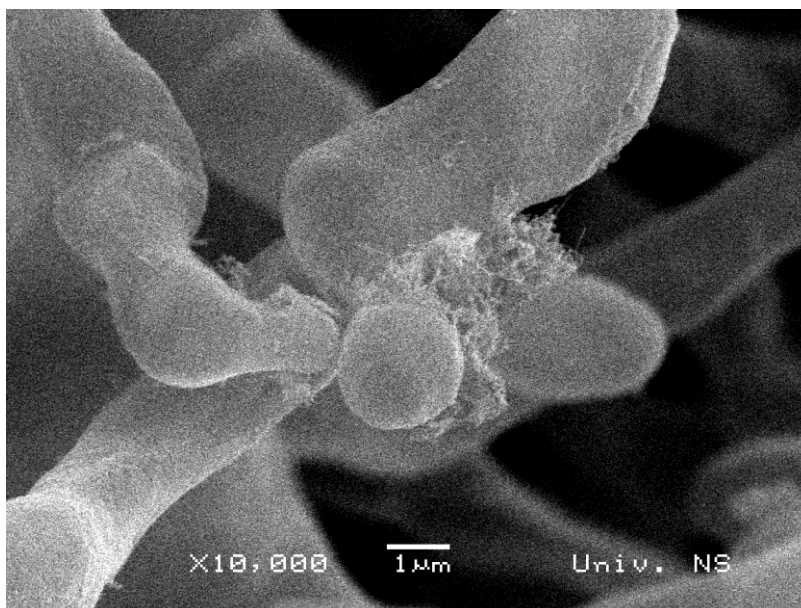
При свим испитаним концентрацијама мицелија *C. comatus* расла је слабије у односу на контролу. Изузетак је био случај са концентрацијом 0,1 g NaVO_3 након 28 дана инкубације. У овој тачки мерења биомаса мицелије која је расла у подлози са NaVO_3 је готово идентична са измереном биомасом у контроли, што указује на чињеницу да се мицелија „оправила“ и надокнадила „штетан“ утицај (NaVO_3).

Добијени резултати у сагласности су са студијама Han *et al.* (2008; 2009) где је највећа продукција биомасе детектована у контроли (без NaVO_3), док је повећање концентрација NaVO_3 у подлози деловало инхибиторно на принос биомасе мицелије *C. comatus*.

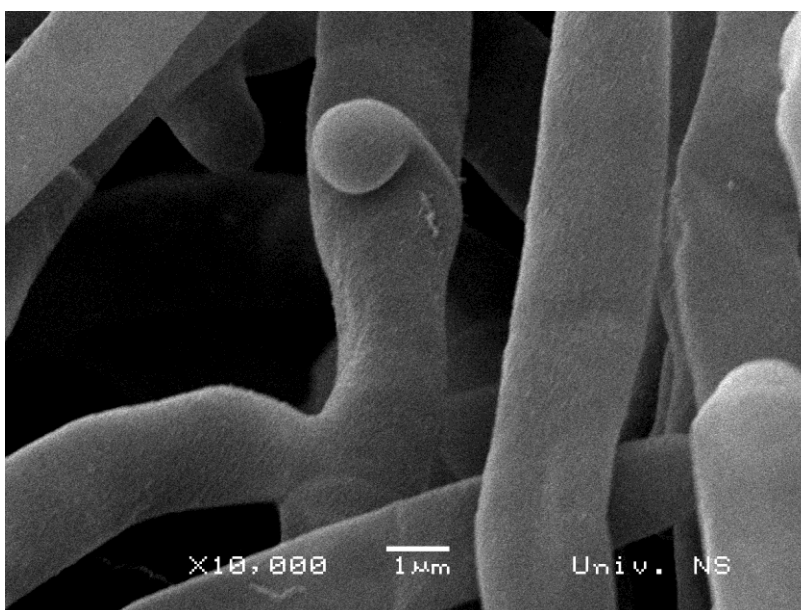
5.5. SEM

Испитивање морфологије гљива може дати конкретне информације о хифама нпр. о типу гранања или потенцијалном присуству агрегата на површини или унутар ћелија из разлога што је морфологија хифа у блиском односу са њиховом физиологијом (Buchalo *et al.* 2011). Употребом SEM нису забележене промене у морфологији мицелија током различитих фаза раста (након 7, 21 и 35 дана). Једино су код *C. truncorum* након 21 дана култивације примећене одређене агрегације на хифама (Слика 5.13). Пречник хифа кретао

се од 1,28 до 2,25 μm за *C. comatus* и од 1,61 до 4,03 μm за *C. truncorum*. Кукасти израштаји (енг. clamp connection) видљиви су у свим узорцима (Слика 5.13 и Слика 5.14).

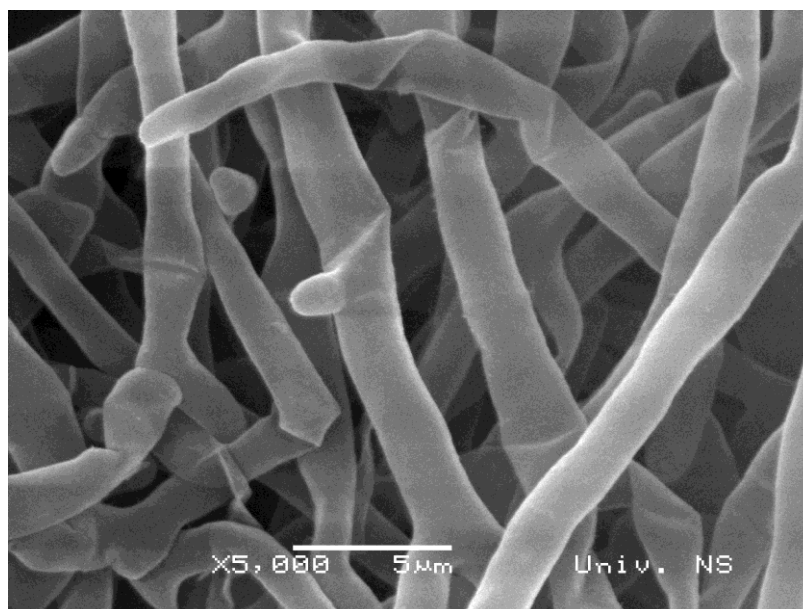


Слика 5.13 Кукасти израштаји хифе *C. truncorum* након 21 дана раста мицелије у ферментационом медијуму



Слика 5.14 Кукасти израштаји хифе *C. comatus* након 21 дана раста мицелије у ферментационом медијуму

Током снимања SEM нису примећене промене у морфологији код врсте *C. comatus* ни након третмана мицелије у потопљеној култури са ванадијумом (Слика 5.15). Мицелија *C. truncorum* није расла у подлози са додатком ванадијума.



Слика 5.15 Кукасти израштаји хифе *C. comatus* након 21 дана раста мицелије у ферментационом медијуму са додатком ванадијума

Претпостављамо да је одсуство спољашњих промена на мицелији обе анализиране врсте у присуству V у ствари последица њихове интрацелуларне апсорпције.

5.6. Антирадикалска и антиоксидативна активности екстраката гљива

Претходна истраживања указују на значајне разлике у антиоксидативној (АО) активности између екстраката ПТ и потопљених култура будући да АО потенцијал зависи од порекла соја (супстрата на којем је растао) и од генеративне (ПТ) или вегетативне (М и Ф) фазе животног циклуса саме гљиве (Asatiani *et al.* 2007; Tsai *et al.* 2009; Vamanu, 2014, Теџановић *et al.* 2017). Уочено је да АО активности значајно варирају у зависности од поларности екстраката гљиве (EtOH, MeOH или H₂O) што утиче на доминантно присуство биолошки активних једињења у њима (феноли, флавоноиди, полисахариди и липиди) (Puttaraju *et al.* 2006; Karaman *et al.* 2010; Li *et al.* 2010; Karaman *et al.* 2014).

У овом раду је испитана и упоређена антирадикалска (AP) и АО активност EtOH, MeOH и H₂O екстраката ПТ и потопљених култура мицелије (М и Ф) при чему су коришћени следећи спектрофотометријски тестови *in vitro*: ABTS[•], DPPH[•], OH[•], O₂^{•-} и NO[•] тестови (за

одређивање способности неутрализације слободних радикала) као и метода FRAP (за одређивање способности редукције јона Fe).

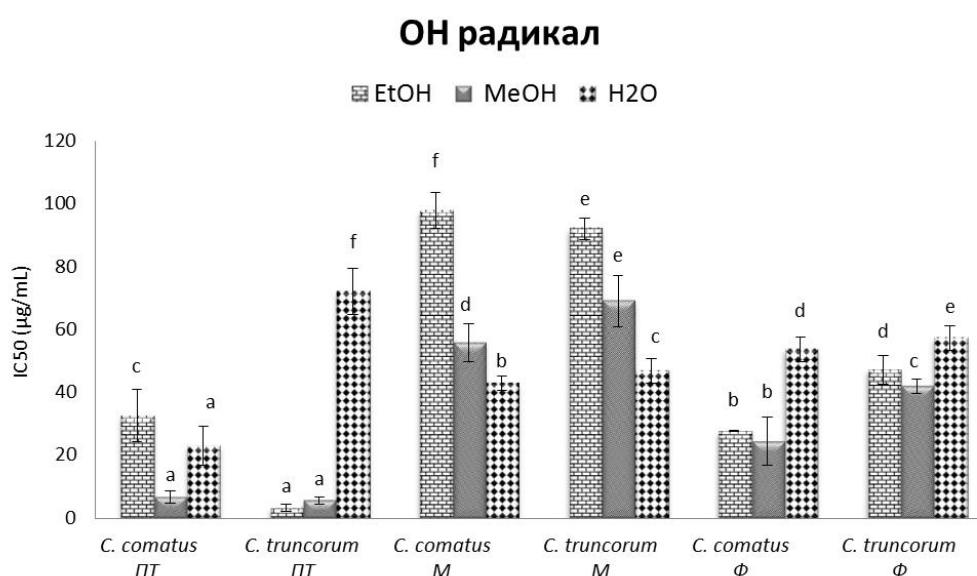
5.6.1. Анти-ОН радикалска активност

Антирадикалска активност бележи потенцијал неутралисања слободних радикала, конкретно овде је испитана и упоређена способност неутрализације ОН радикала EtOH, MeOH и H₂O екстракта ПТ, као и М и Ф потопљене културе (Слика 5.16).

Најјача активност забележена је код ПТ екстракта *C. truncorum*, EtOH и MeOH (IC₅₀ 3,24±1,02 µg/mL и 5,62±1,21 µg/mL), као и MeOH екстракта ПТ *C. comatus*, потом код Ф екстракта обе врсте док су најслабију активност показали М екстракти. Најслабију активност показао је EtOH екстракт М (IC₅₀ 97,82±5,74 µg/mL), који је у поређењу са EtOH екстрактом мицелије *C. comatus* пореклом из Румуније (EC₅₀ 1.87±0.03 mg/mL) (Vamanu, 2014) испољио бољу активност. EtOH екстракт плодног тела *C. comatus* пореклом из Кине показао је слабију активност (IC₅₀ 3,23±0,28 mg/mL) (Li *et al.* 2010) у односу на EtOH екстракт ПТ пореклом из Србије (IC₅₀ 32,68±8,33 µg/mL).

С обзиром на чињеницу да у литератури нема довољно података о AP активности врсте *C. truncorum*, добијене вредности AP активности (Анти-ОН) екстракта анализираних гљива поређене су са екстрактима других врста гљива, како териколних, тако и лигниколних.

MeOH екстракти плодних тела лигниколних врста: *Agrocybe aegerita* (IC₅₀ 312,38±0,34 µg/mL), *Meripilus giganteus* (IC₅₀ 384,83±0,13 µg/mL) и *Xylaria polymorpha* (339,98±0,44 µg/mL) (Karaman *et al.* 2014) забележили су слабије активности у неутрализацији ОН радикала у поређењу са анализираним MeOH екстрактима ПТ териколних врста *C. comatus* (IC₅₀ 6,65±1,99 µg/mL) и *C. truncorum* (IC₅₀ 5,62±1,21 µg/mL). Међутим, H₂O екстракт плодног тела лигниколне врсте *Trametes versicolor* испољио је јачу активност (IC₅₀ 3,21±0,10 µg/mL) (Janjušević *et al.* 2017) у односу на H₂O екстракте ПТ териколних врста *C. comatus* (IC₅₀ 23,00±6,32 µg/mL) и *C. truncorum* (IC₅₀ 72,12±14,38 µg/mL).



Слика 5.16 Компаративни преглед неутралисања ОН радикала екстракта ПТ, М и Ф потопљених култура

Детектована активност значајно се разликовала између екстракта пореклом из различитог извора гљиве: генеративног – ПТ и вегетативног у потопљеном медијуму (М и Ф). Утврђена је разлика између испољене анти-ОН активности према типу растварача, односно екстракта (MeOH, EtOH и H₂O) између анализираних врста, али и самих нивоа екстракције (ПТ, М и Ф) a,b,c,d,e,f - стубићи означени различитим словима статистички се значајно разликују (Tukey, HSD, $p < 0,01$). Код EtOH и H₂O екстракта издвојило се шест статистички значајних група, што указује на чињеницу да су се сви анализирани екстракти међусобно разликовали по активности, док је код MeOH издвојено пет група, при чему су ПТ код обе врсте испољила најјачу активност.

5.6.2. Анти-O₂ радикалска активност

Активност неутралисања супероксид анјона (O₂²⁻) није детектована пошто IC₅₀ вредности нису регистроване, што даље имплицира да испитиване врсте гљива на свим нивоима екстракције (EtOH, MeOH и H₂O) екстракти ПТ, М и Ф немају способност неутралисања O₂ радикала при опсегу испитаних концентрација 6,25- 100 mg/mL (почетне концентрације). Анализирани су сви типови (ПТ, М и Ф) екстракта различитих поларности (EtOH, MeOH и H₂O).

До сада нема забележених података о активности неутралисања O_2 радикала за врсту *C. truncorum*, док је EtOH екстракт ПТ *C. comatus* пореклом из Кине показао одређену активност (IC_{50} $25,3 \pm 0,21$ mg/mL), на супрот H_2O екстракту истог соја (Li *et al.* 2010).

5.6.3. Анти-NO радикалска активност

Активност неутралисања азот монооксида (NO) није детектована. Испитани су сви типови (ПТ, М и Ф) екстраката различитих поларности (EtOH, MeOH и H_2O), али очитане апсорбанце имале су негативну вредност. Опсег концентрација који је испитан кретао се од 6,25 до 100 mg/mL (почетне концентрације) осим код H_2O екстраката ПТ 300 mg/mL, 400 mg/mL код MeOH екстраката ПТ обе врсте. Испитиване врсте немају способност неутралисања NO радикала или имају слабу активност која се може детектовати једино при високим концентрацијама екстракта (резултати нису приказани).

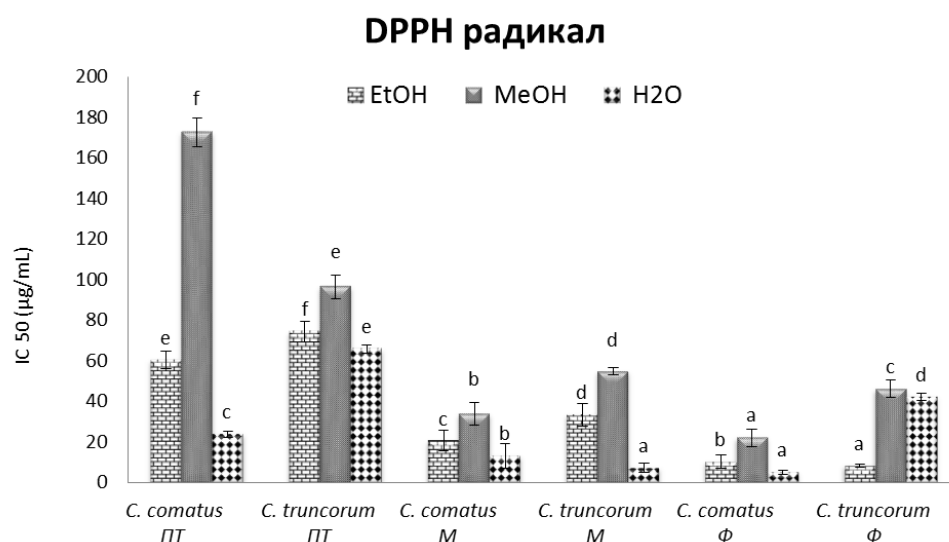
5.6.4. Анти-DPPH радикалска активност

Код DPPH радикала боље активности забележене су код екстраката пореклом из потопљених култура (Слика 5.17) што би се могло објаснити јачом физиолошком активношћу вегетативне мецелије него у генеративним базидиомима плодног тела гљиве (Tešanović *et al.* 2017).

Најбоља Анти-DPPH активност забележена је код H_2O екстраката Ф *C. comatus* (IC_{50} $5,06 \pm 2,06$ μ g/mL), што је приближна вредност добијеног за тестирани синтетски антиоксидантс - ВНА (бутилованои хидроксианизол) при концентрацији 50 μ g/mL. (IC_{50} $2,09 \pm 0,56$ μ g/mL). Знатну активност показали су и H_2O екстракти М обе врсте ($7,52 \pm 2,46$ μ g/mL и $13,27 \pm 5,95$ μ g/mL, *C. truncorum* и *C. comatus*, редом) као и EtOH екстракти Ф обе врсте ($8,54 \pm 0,91$ μ g/mL и $10,44 \pm 3,27$ μ g/mL *C. truncorum* и *C. comatus*, редом).

Врста *C. comatus* код већине испитаних екстраката показала је већу активност у односу на екстракте *C. truncorum*. EtOH екстракта ПТ, М и Ф *C. comatus* са Тајвана показао је слабију антрадикалну активност (IC_{50} $3,0 \pm 0,10$ mg/mL, $15,8 \pm 0,20$ mg/mL и $19,5 \pm 0,10$ mg/mL, редом) (Tsai *et al.* 2009) у поређењу са EtOH екстрактима ПТ, М и Ф соја *C. comatus* пореклом из Србије (IC_{50} $60,57 \pm 4,39$ μ g/mL, $20,72 \pm 4,96$ μ g/mL и $10,44 \pm 3,27$ μ g/mL, редом). У поређењу са H_2O екстрактом М *C. comatus* из Израела показао је слабију активности ($1,10 \pm 0,20$ mg/mL) (Asatiani *et al.* 2007), од испитаног H_2O екстракта М *C. comatus* из Србије ($13,27 \pm 5,95$ μ g/mL). MeOH екстракти ПТ *C. comatus* у студији Stojković и сарадника (2013), показали су слабију активност ($3,76 \pm 0,48$ mg/mL) у поређењу са MeOH екстрактима ПТ *C. comatus* анализираним у овом раду ($172,74 \pm 7,10$ μ g/mL).

За врсту *C. truncorum* нема доступних података у литератури, према нашем сазнању, међутим за таксономски веома блиску конспецифичну врсту *C. micaseus* детектована је DPPH активност MeOH и H₂O екстраката ПТ (Nguyen *et al.* 2014). Водени екстракти показали су се потентнијим у односу на MeOH (Nguyen *et al.* 2014) што је у сагласности са нашом студијом и указује да је поларнији екстракт (H₂O) испољио бољу активност.



Слика 5.17 Компаративни преглед неутралисања DPPH радикала екстраката ПТ, М и Ф потопљених култура

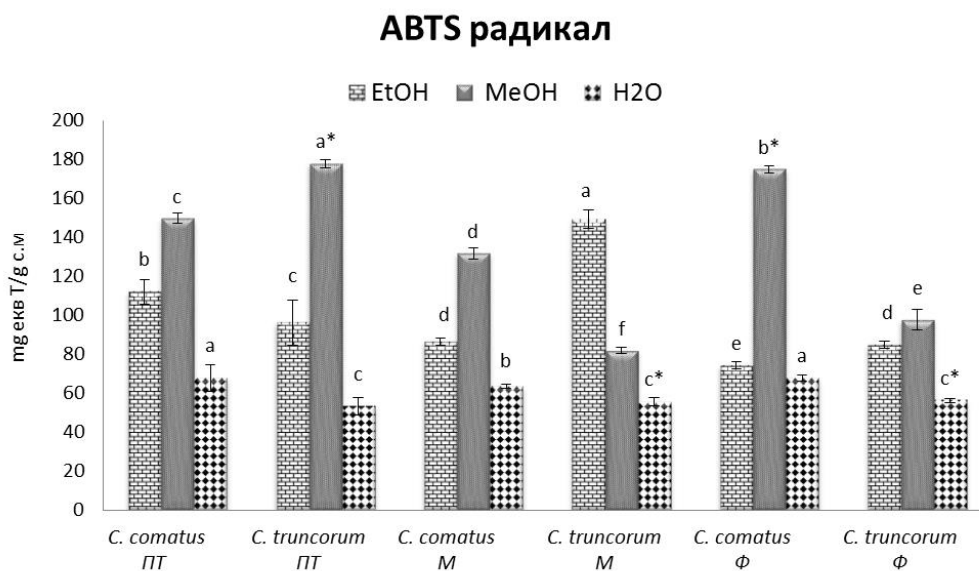
Утврђена је разлика између испољене анти-DPPH активности према типу растварача, односно екстракта (EtOH, MeOH и H₂O) између анализираних врста, али и самих нивоа екстракције (ПТ, М и Ф) a,b,c,d,e,f - стубићи означени различитим словима статистички се значајно разликују (Tukey, HSD, $p < 0,01$) (Слика 5.17) У случају EtOH и MeOH екстраката издвојило се шест група, а код H₂O пет, слично анти-OH активности.

5.6.5. Анти-ABTS радикалска активност

У случају ABTS теста неутрализације вештачког супстрата ABTS-а који се понаша као слободни радикал сви испитивани екстракти испољили су активност (Слика 5.18).

MeOH екстракти обе врсте су се показали као најпотентнији, са изузетком екстракта М *C. truncorum*, где је EtOH екстракт био потентнији. Најбољу активност испољио је MeOH екстракт ПТ врсте *C. truncorum* (175,02±1,98), а затим MeOH екстракт Ф врсте *C. comatus* (175,09±2,03 mg екв. T/g с.м). За EtOH екстракт М врсте *C. comatus* постоје подаци о слабој активности у погледу ABTS теста (EC₅₀ 0,10±0,05 mg/mL) (Vamanu, 2014), што се не поклапа

са резултатима добијеним у овом раду ($86,58 \pm 1,72$ mg екв. T/g с.м). У студији Carvajal *et al.* (2011) испитивана ABTS антирадикалска активност екстракта ПТ *Agaricus brasiliensis* (EC_{50} $84,00 \pm 4,30$ $\mu\text{g/mL}$) је јача у односу на екстракт М исте врсте, што је у складу са нашим резултатима. Екстракти ПТ испољили су јачу активност у поређењу са екстрактима М (Слика 5.18).



Слика 5.18 Компаративни преглед неутралисања ABTS радикала екстраката ПТ, М и Ф потопљених култура

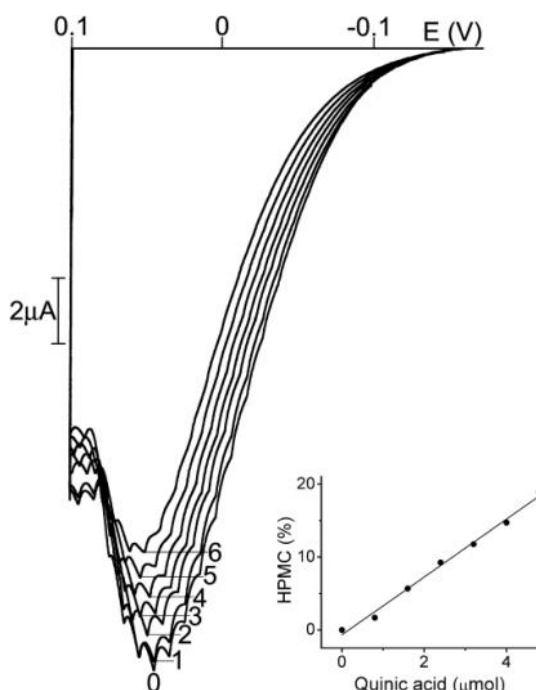
Утврђена је разлика између испољене анти- ABTS активности према типу растварача, односно екстракта (EtOH, MeOH и H₂O) између анализираних врста, али и самих нивоа екстракције (ПТ, М и Ф) a,b,c,d,e,f - стубићи означени различитим словима статистички се значајно разликују (Tukey, HSD, $p < 0,01$; $*p < 0,05$) (Слика 5.18). Код EtOH екстраката издвојило се пет група по разликама у активности, код MeOH шест, а код H₂O три што се може тумачити начином припреме екстракта. Висока варијабилност једињења је присутна у ткз. „сировим“ екстрактима који су припремљени од ПТ, М и Ф. У тако добијеним екстрактима присутна једињења или групе једињења и њихове специфичне комбинације могу остварити своју активност у синергизму или појединачно делујући. Стога могу имати различит допринос укупној оствареној AP активности за шта су одговорни различити антиоксидативни механизми (Li *et al.* 2010; Cai *et al.* 2004; Dimitrić Marković *et al.* 2017).

5.6.6. Анти- аскорбил (Asc) радикал

ПСХ екстракти су испитани EPR методом у циљу детекције редукције аскорбил-радикала (Asc). Након примењене методе није дошло до смањења интензитета сигнала аскорбил-радикала, напротив сигнал је растао. Снимања су поновљена и добијени су идентични резултати. Добијени налази указују да ПСХ екстракти ПТ, М и Ф потопљених култура немају способност редукције Asc радикала.

5.7. Метода НРМС

У овом раду је по први пут поларографском методом одређена антиоксидативна активност EtOH и ПСХ екстраката (ПТ, М и Ф потопљених култура) териколних гљива *S. comatus* и *S. truncorum*, као и хининске киселине (енг. quinic acid) која је детектована у EtOH екстрактима обе гљиве. Утицај хининске киселине на анодну струју пероксида приказан је на слици (Слика 5.20).

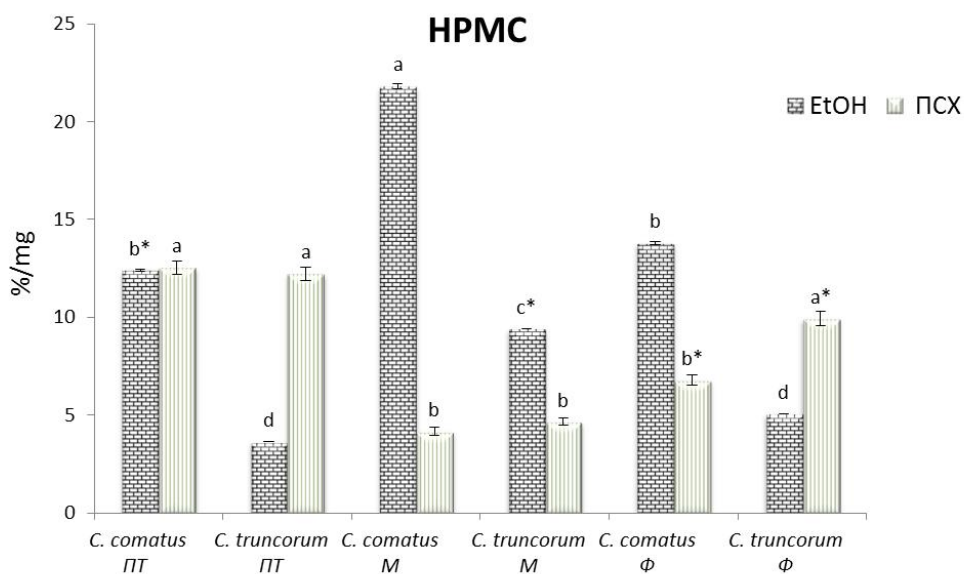


Слика 5.19 Поларограми основне струје водоник пероксида (i_a), пре (0) и по додатку 6 аликвота од по 100 μ L (1-6) хининске киселине концентрације 2×10^{-3} M Инсерт: Зависност процента смањења граничне струје од количине хининске киселине

Хининска киселина показала је нижу антиоксидативну активност ($4,00 \pm 0,01\%/\mu\text{mol}$) од сиригинске ($13,48 \pm 1,80\%/\mu\text{mol}$), кафење ($12,65 \pm 0,75\%/\mu\text{mol}$), ванилинске ($10,29 \pm 0,89\%/\mu\text{mol}$) и протокатехинске киселине ($5,92 \pm 0,25\%/\mu\text{mol}$), а вишу од 3- и 4-хидроксибензојеве и салицилне киселине ($2,88 \pm 0,36$, $3,28 \pm 1,38$ и $3,51 \pm 0,28\%/\mu\text{mol}$, редом)

(Sužnjević *et al.* 2011). Кад су у питању EtOH екстракти, смањење основног пика пероксида је било највеће у случају *C. comatus* ($21,80 \pm 0,13$ %/ mg) а најмање у случају *C. truncorum* ($3,64 \pm 0,21$ %/ mg).

ПСХ екстракти ПТ *C. comatus* и *C. truncorum* испољили су највећу активност ($12,53 \pm 0,33$ %/ mg и $12,21 \pm 0,33$ %/ mg). Врста *C. comatus* је показала већу антиоксидативну активност у односу на *C. truncorum*. Једино је ПСХ екстракт Ф *C. truncorum* испољио већу активност ($9,93 \pm 0,35$ %/mg) у односу на ПСХ екстракт Ф *C. comatus* ($6,78 \pm 0,26$ %/mg).



Слика 5.20 Компаративни приказ антиоксидативних активности ПТ, М и Ф гљива *C. comatus* и *C. truncorum* одређених НРМС методом.

Утврђена је разлика између испољене АО активности према типу растварача, односно екстракта (EtOH и H₂O) између анализираних врста, али и самих нивоа екстракције (ПТ, М и Ф) a,b,c,d,e,f - стубићи означени различитим словима статистички се значајно разликују (Tukey, HSD, $p < 0,01$; * $p < 0,05$) (Слика 5.20). На основу Tukey теста издвојиле су се четири групе код EtOH екстраката и две код ПСХ.

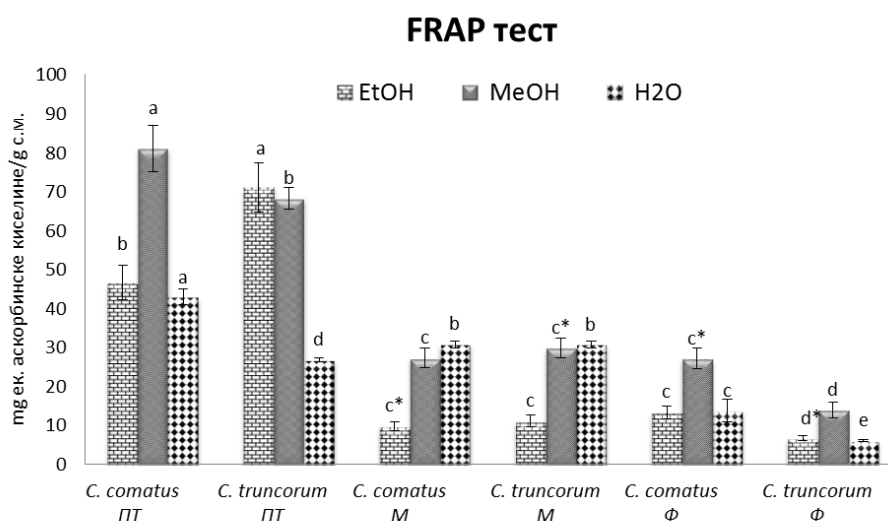
Код ПСХ екстраката обе испитиване врсте најактивнији су били екстракти ПТ, затим екстракти Ф, док су најмање активни били екстракти М. Код EtOH екстраката забележено је да су екстракти М обе врсте били најактивнији, затим екстракти Ф, а екстракти ПТ најмање активни. Разлике у добијеним активностима између EtOH и ПСХ екстраката могу се објаснити разликама у саставу екстраката добијених различитим поступцима екстракције.

5.7.1. Метода FRAP

Одређена је способности екстракта ПТ, М и Ф потопљених култура ка редукцији јона Fe помоћу методе FRAP. Резултати су изражени преко криве аскорбинске киселине као стандардног растварача односно као g ек. аскорбинске киселине/g с.м.

Екстракти ПТ обе испитане врсте показали су јачи редукциони потенцијал у односу на екстракте из потопљене културе. Као најпотентнији показао се MeOH екстракт ПТ *C. comatus* $81,05 \pm 5,91$ g ек. аскорбинске киселине/g с.м., а затим EtOH екстракт ПТ *C. truncorum* $71,08 \pm 6,32$ g ек. аскорбинске киселине/g с.м, док је најслабија активност забележена код H₂O екстракта Ф потопљене културе *C. truncorum* ($6,03 \pm 0,18$ g ек. аскорбинске киселине/g с.м).

За врсту *C. truncorum* нема до сада забележених резултата, док је за *C. comatus* EtOH екстракт М (пореклом из Румуније) забележена вредност EC₅₀ $0,72 \pm 0,01$ mg/mL (Vamanu, 2014) што је слабија активност у поређењу са добијеним резултатима за EtOH екстракт М пореклом из Србије ($9,78 \pm 1,19$ g ек. аскорбинске киселине/g с.м). У поређењу са MeOH екстрактима ПТ лигниколних врста *Agrocybe aegerita* ($10,74 \pm 0,09$ g ек. аскорбинске киселине/g с.м), *Meripilus giganteus* ($10,45 \pm 0,44$ g ек. аскорбинске киселине/g с.м) и *Xylaria polymorpha* ($3,25 \pm 0,04$ g ек. аскорбинске киселине/g с.м) MeOH екстракти ПТ териколних врста *C. comatus* ($81,05 \pm 5,91$ g ек. аскорбинске киселине/g с.м) и *C. truncorum* ($68,26 \pm 2,71$ g ек. аскорбинске киселине/g с.м) су забележили јачу активност (Karaman *et al.* 2014). Једино је у случају MeOH екстракта ПТ *Fomes fomentarius* ($136,60 \pm 0,15$ g ек. аскорбинске киселине/g с.м) забележена слабија активност испитиваних врста *C. comatus* и *C. truncorum*.



Слика 5.21 Компаративни преглед редукционог потенцијала екстраката ПТ и М и Ф потопљених култура

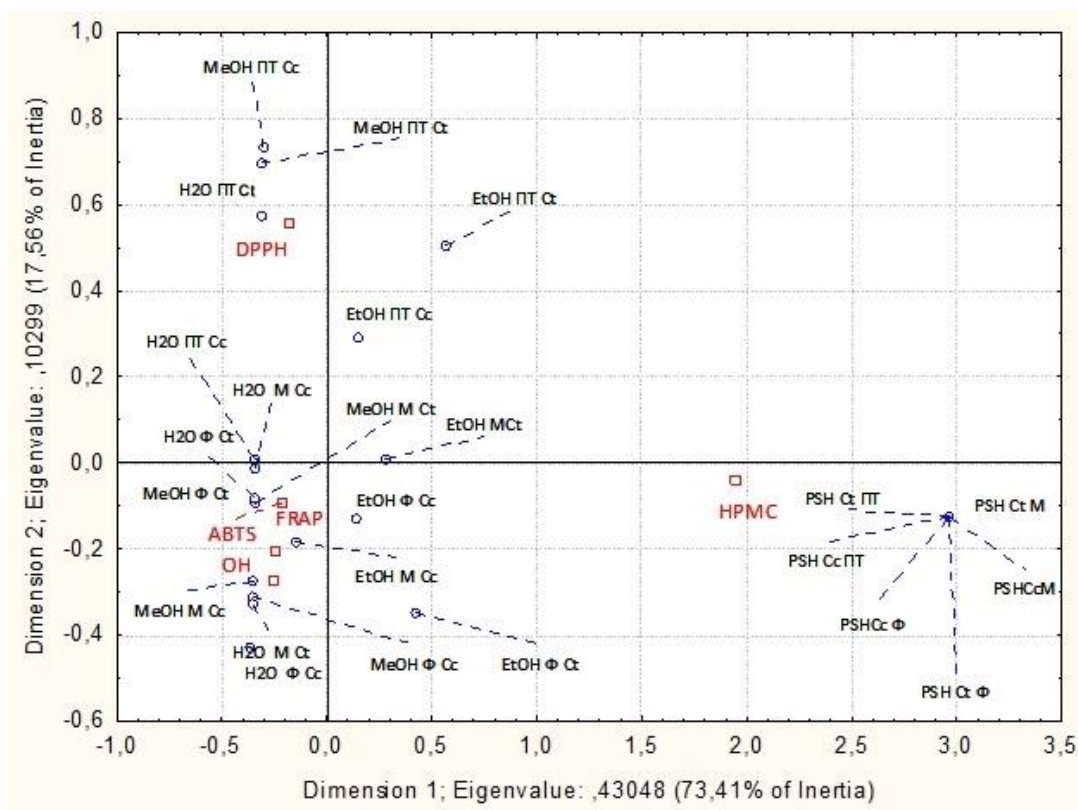
Утврђена је разлика између испољене АО активности према типу растварача, односно екстракта (EtOH, MeOH и H₂O) између анализираних врста, али и самих нивоа екстракције (ПТ, М и Ф) a,b,c,d,e,f - стубићи означени различитим словима статистички се значајно разликују (Tukey, HSD, $p < 0,01$; * $p < 0,05$) (Слика 5.21).

За генерално поређење АО и AP активности екстраката гљива коришћена је параметријска метода коресподентне анализе у програму STATISTICA (StatSoft, Inc. version 12.0). Екстракти су груписани према разлици у јачини АО активности која је одређена Tukey тестом. Центриоле екстраката су у простору распоређене у четири коресподентне зоне, две позитивне и две негативне (Слика 5.22).

Уочено је раздвајање по методама испитивања, при чему су по механизмима активности блискије анти ABTS, антиOH и FRAP метода, док су анти DPPH и HPMC значајно удаљене.

- У првој позитивној зони осе налазе се MeOH екстракти ПТ обе врсте, који су се издвојили према најслабијој активности у DPPH тесту у односу на друге испитиване екстракте. Центриоле оба MeOH екстраката приказане су на графикону као две најудаљеније центриоле (прве две центриоле у првој позитивној зони). Нешто испод њих позиционирана је центриола H₂O екстракта *C. truncorum* који је показао најслабију активност после поменутих MeOH екстраката обе врсте.

- У другој позитивној зони налазе се центриоле EtOH екстракта ПТ обе врсте и центриола EtOH екстракта М *C. truncorum*, који су се истакли по веома потентној АО активности код FRAP теста и AP активности код ОН, ABTS и DPPH теста.
- У првој негативној зони налазе се центриоле које припадају екстрактима М и Ф потопљених култура који су испољили уједначене активности код ОН, ABTS и FRAP теста. Центриоле екстракта груписане су и издвојене као изузеци у испољеној активности. Наиме, код ABTS теста најјача AP активност је испољена код свих екстракта ПТ са изузецима MeOH екстракта Ф врсте *C. comatus*, H₂O екстракта Ф врсте *C. comatus* и EtOH екстракта М врсте *C. truncorum* који су се показали потентнијим од екстракта ПТ. Такође, у случају ОН и FRAP теста екстракти ПТ обе врсте испољили су најпотентнију активност, изузев H₂O екстракта М *C. truncorum* код оба теста и EtOH екстракта Ф *C. comatus* код ОН теста.
- У другој негативној зони груписане су центриоле свих испитаних ПСХ екстракта НРМС методом. ПСХ екстракти обе врсте испољиле су исти тренд у АО активности (ПТ>Ф>М). Међутим, у истој зони налазе се центриоле EtOH екстракта Ф обе врсте који су се према активностима у DPPH и ОН тесту показали као веома потентни, а у FRAP и ABTS тесту као слабо потентни.



Слика 5.22 Позиције центриола испитиваних екстракта у односу на примењене тестове

5.8. Антимикробна активност екстракта гљива

Антибактеријска активност испитана је на пет Грам-позитивних (*B. subtilis*, *E. fecalis*, *M. luteus*, *S. aureus*-атестиран сој и *S. aureus*-хумани изолат) и пет Грам-негативних бактерија (*P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *P. mirabilis*-атестиран сој и *P. mirabilis* -хумани изолат). Тестирани су екстракти различитог порекла (ПТ, М и Ф потопљених култура гљива) и различите поларности МеОН, ЕтОН, СНСл₃ и ПСХ (Табела 5.2).

Неполарни СНСл₃ екстракти *C. comatus* су испољили најбољу антибактеријску активност делујући на три Грам-позитивне (*B. subtilis*, *E. fecalis* и *S. aureus*) и три Грам-негативне бактерије (*E. coli*, *S. enteritidis* и *P. mirabilis*). СНСл₃ екстракт ПТ врсте *C. comatus* показао се као најактивнији према *B. subtilis* (MIC 1,13 mg/mL; MBC 2,27 mg/mL).

СНСл₃ екстракти гљиве *C. truncorum* су показали знатно мању активност делујући само на две Грам-позитивне бактерије (*E. fecalis* и *M. luteus*). Разлика у биоактивним компонентама неполарне (хемијске) природе између ове две врсте гљива, вероватно је од великог значаја за испољену антибактеријску активност. Једињења која су присутна у неполарнијим растварачима су терпеноиди, стероли и полипептиди (Lindequist *et al.* 2005).

У овом раду МеОН екстракти обе врсте показали су најмању антибактеријску активност, чак и при највећој концентрацији (Табела 5.2). Међутим, поређењем антимикробне активности МеОН и СНСл₃ екстракта плодних тела више различитих врста лигниколних гљива, уочена је већа активност код МеОН екстракта, са изузетком неколико анализираних врста (*Laetiporus sulphureus*, *Flammulina velutipes*, *Panus tigrinus* и *Pleurotus ostreatus*) (Karaman *et al.* 2009). У другим истраживањима уочена је антибактеријска активност МеОН екстракта врсте *C. comatus* према *S. aureus* при нижим концентрацијама екстракта (MIC 1,50 mg/mL) (Stojković *et al.* 2013) као и активност против Грам-негативне бактерије *E. coli* (MIC 3 mg/mL), што у овом раду није био случај.

C. truncorum МеОН екстракти ПТ утицали су на сојеве *B. subtilis*, *E. coli* и *S. aureus*, док екстракти Ф и М нису испољили ефекат (Табела 5.2). У литератури се међутим истичу ниже вредности MIC/MBC (0,25 mg/mL) за МеОН екстракт ПТ сродне (конспецифичне) гљиве *C. micaceus* са подручја Канаде према сојевима *S. aureus*, *E. coli* и *E. faecalis* (Ата, 2009). Ова разлика у активности може бити условљена различитим пореклом анализираних гљива. Утврђено је да МеОН екстракт гљиве *C. micaceus* има ефикасније деловање против соја *S. aureus* (MIC 0,15 mg/mL) услед присуства микацеола биоактивног стерола са антимикробним дејством (Zahid *et al.* 2006).

ЕтОН екстракти врсте *C. comatus* били су активни само на три Грам-позитивне бактерије (*B. subtilis*, *S. aureus* и *M. luteus*), док су ЕтОН екстракти *C. truncorum* били активни

само према два бактеријска соја (*B. subtilis* и *E. fecalis*) (Табела 5.2). Највећу антибактеријску активност испољио је EtOH екстракт М према атестираној *S. aureus* (MIC 2,27 mg/mL; MBC 4,54 mg/mL), нешто мању EtOH екстракт ПТ на *B. subtilis* (MIC 4,54 mg/mL; MBC 9,09 mg/mL), а најмању EtOH екстракт Ф (18,18 mg/mL). Сличне резултате саопштавају Ehssan & Saadabi (2012). EtOH екстракти ПТ *C. comatus* нису били активни према Грам-негативном соју *P. aeruginosa*, док су на тестиране сојеве *E. coli* и *S. aureus* испољили дејство. У истом раду микохемијским „скринингом“ EtOH екстракта *C. comatus* доказано је присуство флавоноида, алкалоида, сапонина, стерола, кумарина и тритерпена, који се сматрају одговорним за испољено антимикуробну активност (Ehssan & Saadabi, 2012).

Друге студије указале су да су EtOH и ацетонски (C₃H₆O) екстракти гљиве *C. comatus* инхибисали раст бактерије *S. aureus* али не и бактерије *E. coli* (Kalaw, 2014). Како је већ констатовано, биолошка активност екстракта варира у зависности од типа растварача и начина припреме екстракта. Осим тога, метаболити ПТ гљива обично се разликују од присутних метаболита у М или Ф потопљене културе (Asatiani *et al.* 2007; Karaman *et al.* 2012; Tešanović *et al.* 2017).

Табела 5.2 Антибактеријска активност анализираних узорака

Бактеријске културе	Екстракти <i>C. comatus</i> (mg/mL)									Екстракти <i>C. truncorum</i> (mg/mL)									
	MeOH			EtOH			CHCl ₃	CHCl ₃	CHCl ₃	MeOH			EtOH			CHCl ₃	CHCl ₃	CHCl ₃	
	ПТ	М	Ф	ПТ	М	Ф	ПТ	М	Ф	ПТ	М	Ф	ПТ	М	Ф	ПТ	М	Ф	
	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC
<i>B. subtilis</i>	–	–	–	4,54/9,09	–	–	1,13/2,27	18,18/18,18	9,09/9,09	18,18/↑	–	–	4,54/9,09	–	–	–	–	–	–
<i>S. aureus</i>	–	18,18/↑	–	–	2,27/4,54	–	–	–	18,18/↑	18,18/↑	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. aureus</i> HI	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecalis</i>	–	–	18,18/↑	–	–	–	–	–	18,18/↑	–	–	–	4,54/9,09	18,18/↑	–	18,18/↑	–	–	–
<i>M. luteus</i>	–	18,18/↑	18,18/↑	–	–	18,18/↑	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	18,18/18,18	–	–
<i>E. coli</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	18,18/18,18	18,18/↑	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. enteritidis</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	18,18/↑	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>P. mirabilis</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	18,18/↑	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>P. mirabilis</i> HI	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

– активност није детектована; ↑ вредност изнад испитиване концентрације; MeOH - метанолни екстракт; EtOH - етанолни екстракт; CHCl₃ - хлороформски екстракт; ПТ - плодно тело; М - мицелија; Ф - филтрат

ПСХ екстракти ПТ и потопљене културе (М и Ф) обе гљиве нису испољили антибактеријску активност на тестиране бактеријске сојеве. Наиме, ПСХ као хидрофилна органска једињења нису у стању да прођу кроз фосфолипидни двослој бактеријских плазма мембрана, иако је раније показано да су ПСХ гљиве *Cordyceps cicadae* били активни на Грам-позитивне (*S. aureus* и *S. pneumoniae*) и Грам-негативне сојеве (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* и *P. aeruginosa*) (Stamets, 2002; Sharma et al. 2015).

Добијени резултати обрађени су параметријском анализом у програмском пакету STATISTICA (StatSoft, Inc. version 12.0). Ради њихове лакше обраде, поред скраћенице за врсту (*C. comatus* – Сс и *C. truncorum* – Ст) уведене су и скраћенице за различите типове екстраката који су коришћени:

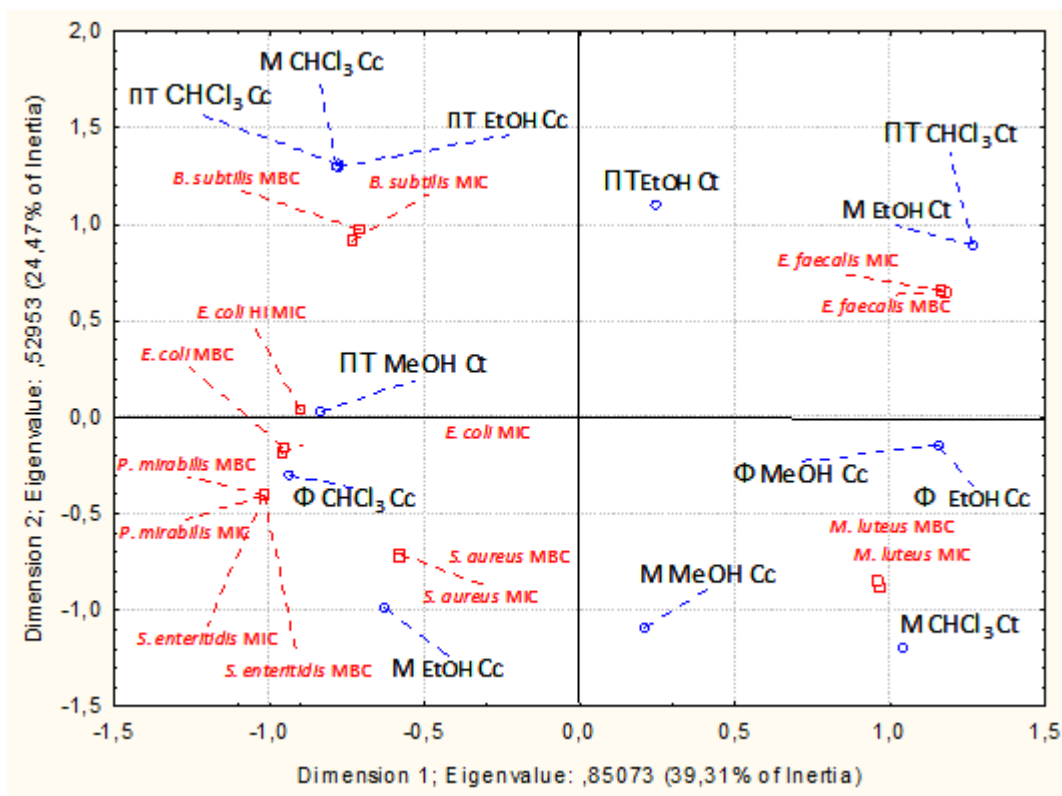
- ПТ МеОН – плодно тело, метанолни екстракт,
- М МеОН – мицелија, метанолни екстракт,
- Ф МеОН – филтрат, метанолни екстракт,
- ПТ ЕтОН – плодно тело, етанолни екстракт,
- М ЕтОН – мицелија, етанолни екстракт,
- Ф ЕтОН – филтрат, етанолни екстракт,
- ПТ СНСl₃ – плодно тело, хлороформски екстракт,
- М СНСl₃ – мицелија, хлороформски екстракт,
- Ф СНСl₃ – филтрат, хлороформски екстракт.

Са релевантног графикана параметријске методе коресподентне анализе (Слика 5.23) може се уочити груписање екстраката према њиховој антибактеријској активности. Анализа указује на асоцираност центриола у простору у простору четири коресподентне осе, две позитивне и две негативне.

Са релевантног графикана параметријске методе коресподентне анализе (Слика 5.23) може се уочити груписање екстраката према њиховој антибактеријској активности. Анализа указује на асоцираност центриола у простору четири коресподентне осе, две позитивне и две негативне.

- У првој позитивној оси сконцентрисали су се екстракти који су испољили најјачу антибактеријску активност према *B. subtilis* који се показао најосетљивијим (*C. comatus* углавном не поларни СНСl₃)
- У другом потизивној оси груписали су се екстракти који су испољили активност према бактерији *E. faecalis* (*C. truncorum* ПТ и М), док се

- у првој негативној оси налази центриола CHCl_3 екстраката Φ *C. comatus* који је испољио најбољу активност делујући на шест од испитиваних десет сојева
- У другој негативној коресподентној оси неравномерно су се груписали екстракти који су своје активности испољили при највећој испитаној концентрацији према соју *M. luteus* Φ *C. comatus* и *M. C. comatus*



Слика 5.23 Позиције центриола испитиваних екстраката гљива у односу на испољене MIC и MBC вредности

Сви ови резултати указују на то да су се раздвојиле врсте гљива према антибактеријској активности (при чему су бољу активност испољили екстракти *C. comatus*) али и према пореклу (ПТ у позитивној зони) и Φ у негативној зони, док су екстракти *M* испољили највећу дисперзију. Све то указује на чињеницу да су то све фактори који утичу на испољавање антибактеријске активности код анализираних гљива.

5.8.1. Антифунгална активност

Антифунгална активност испитана је на пет различитих сојева *Candida albicans* (*C. albicans*^{ATCC 10231}, *C. albicans* L (лабораторијска), *C. albicans* III (хумани изолат - лат. HI), *C. albicans* IV (HI) и *C. albicans* V (HI) и пет сојева плесни изолованих са биљних култура белог

лука и семена соје (*Alternaria padwickii*, *Fusarium proliferatum* 1, *F. proliferatum* 2, *F. verticillioides* и *F. graminearum*).

Од свих испитаних екстраката у контексту антифунгалног деловања на гљивице рода *Candida* једино су хлороформски (CHCl_3) екстракти *C. comatus* М и Ф потопљене културе показали антифунгалну активност само према атестираном соју *C. albicans*^{ATCC10231} (MIC 18,18 mg/mL) док на остале испитане сојеве *C. albicans* нису деловали. Сви остали испитани МеОН и ЕтОН екстракти (ПТ, М и Ф потопљене културе) нису испољили антифунгалну активност према тестираним гљивицама рода *Candida*. Ово указује на једињења која су неполарна у свосјтву испољавања антифунгалног деловања нпр. терпеноиди (Florjanowicz, 1999; Liu, 2007).

Добијени резултати су у складу са ранијом студијом у којој је истакнуто да антифунгална једињења нису честа међу врстама раздела Basidiomycota (Takazawa et al. 1982). ЕтОН екстракти гљиве рода *Agaricus* су такође били неактивни према гљивици рода *Candida* (Barros et al. 2008). Међутим МеОН екстракт ПТ врсте *Agaricus bisporus* и ЕтОН екстракт ПТ *C. comatus* са подручја Судана истакли су се по дејству на *Candida* sp. (Alves et al. 2013) и *C. albicans*^{ATCC7596} (Ehssan & Saadabi 2012), што може бити условљено различитим пореклом анализираних гљива и различитим типом испитиваних сојева *Candida* (атестиран или хуманог порекла).

У погледу антифунгалне активности према анализираним плеснима најбољу активност испољио је CHCl_3 екстракт ПТ врсте *C. comatus* (Табела 5.3). Плесни рода *Fusarium* показали су највећу отпорност према анализираним екстрактима, једино је МеОН екстракт ПТ *C. truncorum* при веома високој концентрацији (198 mg/mL) успео да инхибише раст испитиваних врста поменутог рода. У студији Suaу и сарадника (2000) показало се да је антибактеријска активност екстраката гљива била израженија од антифунгалне, што се поклапа са нашим резултатима. Такође, ЕтОН екстракт ПТ *C. comatus* са подручја Судана није испољио активност према фитопатогеном соју *A. niger* (Ehssan & Saadabi 2012). Међутим, јака антифунгална активност МеОН екстракта ПТ *C. comatus* (MFC од 0,20 до 6,25 mg/mL) забележена је према атестираним сојевима родова *Aspergillus*, *Penicillium* и *Trichoderma* (Stojković et al. 2013) што у нашем истраживању није био случај. Разлог за то је највероватније што су изолати који су испитивани у нашој студији резистентнији, пореклом из пољопривредних култура које су третиране одређеним антифунгалним агенсима, а не атестирани -из колекције култура са специфичним пожељним особинама.

Раније студије указују на дитерпеноиде, сесквитерпеноиде (Florjanowicz, 1999; Liu, 2007) и сесквитерпене као одговорна једињења за испољену антифунгалну активност код *F. velutipes* према врсти рода *Aspergillus* (Wang et al. 2012).

Табела 5.3 Антифунгална активност анализираних узорака

Екстракти	<i>C. comatus</i> (mg/mL)						<i>C. truncorum</i> (mg/mL)					
	MeOH ПТ		EtOH ПТ		CHCl ₃ ПТ		MeOH ПТ		EtOH ПТ		CHCl ₃ ПТ	
Плесни	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>F. proliferatum</i> 1	–	–	–	–	–	–	198	198	–	–	–	–
<i>F. proliferatum</i> 2	–	–	–	–	–	–	198	198	–	–	–	–
<i>F. verticillioides</i>	–	–	–	–	–	–	198	198	–	–	–	–
<i>F. graminearum</i>	–	–	–	–	–	–	198	198	–	–	–	–
<i>A. padwickii</i>	99	↑	99	↑	24,75	↑	99	99	99	↑	–	–

– активност није детектована; ↑ вредност изнад испитиване концентрације; MeOH - метанолни екстракт; EtOH - етанолни екстракт; CHCl₃ - хлороформски екстракт; ПТ - плодно тело; М - мицелија; Ф - филтрат

Активност конвенционалних антибиотика одређена је помоћу микродилуционе методе (CLSI, 2007) (Табела 5.4). Међу испитаним антибиотцима издвојио се хлорамфеникол који је при најмањој испитаној концентрацији (0,01 mg/mL) деловао на већину сојева бактерија. Сојеви *P. aeruginosa* и *P. mirabilis* (HI), су показали резистентност на све испитиване антибиотике осим на хлорамфеникол. Стрептомицин није био активан према Грам-негативној бактерији *P. aeruginosa*, док је на остале сојеве испољио дејство. Испитани антибиотици показали су се активнијим у односу на све типове тестираних екстраката обе гљиве што је и било за очекивати поштосу у питању чисте супстанце, а не сирови екстракти гљива који садрже већи број једињења.

Као најрезистентније бактеријске културе издвојиле су се бактерије *P. aeruginosa* и *P. mirabilis* HI. У будућим истраживањима треба узети у обзир испитивање синергизма екстраката гљива и антибиотика на поменуте две најрезистентније бактерије *P. aeruginosa* и *P. mirabilis* HI.

У погледу антифунгалне активности конвенционални антимиотик нистатин био је активан на свих пет испитиваних сојева *C. albicans* и то при концентрацији 0,06 mg/ml на сој *C. albicans* L, док је на све остале испитиване сојеве испољио активност при 0,25 mg/ml.

Табела 5.4 Дејство антибиотика на анализиране сојеве бактерија

	Антибиотици (mg/mL)			
	Стрептомицин	Канамицин	Ампицилин	Хлорамфеникол
Бактеријске културе				
<i>B. subtilis</i>	0,01	0,01	0,01	0,01
<i>S. aureus</i>	0,01	0,03	0,01	0,01
<i>S. aureus</i> HI	0,01	0,03	0,01	0,01
<i>E. faecalis</i>	0,12	0,06	0,06	0,06
<i>M. luteus</i>	0,06	0,01	0,01	0,01
<i>P. mirabilis</i>	0,03	0,03	0,01	0,01
<i>P. mirabilis</i> HI	P*	P	P	0,23
<i>S. enteritidis</i>	0,01	0,01	0,01	0,01
<i>E. coli</i>	0,01	0,01	0,01	0,01
<i>P.aeruginosa</i>	P	P	P	0,12

P* - резистентан сој

5.9. Анти-ацетилхолинестеразна активност екстраката гљива

Употребом *in vitro* микродилуционог Елмановог теста одређен је проценат инхибиције ензима АСhЕ. Ипитани су ЕtОН, МеОН, Н₂О и ПСХ екстракти ПТ, М и Ф потопљених култура у опсегу концентрација од 100 до 9090 µg/mL, осим код ПСХ екстраката ПТ обе врсте где је опсег концентрација био од 568 до 9090 µg/mL.

ЕtОН екстракт Ф *C. comatus* показао је веома обећавајућу активност инхибиције АСhЕ (73,00±1,65 %) у односу на комерцијални лек донезепил (80,65±0,38 %) (Табела 5.5.). Активност лека и екстраката била је забележена при концентрацији 100 µg/mL након 10 минута деловања ензима. Остали испитивани екстракти испољили су слабије активности.

Према нашем сазнању ово су први резултати испитивања екстраката потопљених култура гљива у погледу потенцијалних инхибитора ензима АСhЕ. Активност АСhЕ активности до сада је била проучавана код екстраката ЕtОН екстраката ПТ следећих врста: *Trametes versicolor* (44,40±2,10 %) (Janjušević *et al.* 2017), *Lactarius deliciosus* и *Cantharellus cibarius* (24,04±1,18 и 6,80±0,02 %, редом) (Orhan & Üstün, 2011). Међутим, ЕtОН екстракт Ф потопљене културе врсте *C. comatus* показао је најпотентнију активност (73,00±1,65 %). Такође ПСХ екстракти ПТ обе врсте су показали значајан проценат инхибиције ензима АСhЕ али при већим испитивним концентрацијама (568 µg/mL).

Одређене студије истичу да поједина естарска, депсидонска и фенолна једињења доприносе инхибицији ензима АСhЕ (Pejin *et al.* 2008; 2012a; 2012b; 2013a; Xie *et al.* 2014;

Есе & Рејин 2015; Tommonaro *et al.* 2015), поред алкалоида као главне групе инхибитора ензима АСhЕ (Teles & Takahashi 2013).

Испитивањем појединачних фенолних једињења кверцетин и даидзеин показали су обећавајућу инхибиторну активност (Balkis *et al.* 2015), док је *p*-хидроксибензојева киселина показала умерену активност (Szwajgier & Borowiec, 2012). Исто тако депсидони пореклом од лишаја *Lobaria pulmonaria* препознати су као потенцијални инхибитори ензима АСhЕ (Рејин *et al.* 2012b). Такође, једињење аварол по природи секвитерпенски хидрохинон пореклом од морске врсте сунђера *Dysidea avara* показао се веома обећавајућим неуропротективним агенсом у случају Алцхајмерове болести (Tommonaro *et al.* 2016). С обзиром да лекови који се најчешће употребљавају у лечењу ове болести имају нежељене и пропратне ефекте испитивање и рад на откривању нових једињења инхибитора ензима АСhЕ је од великог значаја (Alva & Cummings 2008).

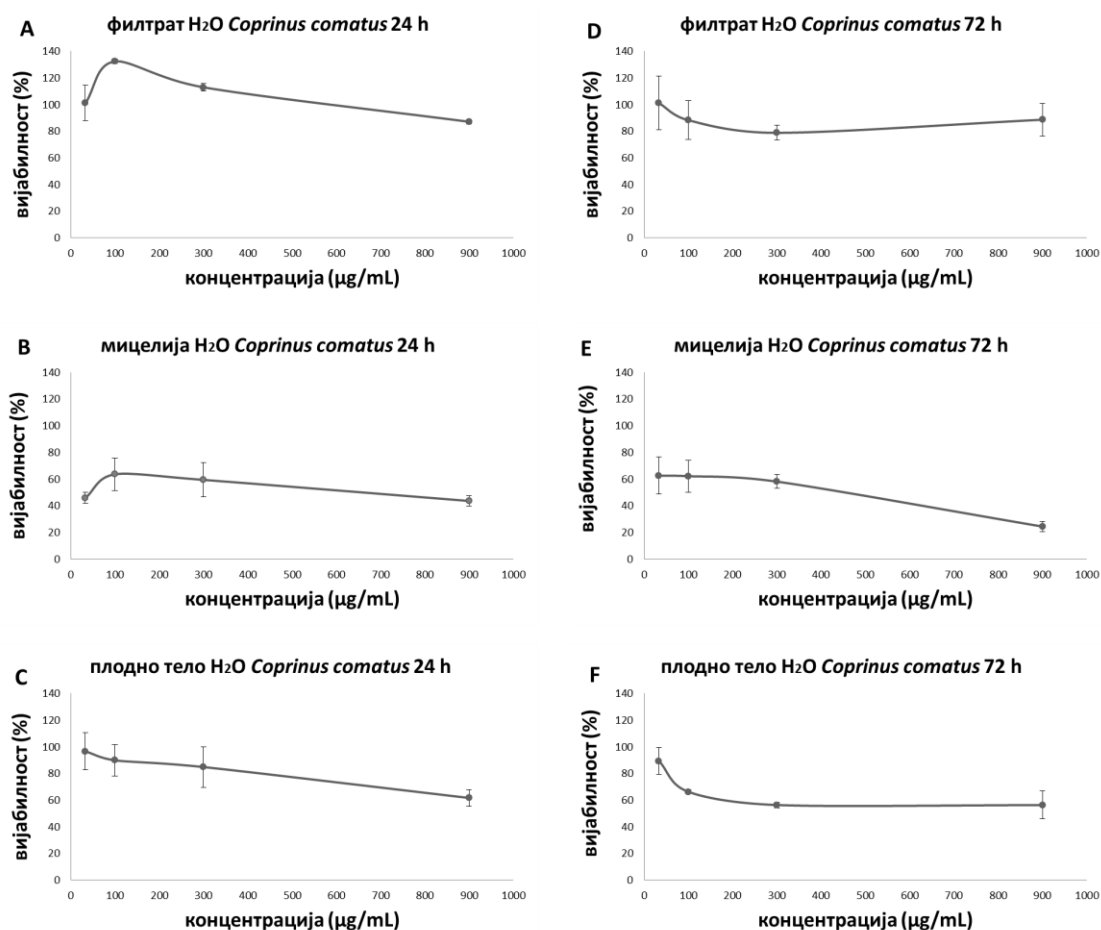
Табела 5.5 Анти-ацетилхолин естеразна активност

Екстракти	ЕtOH	MeOH	ПСХ	H ₂ O
<i>C. comatus</i>				
ПТ	26,80±2,21 ^c	1,71±0,44	46,10±4,02*	5,48±0,38
М	14,50±1,73 ^d	–	2,92±0,51	7,32±0,91
Ф	73,00±1,65^b	–	–	7,26±0,53
<i>C. truncorum</i>				
ПТ	–	3,83±0,46	46,58±1,72*	21,86±3,36
М	28,00±1,27	22,14±4,29	–	12,33±2,09
Ф	14,01±1,37	10,04±0,57	2,01±0,08	10,52±1,70

– активност није детектована при најмањој испитиваној концентрацији екстракта (100 µg/mL); *код обележених вредности активност је забележена при концентрацији екстракта 568 µg/mL

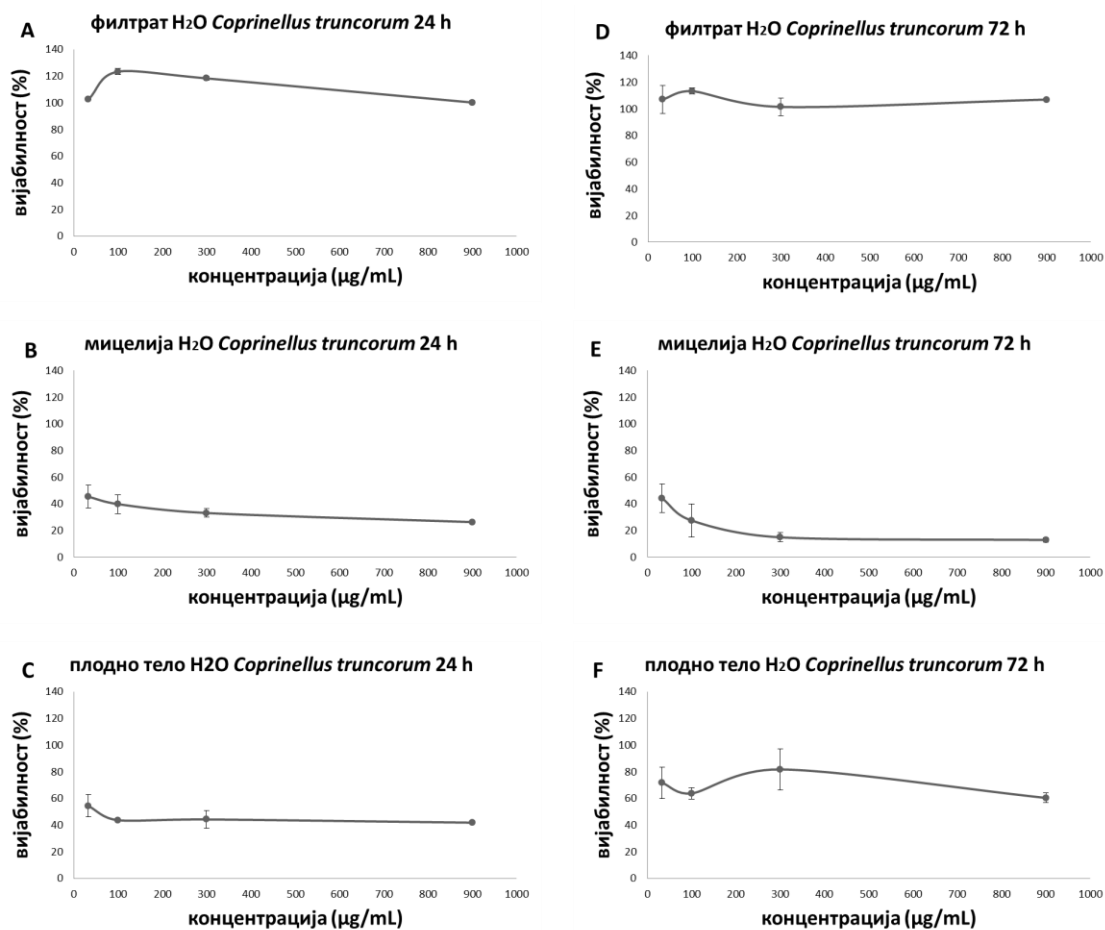
5.10. МТТ тест вијабилности ћелија НерG2

МТТ тестом праћен је проценат вијабилности ћелија НерG2. Анализирани су H₂O и ПСХ екстракти ПТ, М и Ф обе врсте, проценат вијабилности ћелија одређен је у односу на контролу, за коју се сматра да су ћелије 100% вијабилне. Ефекат екстраката на ћелије био је временски зависан, будући да се при дужем излагању вијабилност више смањивала. Најјачи утицај на смањење вијабилности показао је H₂O екстракт М *C. comatus* при најјачој тестираној концентрацији (смањио је вијабилност ћелија на 43% након 24 h и на 24% након 72 h) (Слика 5.24 В и Е), док H₂O екстракти ПТ и Ф *C. comatus* нису знатно смањили ћелијску вијабилност при најјачој тестираној концентрацији. Екстракт ПТ инхибирао је вијабилност на 61% након 24 h и 56% након 72 h (Слика 5.24 С, F), док је екстракт Ф инхибирао раст идентично након 24 h и 72 h на 87% (Слика 5.24 А, D).



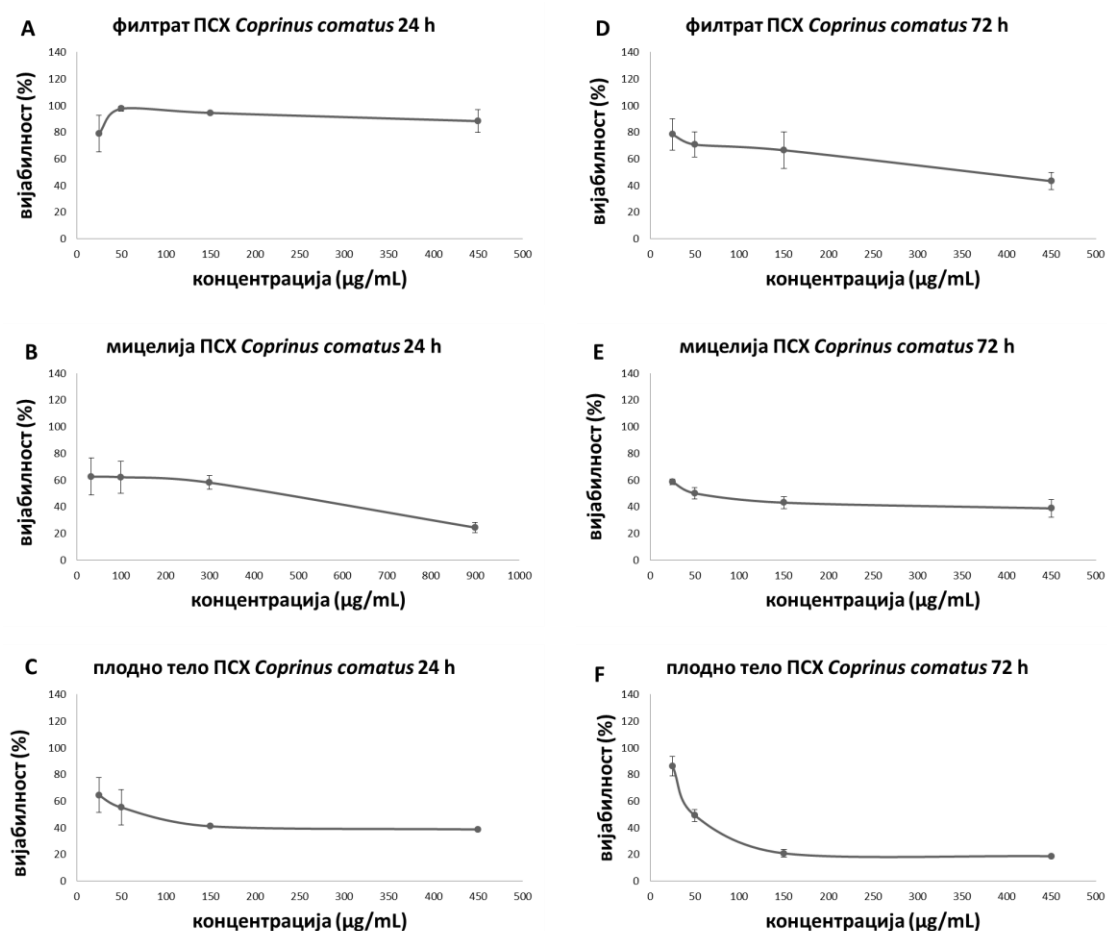
Слика 5.24 Вијабилност НерG2 ћелија након 24 h (A-C) и 72 h (D-F) третмана са H₂O екстрактима врсте *C. comatus*

Сличан тренд примећен је и у случају екстраката врсте *C. truncorum*, најјачи утицај на смањење вијабилности показао је H_2O екстракт *M. C. truncorum* (Слика 5.25 В и Е). Он је након 24 h при најјачој тестираној концентрацији (900 $\mu\text{g/mL}$) довео до смањења вијабилности на 26% и 13% након 72 h.



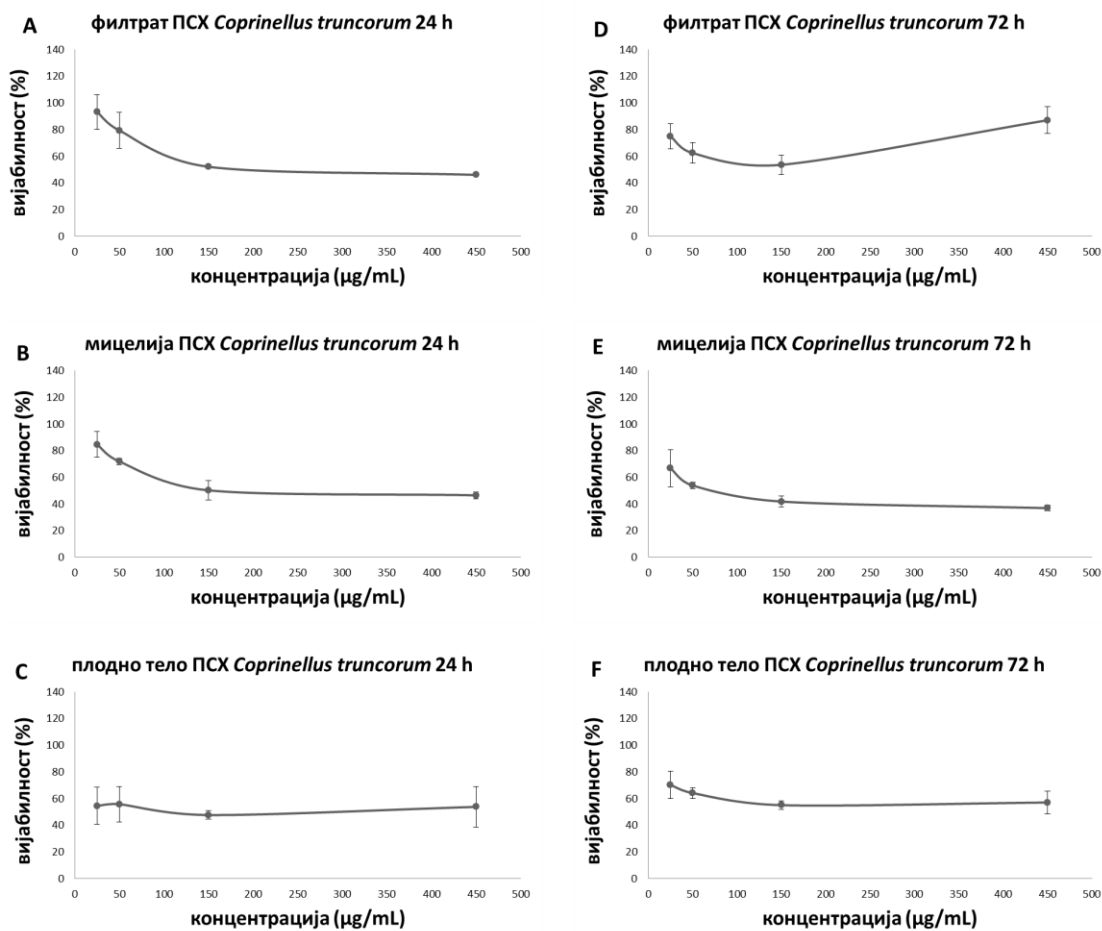
Слика 5.25 Вијабилност HepG2 ћелија након 24 h (A-C) и 72 h (D-F) третмана са H_2O екстрактима врсте *C. truncorum*

У случају ПСХ екстраката анализирани су ниже концентрације у опсегу од 25 до 450 $\mu\text{g/mL}$. Сви анализирани екстракти врсте *C. comatus* изазвали су смањење вијабилности међу којима је екстракт ПТ деловао најјаче (Слика 5.26 С и F). Он је при најјачој тестираној концентрацији 450 $\mu\text{g/mL}$ након 24 h довео до смањења вијабилности ћелија са 100% на 38% и на 18% након 72 h.



Слика 5.26 Вијабилност НерG2 ћелија након 24 h (A-C) и 72 h (D-F) третмана са ПСХ екстрактима врсте *C. comatus*

Код ПСХ екстракта *C. truncorum* примећен је сличан тренд смањења вијабилности, са изузетком екстракта Ф *C. truncorum* (Слика 5.27 D), код кога након 72 h није дошло до знатног пада вијабилности ћелија при највећој тестираној концентрацији проценат вијабилности био на 87%. Добијени резултат у сагласности је са МТТ тестом вијабилности ћелија рака дојке MCF-7 и H₂O екстракта врсте *M. giganteus* који је испољио инхибиторну активност према ћелијама након 24 h, али не и након 72 h (Karaman *et al.* 2009c).



Слика 5.27 Вијабилност HepG2 ћелија након 24 h (A-C) и 72 h (D-F) третмана са ПСХ екстрактима врсте *C. truncorum*

Сходно циљевима будућих експеримената одређивање вијабилности МТТ тестом може послужити као база за даља испитивања. Екстракти који су довели до смањења вијабилности ћелија имају предиспозицију у даљим испитивањима антитиморске активности, с обзиром на то да су испитиване ћелије туморског порекла. У ранијим студијама анализирана је антипролиферативна активност ЕтОН и Н₂О екстраката ПТ врсте *S. comatus* и *Coprinellus sp.* и забележена је смањена вијабилност ћелија канцера простате и естроген зависног канцера дојке (Gu & Leonard 2006; Zaidman *et al.* 2008). Показано је да и поједине маринске врсте гљива поседују антитуморску активност са акцентом на једињења која се издвајају као веома потентна у борби против леукемије (Pejin *et al.* 2013b; Pejin & Karaman 2017).

Познато је да одређена једињења гљива као што су терпеноиди и стероиди могу бити одговорни за апоптозу ћелије (Lau *et al.* 2004; Zjawioni, 2004; Wu *et al.* 2007; Jin *et al.* 2008). Такође, гликозиди мале молекулске масе и одређени секундарни метаболити изазивају смањење вијабилности у експериментима са туморским ћелијама (Beattie *et al.* 2011). Конкретно отровна врста гљиве *Omphalotus olearius* продукује трициклични сесквитерпен *илудин* који доводи до апоптозе ћелије, због чега се његова хемијска структура узима као основа за синтезу семисинтетичког антитуморског лека ирофулвена (Baekelandt, 2002). Илудини су детектовани и код врсте *S. comatus* (Gonzalez del Val *et al.* 2003), с обзиром на то да се екстрахују у мање поларним растварачима (нпр. ЕтОН), могуће је да су присутни код ПСХ екстраката наших испитиваних врста, услед сложене процедуре екстракције која подразумева почетну екстракцију у ЕтОН. Такође, флавоно бајкалеин и бајкалин (Табела 5.6; Табела 5.7), који су детектовани у Н₂О екстрактима анализираних гљива у овој студији, важе за потентна једињења антитуморске активности (Li-Weber, 2009).

Полисахариди (β -D-гљукани) и полисахаридно-протеински комплекси гљива такође, познати су по антипролиферативној активности (Xu *et al.* 2011; Zhao *et al.* 2010). Хемијском карактеризацијом ПСХ екстраката гљива утврђено је присуство β -гљукана и гљукана са α -глиоксидним везама у анализираним ПСХ екстрактима ПТ обе врсте, а планарном хроматографијом, утврђено је присуство велике количине D-глукозе код екстраката ПТ и Ф *S. truncorum* ПТ *S. comatus* и нешто мањег садржаја D-галактозе, манозе, фукозе и/или ксилозе. Док је код екстракта М *S. truncorum* и Ф и М *S. comatus* детектована галактоза и нешто мање глукозе и манозе.

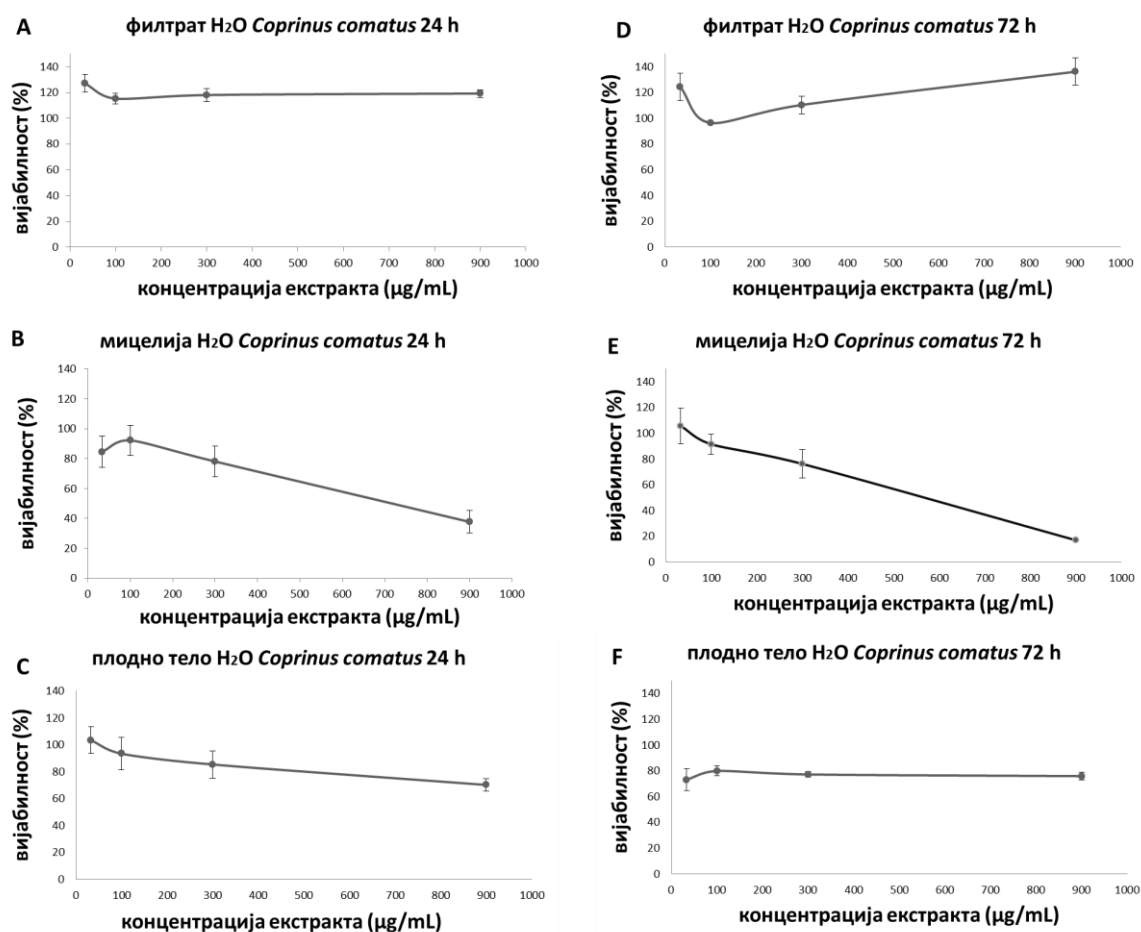
5.11. МТТ тест вијабилности ћелија Rin-5F

На вијабилност Rin-5F ћелија испитани су сви H₂O и ПСХ екстракти ПТ, М и Ф анализираних гљива (укупно дванаест испитиваних екстраката), од којих седам нису довели до смањења вијабилности ћелија.

Из доступне литературе познато је да H₂O и ПСХ екстракти пореклом из плодних тела врсте *C. comatus*, испољавају одређени антидијабетогени ефекат у *in vivo* студијама са пацовима, конкреттно довели су до смањења нивоа глукозе у крви од 17% до 49% (Han *et al.* 2006; 2008; 2009; Han & Liu 2009; Lv *et al.* 2009; Ma & Fu 2009; De Silva *et al.* 2012). Такође, екстракти плодног тела врсте *P. ostreatus* у експерименту са алоксански изазваним дијабетесом код пацова дали су позитивне резултате, делујући на смањење нивоа глукозе у крви за 43% у односу на контролну групу (Ravi *et al.* 2013). Познат је и протективни ефекат комерцијалног препарата врсте *C. comatus* који убрзава обнову бета ћелија панкреаса код пацова са алоксански изазваним дијабетесом (Џаро, 2013; Stilinović, 2013).

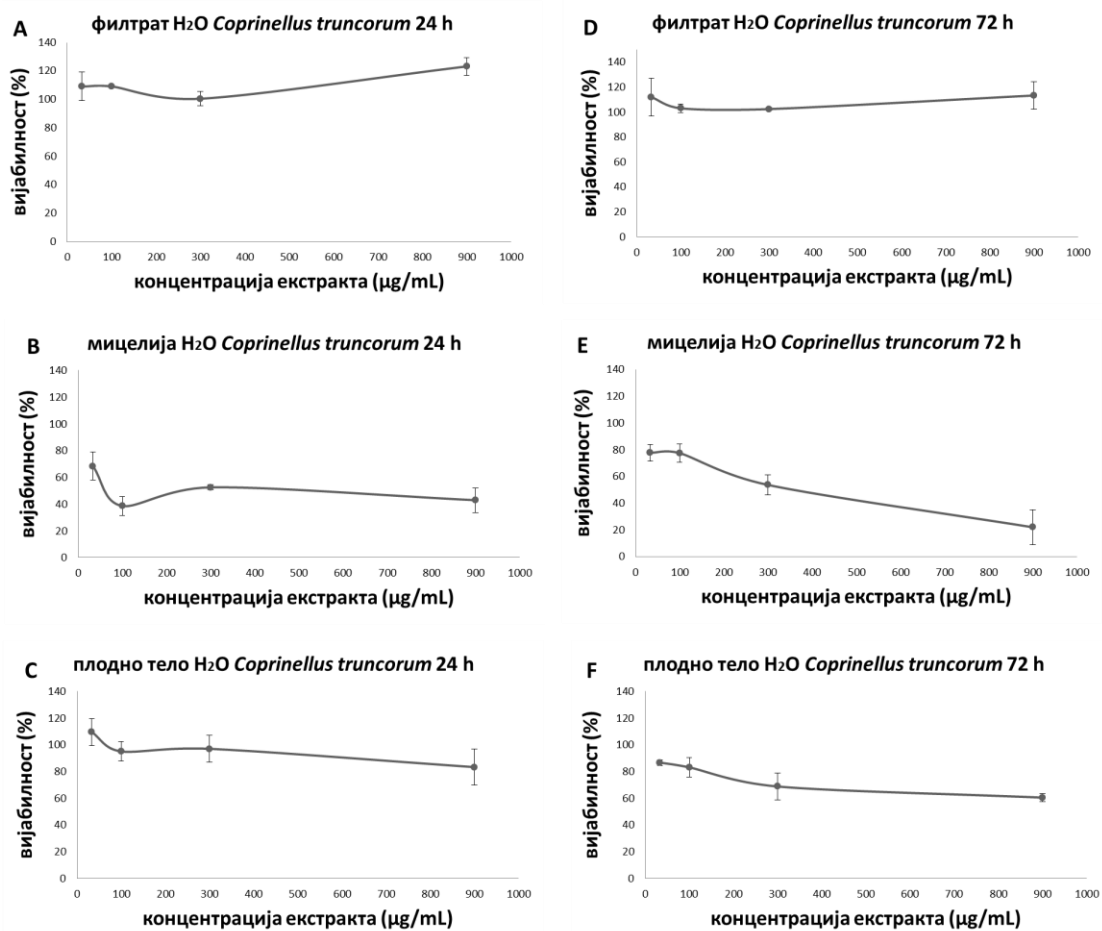
Осим експериментима *in vivo* на пацовима, протективни ефекат екстраката на бета ћелијама панкреаса може се пратити и на ћелијским линијама (Grdović *et al.* 2012). Анализирана је вијабилност Rin-5F ћелија након излагања стрептозотоцину (токсичном аналогу глукозе) и екстракту мешавине гљиве *Lactarius deterrimus* и кестена (*Castanea sativa*) (Grdović *et al.* 2012), при чему су екстракти гљиве и кестена појединачно или у мешавини утицали на побољшање преживљавања Rin-5F ћелија након третмана стрептозотоцином. Прецизније, проценат преживљавања се повећао са 46,30% (третман стрептозотоцином), на 55,10% након третмана са екстрактом гљиве и на 62,20% након третмана са кестеном, док се након третмана са комбинацијом екстраката гљиве и кестена повећао на 75,20% (Grdović *et al.* 2012).

У нашој студији од анализираних H₂O екстраката врсте *C. comatus* само је екстракт М потопљене културе довео до знатног смањења вијабилности, на 37% при најјачој анализираној концентрацији након 24 h (Слика 5.28 В) и на 17% при најјачој анализираној концентрацији након 72 h (Слика 5.28 Е), док екстракт Ф потопљене културе није уопште утицао на смањење вијабилност ћелија (Слика 5.28 А и D) и стога би га требало детаљније испитати у будућим истраживањима тј. његов потенцијални протективни ефекат на бета ћелије оштећене дијабетогеним агенсом. H₂O екстракт ПТ врсте *C. comatus* незнатно је смањивао ћелијску вијабилност на 70% након 24 h и на 76% након 72 h (Слика 5.28 С и F).



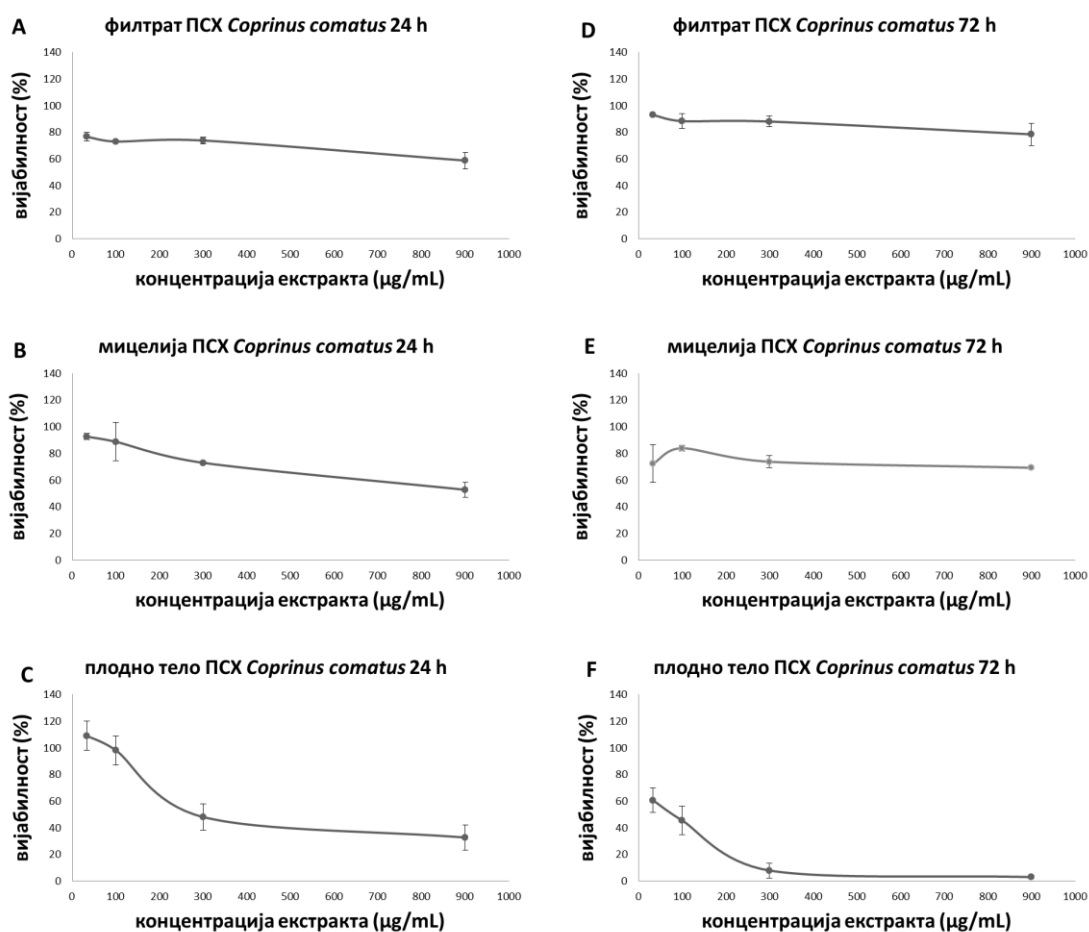
Слика 5.28 Вијабилност Rin-5F ћелија након 24 h (A-C) и 72 h (D-F) третмана са H₂O екстрактима врсте *C. comatus*

H₂O екстракти врсте *C. truncorum* испољили су сличне ефекте на вијабилност бета ћелија у поређењу са H₂O екстрактима *C. comatus*. Једино је екстракт М *C. truncorum* утицао на смањење вијабилности које је посебно уочљиво након продуженог (72 h) излагања ћелија екстракту (смањено је вијабилност на 22%) (Слика 5.29 Е). Док се у случају H₂O екстракта Ф *C. truncorum* након 24 h при највећој тестираној концентрацији (900 µg/mL) уочава повећање ћелијске вијабилности на 123% (Слика 5.29 А).



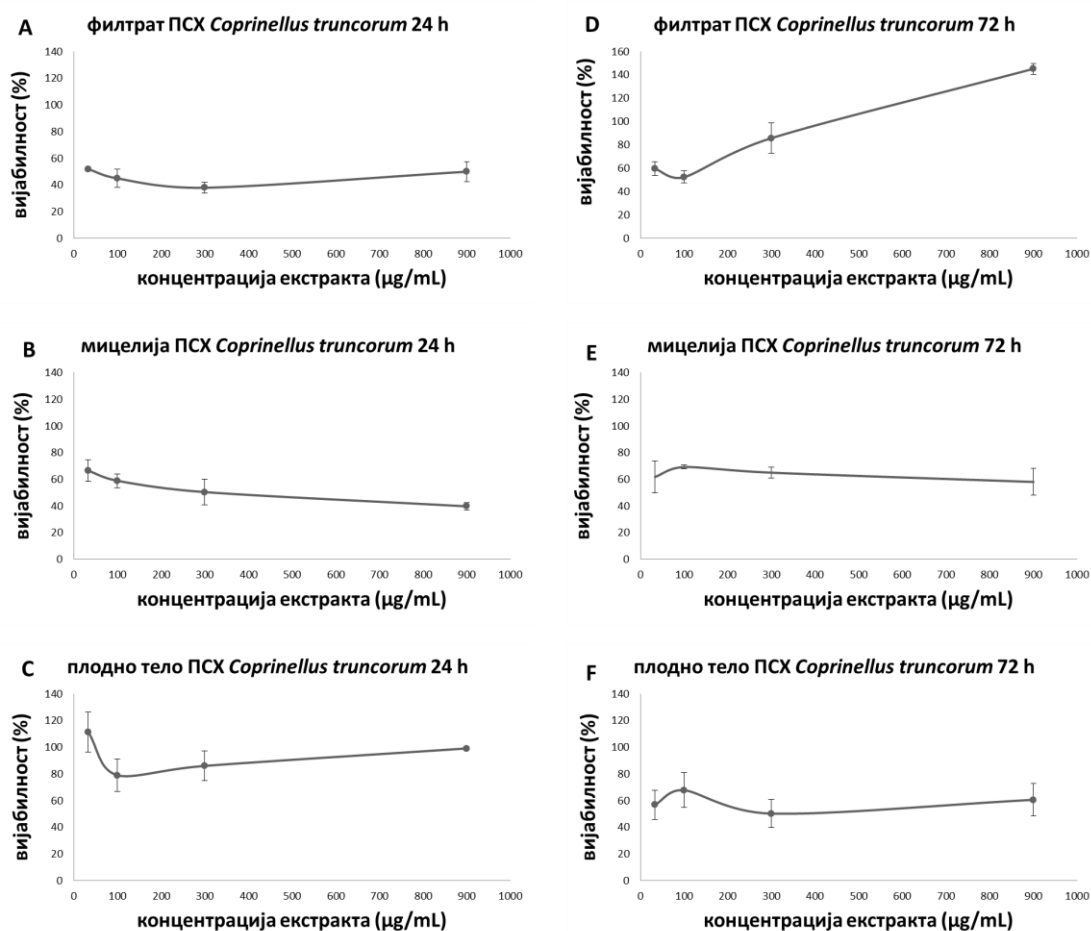
Слика 5.29 Вијабилност Rin-5F ћелија након 24 h (A-C) и 72 h (D-F) третмана са H₂O екстрактима врсте *C. truncorum*

ПСХ екстракти М и Ф *C. comatus* након 24 h нису значајније утицали на вијабилност (вијабилност је била смањена на 65% и на 53%) (Слика 5.30 А, В), на супрот екстракту ПТ који се показао веома инхибиторним према Rin-5F ћелијама што је посебно изражено након продуженог деловања екстракта (72 h) проценат вијабилности био је смањен на само 3% (Слика 5.30 F). Екстракти М и Ф *C. comatus* нису показали знатан утицај на смањење вијабилности ни након 72 h, напротив, види се исти тренд преживљавања који се задржава и при највећим анализираним концентрацијама и након продуженог деловања екстракта (72 h) (Слика 5.30 D и E).



Слика 5.30 Вијабилност Rin-5F ћелија након 24 h (A-C) и 72 h (D-F) третмана са ПСХ екстрактима врсте *C. comatus*

ПСХ екстракт Ф *C. truncorum* показао је исти тренд у активности као код ћелијске линије HepG2, тј. након 24 h утицао је на смањење вијабилности ћелија (на 50%), док након 72 h третмана не само да није испољио утицај, већ се вијабилност повећала при већим тестираним концентрацијама екстракта (на 145%) (Слика 5.31 A и D). Ово указује да су се ћелије опоравиле и да постоји стимулативни ефекат екстракта на ћелије и стога предлажемо даље испитивање његовог потенцијално протективног ефекта на бета ћелије оштећене дијабетогеним агенсом.



Слика 5.31 Вијабилност Rin-5F ћелија након 24 h (A-C) и 72 h (D-F) третмана са ПСХ екстрактима врсте *C. truncorum*

5.12. Хемијска карактеризација и квантитативна анализа гљива

Биолошка активност испитиваних екстраката варира је у знатној мери услед различитих типова екстракта (ПТ, М и Ф), али и због разлике у избору растварача током екстракције (80% EtOH, 70% MeOH и H₂O). Садржај и присуство биолошки активних једињења такође је варирао у зависности од типа екстракције, због чега је урађена хемијска карактеризација испитиваних екстраката гљива. Наиме, према литератури EtOH екстракти могу садржати терпеноиде, стероле, масне киселине, полипептиде и аминокиселине (Lindequist *et al.* 2005), док H₂O екстракти садрже једињења растворљива у води полисахариди, протеини и минерали (Von Usedom, 2003).

Спектрофотометријским методама одређен је укупан садржај фенола и флавоноида у свим анализираним екстрактима (EtOH, MeOH и H₂O), док је идентификација и квантификација фенолних киселина одређена LC-MS методом у свим анализираним екстрактима различите поларности (EtOH, MeOH, H₂O, CHCl₃ и ПСХ).

Укупан садржај протеина одређен у H₂O, а садржај укупних угљених хидрата у ПСХ екстрактима, док је методом FTIR (инфрацрвена спектроскопска метода са Фуријеовом трансформацијом) детектовано присуство веза између угљених хидрата и протеина присутних у полисахаридним екстрактима. Планарном хроматографијом детектовани су појединачни згљени хидрати, док је квалитативно и квантитативно одређивање биогених елемената уређено атомско-апсорпционом спектрофотометријском методом (AAS). Укупан садржај микро и макроелемената одређен је у ПТ, али и засебно у шеширу и засебно у дршци код обе гљиве. GC-MS методом је одређен и укупан садржај масних киселина код обе испитиване врсте.

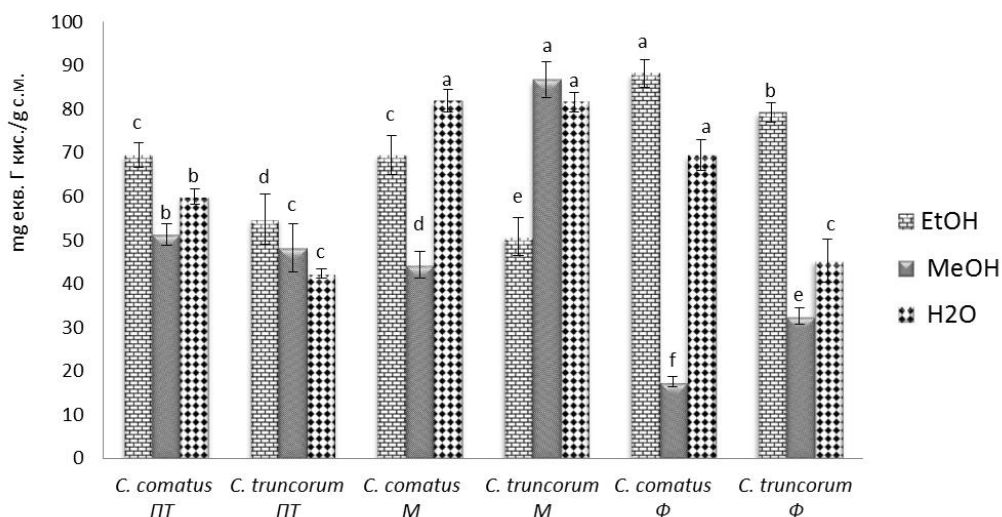
5.13. Укупан садржај фенола

Феноли се сматрају ефикасним антиоксидансима услед присуства хидроксилних група (Cai *et al.* 2004) због чега су често корелирани са антиоксидативном активношћу екстракта гљива (Karaman *et al.* 2014; Rašeta *et al.* 2016; Glumac *et al.* 2017; Janjušević *et al.* 2017; Tešanović *et al.* 2017).

Највећи садржај забележен је код EtOH екстракта Ф *C. comatus* (88,20±3,10 mg ек. ГК/g с.м) и MeOH екстракта М *C. truncorum* (86,72±4,08 mg ек. ГК/g с.м) што указује да су екстракти потопљених култура богатији у садржају фенола од екстраката ПТ (Слика 5.32). За врсту *C. truncorum* нема података у литератури у погледу укупног садржаја фенола, па су ово први налази према нашем сазнању.

Садржај фенола код врсте *C. comatus* анализиран је раније (Li *et al.* 2010). EtOH и H₂O екстракт ПТ *C. comatus* из Кине садржао је нешто мање фенола (13,50±1,18 и 20,00±0,44 mg/g) (Li *et al.* 2010) у односу на EtOH и H₂O екстракте ПТ из Србије (69,47±2,83 и 59,88±1,75 mg ек. ГК/g с.м).

Укупан садржај фенола



Слика 5.32 Упоредни приказ садржаја фенола у анализираним екстрактима

Утврђена је разлика укупног садржаја фенола према типу растварача, односно екстракта (MeOH, EtOH и H₂O) између анализираних врста, али и самих нивоа екстракције (ПТ, М и Ф) a,b,c,d,e,f - стубићи означени различитим словима статистички се значајно разликују (Tukey, HSD, $p < 0,01$; * $p < 0,05$). Код EtOH екстраката издвојило се пет група по разликама у активности, код MeOH шест, и код H₂O три (Слика 5.32).

5.14. LC-MS идентификација и квантификација фенолних киселина

LC-MS идентификацијом одређен је садржај фенолних киселина у свим анализираним екстрактима ПТ, М и Ф различитих поларности EtOH (Табела 5.8), MeOH (Табела 5.6), CHCl₃ (Табела 5.9), H₂O (Табела 5.7) и ПСХ Табела 5.10). Детектоване су следеће групе једињења: флаволи, флавоноли, флавонони, флаваноли, бифлавоноиди, изофлавоноиди, кумарини, хидроксibenзоеве, хидроксицинаминске, хлорогене и циклохексанкарбоксилне киселине.

Идентификацијом фенолних једињења уочене су разлике између фенолних профила код различитих врста екстракта. Томе у прилог, добро је познато да продукција фенола зависи од порекла гљиве, односно од супстрата на коме је расла (Smith *et al.* 2015).

Према томе, различита појединачна фенолна једињења или њихове специфичне комбинације присутне у различитим врстама екстракта (ПТ, М или Ф). Екстракти М и Ф и се по садржају фенола разликују од ПТ (Tešanović *et al.* 2017).

У литератури нема пуно доступних података о компаративном прегледу фенолних профила М и Ф са ПТ посебно у погледу врсте *C. truncorum* која је слабије испитана. Од свих испитаних екстраката ПСХ су се показали као најсиромашнији у садржају фенола.

Претпостављамо да је АО активност испитиваних екстраката испољена услед присуства фенолних једињења која се обично препознају као кључни антиоксиданси антиоксиданси код гљива (Puttaraju *et al.* 2006; Karaman *et al.* 2010, 2014; Li *et al.* 2010; Glumac *et al.* 2017), али и њихових различитих антиоксидативних механизма (Cai *et al.* 2004; Dimitrić Marković *et al.* 2017). АО активност фенола зависи од њихових хемијских структура, броја и положаја хидроксилних група (приписаних ароматичном прстену) и другим Н-донаторским групама (Cai *et al.* 2004).

Хининска киселина је детектована у свим анализираним екстрактима, а најбогатији садржај забележен је у МеОН екстрактима М и ПТ *C. truncorum* (580 µg/g и 104 µg/g, редом) (Табела 5.6) и Н₂О екстрактима ПТ обе врсте (146 µg/g и 215 µg/g, редом) (Табела 5.7). Хининска киселина се сматра антиоксидансом јер утиче на синтезу триптофана и никотинамида у гастроинтестиналном тракту, што накнадно има утицај на поправку ДНК (Pero *et al.* 2009). Слично је окарактерисана и *p*-хидроксибензојева киселина која се такође сматра антиоксидансом (McDonald *et al.* 2001). Она је у ЕтОН екстрактима М и Ф *C. comatus* и ПТ *C. truncorum* детектована у значајним концентрацијама (482 µg/g, 942 µg/g и 183 µg/g, редом) (Табела 5.8). Такође, исти тренд забележен је код МтОН екстраката М и Ф *C. comatus* и ПТ *C. truncorum* (297 µg/g, 752 µg/g и 145 µg/g) и Н₂О екстрактима М и Ф *C. comatus* (467 µg/g и 121 µg/g, редом).

Табела 5.6 Укупан садржај фенолних једињења у МеОН екстрактима

Класа	Једињење	МеОН екстракти (µg/g)					
		Сс ПТ	Сс М	Сс Ф	Ст ПТ	Ст М	Ст Ф
Флавони	Кризоериол	0,17	0,13	–	–	–	–
	Витексин	0,19	0,57	–	–	–	0,30
	Апигенин-7-О- глукозид	0,44	0,42	0,18	0,12	0,11	0,25
	Лутеолин-7-О- глукозид	0,36	0,16	0,17	0,10	0,10	0,17
	Апиин	–	0,34	–	0,17	–	0,17
	Бајкалин	3,96	–	–	–	–	–
	Изорамнетин	3,90	2,84	2,25	2,69	2,69	2,77
	Кемферол -3-О- глукозид	0,44	0,45	0,229	–	0,140	0,28
	Хиперозид	–	–	0,11	–	–	–
	Кверцетин-3-О- глукозид	–	–	0,13	–	–	–
Флаваноли	Катехин	–	6,79	12,70	13,10	4,71	6,61
	Епикатехин	–	–	8,70	8,70	–	–
Бифлавоноиди	Аментофлаван	0,29	–	0,12	–	–	–
Изофлавоноиди	Даидзеин	–	38,70	43,10	–	2,94	9,01
	Генистеин	–	22,60	18,10	–	1,64	3,48
Хидроксибензоеве киселине	<i>p</i> -хидроксибензоева киселина	11,20	297	752	145	5,20	88,40
	Протокатехинска киселина	1,71	25	65,30	3,76	4,87	20,60
	Ванилинска киселина	–	23,40	42,20	–	29,10	–
	Гална киселина	–	–	7,93	–	5,46	–
	Гентизинска киселина	–	0,26	–	1,09	–	–
	Цинаминска киселина	29,70	28,20	24,30	66,80	–	19,40
Хидроксицинаминске киселине	<i>p</i> -кумаринска киселина	2,36	3,44	2,92	40,60	1,28	11,30
	<i>o</i> -кумаринска киселина	–	–	0,38	–	0,262	1,44
	Кафена киселина	0,66	0,66	0,66	1,88	1,81	1,39
Кумарини	Ескулетин	–	0,48	–	0,511	–	–
	Умбелиферон	–	–	–	1,04	0,936	–
Циклохексанкарбоксилне киселине	Хининска киселина	132	37,30	5,77	104	580	87,70
Хлорогене киселине	5-О-кафеоилхинска киселина	2,17	0,64	0,48	–	–	0,64
Укупно	–	189,55	489,38	987,73	389,56	641,25	253,91

– једињење није детектовано

Табела 5.7 Укупан садржај фенолних једињења у H₂O екстрактима

Класа	Једињење	Екстракти H ₂ O (µg/g)					
		Сс ПТ	Сс М	Сс Ф	Ст ПТ	Ст М	Ст Ф
Флавоени	Апигенин	1,41	1,03	1,61	1,25	0,57	0,29
	Бајкалеин	5,44	2,69	3,72	2,06	–	– ^a
	Кризоериол	1,43	1,37	1,53	1,25	1,08	0,57
	Витексин	1,93	1,61	2,77	1,09	1,61	0,76
	Апигенин-7-О-глукозид	2,01	2,38	1,81	1,26	1,23	0,61
	Лутеолин-7-О-глукозид	0,70	0,34	0,38	0,15	0,37	0,37
	Апиин	1,70	1,19	2,11	1,78	0,97	0,34
	Бајкалин	8,98	6,68	8,29	6,88	6,88	4,70
	Кверцетин	30,10	28,60	27,80	28,30	27,90	27,90
	Изорамнетин	5,82	5,94	6,38	4,58	5,04	4,64
Флавоноли	Кверцитрин	1,08	0,75	0,96	0,25	–	–
	Кемферол -3-О-глукозид	1,82	1,78	1,58	1,51	1,49	0,61
	Хиперозид	0,26	–	0,35	–	0,18	0,26
	Кверцетин-3-О-глукозид	1,05	0,22	0,49	0,40	–	0,49
Флаванони	Рутин	1,46	0,39	0,77	–	–	–
	Нарингенин	2,59	1,98	2,83	1,54	1,26	0,90
Флаваноли	Катехин	4,54	6,09	10,10	–	4,37	6,79
	Епикатехин	3,36	–	3,92	3,92	6,24	9,33
Бифлавоноиди	Аментофлавоин	4,84	3,61	3,47	3,32	1,92	2,14
Изофлавоноиди	Даидзеин	0,61	24,60	31,50	–	5,28	12,10
	Генистеин	0,23	21	16,70	–	1,50	5,40
Хидроксибензојеве киселине	<i>p</i> -хидроксибензојева киселина	9,28	467	121	45,20	25,40	42,30
	Протокатехинска киселина	4,80	48,60	8,32	8,46	20,90	0,40
	Ванилинска киселина	–	22,60	–	24,20	–	–
	Гална киселина	–	5,46	5,25	2,59	6,92	2,36
	Гентизинска киселина	–	–	1,15	0,21	0,73	–
	Сирингинска киселина	3,56	–	10,10	–	–	–
	Цинаминска киселина	–	51,40	–	–	–	–
	<i>p</i> -кумаринска киселина	1,85	36,10	1,35	4,08	1,49	10,80
	<i>o</i> -кумаринска киселина	1,16	1,30	1,05	1,08	0,89	0,89
	Кафена киселина	1,58	1,39	1,65	1,18	1,13	1,39
Хидроксицинаминске киселине	Ферулна киселина	1,49	–	–	–	–	–
	Ескулетин	1,48	0,57	0,75	0,60	0,54	0,33
	Скополетин	1,97	–	1,08	1,11	1,33	–
	Умбелиферон	1,60	–	1,30	0,80	–	–
Циклохексанкарбоксилне киселине	Хининска киселина	146	61	34,8	215	20,80	49,70
Хлорогене киселине	5-О-кафеилхинска киселина	5,54	1,93	2,25	1,12	1,16	2,49
Укупно	–	261,67	809,60	319,12	365,17	149,18	188,86

– једињење није детектовано

Хининска и *p*-хидроксибензојева киселина могу имати значајан допринос у укупној АО активности, баш као и цинаминска и кафена киселина које се помињу у контексту АО активности (Sužnjević *et al.* 2011). Поред тога, даидзеин и генистеин су познати као антиоксиданси (Han *et al.* 2009), али и као анти-туморски агенси (Birt *et al.* 2001). Штавише,

за генистеин се претпоставља да је добар у превенцији дијабетеса (Fraga, 2009). LC-MS анализа екстракта *Ф. С. comatus* показала је присуство сва три једињења: *p*-хидроксибензојеве киселине, кверцетина и даидзеина, па ови природни производи могу бити, бар делимично одговорна за запажену АСhЕ инхибиторну активност.

Табела 5.8 Укупан садржај фенолних једињења у ЕtОН екстрактима

Класа	Једињење	ЕtОН екстракти (µg/g)					
		СсПТ	СсМ	СсФ	СtПТ	СtМ	СtФ
Флавони	Кризоериол	–	0,13	0,15	–	–	–
	Витексин	–	0,27	0,24	–	0,15	–
	Апигенин-7- <i>O</i> -глукозид	0,22	0,21	0,24	0,17	0,26	0,32
	Лутеолин-7- <i>O</i> -глукозид	0,30	0,16	0,26	0,16	0,17	0,15
	Апиин	–	0,20	0,15	0,14	–	0,27
	Бајкалин	–	–	–	–	–	3,85
	Кверцетин	–	–	28,10	27,90	–	–
	Изорамнетин	3,27	3,83	3,83	4,03	2,69	3,55
Флавоноли	Кемферол	–	0,83	–	–	–	–
	Кемферол-3- <i>O</i> -глукозид	0,28	0,33	0,33	0,18	0,21	0,37
	Хиперозид	–	–	0,18	–	–	–
	Кверцетин-3- <i>O</i> -глукозид	0,13	0,13	0,31	–	–	–
Флавонони	Нарингенин	0,78	0,86	0,94	–	–	–
Флаваноли	Катехин	–	12,10	17,20	10,30	7,33	5,22
	Епикатехин	–	5,07	8,07	7,45	–	–
Бифлавоноиди	Аментофлаван	1,10	0,54	0,76	0,38	–	0,24
Изофлавоноиди	Даидзеин	–	92,20	71,30	–	33,70	10,60
	Генистеин	–	99,30	28	–	13,20	6,12
Хидроксибензојеве киселине	<i>p</i> -хидроксибензојева киселина	15,40	482	942	183	30,70	162
	Протокатехинска киселина	2,85	39,60	79,60	9,51	0,50	25,70
	Ванилинска киселина	–	39,30	32,70	–	–	31,10
	Гална киселина	–	6,92	10,40	8,72	9,49	–
	Гентизинска киселина	–	0,94	1,25	1,30	–	–
	Сирингинска киселина	4,18	5,10	–	7,57	–	–
	Цинаминска киселина	186	–	30,60	30,60	39	26,70
	<i>p</i> -кумаринска киселина	8,09	5,51	12,70	41,20	16,80	13,60
	<i>o</i> -кумаринска киселина	–	–	0,38	–	1,59	2,04
	Кафена киселина	2,96	0,78	0,90	1,84	0,80	1,32
Кумарини	Ескулетин	0,51	0,33	0,72	0,54	–	–
	Умбелиферон	0,67	–	–	–	–	–
Циклохексанкарбоксилне киселине	Хининска киселина	46,10	1,31	1,85	71,30	10,80	1,85
Хлорогене киселине	5- <i>O</i> -кафеоилхинска киселина	1,24	0,60	0,92	0,36	0,72	0,68
Укупно	–	274,08	798,55	1274,08	406,65	168,11	295,68

– једињење није детектовано

Кверцетин који је битан у исхрани (Ho *et al.* 1992) као и хининска киселина (Pero & Lund 2011; Barros *et al.* 2013; Novaković *et al.* 2016) детектовани су у већини испитиваних екстраката. Ванилинска киселина је такође присутна у већини екстраката. Ова киселина је посредник у производњи ванилина из ферулинске киселине, који је један од омиљених арома, а осим тога има и важне хранљиве вредности (Ho *et al.* 1992). У ранијим испитивањима фенолног профила ПТ гљиве *C. comatus* ванилинска киселина није била детектована (Vaz *et al.* 2011). Ова и слична једињења могу допринети значају гљива као нутрацеутика, нарочито су корисна сазнања о потопљеној култивацији гљива *C. comatus* и *C. truncorum*.

Табела 5.9 Укупан садржај фенолних једињења у CHCl_3 екстрактима

Класа	Једињење	CHCl_3 екстракти ($\mu\text{g/g}$)					
		СсПТ	СсМ	СсФ	СтПТ	СтМ	СтФ
Флавонони	Кризоериол	–	–	0,14	–	–	–
	Витексин	0,21	–	–	–	–	–
	Апигенин-7-О-глукозид	0,20	0,19	0,15	–	–	0,11
	Лутеолин-7-О-глукозид	0,13	–	0,12	0,21	–	0,13
Флаваноли	Апиин	–	0,12	–	–	–	–
	Кверцетин	–	–	27,80	–	–	–
Флаванони	Кемферол -3-О-глукозид	0,38	0,10	0,37	–	–	–
Флаваноли	Нарингенин	–	–	1,14	–	–	–
	Катехин	–	–	4,20	–	–	2,39
Изофлавоноиди	Епикатехин	–	–	–	–	7,45	9,33
	Даидзеин	–	8,76	149	–	1,11	19,10
	Генистеин	–	5,19	60	–	0,27	1,64
Хидроксибензоове киселине	<i>p</i> -хидроксибензоева киселина	2,69	28,10	3983	3,01	12,80	11,70
	Протокатехинска киселина	–	0,44	19,50	–	–	–
	Ванилинска киселина	–	–	122	–	–	–
	Гална киселина	–	–	10,10	–	–	–
Хидроксицинаминске киселине	Сирингинска киселина	2,65	3,87	85	–	–	9,75
	Цинаминска киселина	132	41	115	25,70	47,40	–
	<i>p</i> -кумаринска киселина	0,53	5,64	28,70	1,08	1,29	6,31
	<i>o</i> -кумаринска киселина	0,53	1,36	3,93	0,21	0,74	0,41
Кумарини	Ферулна киселина	–	–	2,20	–	–	–
	Ескулетин	0,51	–	0,57	0,36	0,27	–
	Скополетин	–	–	–	1,23	1,63	–
Циклохексанкарбоксилне киселине	Умбелиферон	–	1,13	1	–	–	–
	Хининска киселина	6,73	–	1,96	13,80	–	–
Хлорогене киселине	5-О-кафеоилхинска киселина	0,48	–	–	0,20	–	0,40
Укупно	–	147,04	95,90	4615,88	45,80	72,96	61,27

– једињење није детектовано

Табела 5.10 Укупан садржај фенолних једињења у ПСХ екстрактима

Класа	Једињење	ПСХ екстракти (µg/g)					
		Сс ПТ	Сс М	Сс Ф	Ст ПТ	Ст М	Ст Ф
Флавони	Апигенин	–	5,26	4,05	–	4,05	–
	Бајкалеин	–	4,40	3,05	–	12,20	–
	Лутеолин	–	25,40	24,90	–	–	–
	Кризоериол	0,02	5,49	3,67	0,04	1,37	–
	Витексин	0,24	2,75	3,46	–	–	–
	Апигенин-7-О- глукозид	0,18	3,28	2,43	0,19	–	–
	Лутеолин-7-О- глукозид	0,15	17,40	10,80	0,14	–	–
	Апиин	0,04	4,27	2,94	–	–	–
	Кемферол	–	16,20	14,20	–	–	–
	Кверцитрин	–	6,84	4,44	–	–	–
Флавоноли	Кемферол -3-О- глукозид	–	4,06	–	–	–	–
	Хиперозид	–	–	–	0,11	–	–
	Кверцетин-3-О- глукозид	0,31	–	–	–	–	–
	Рутин	–	5,46	6,65	–	–	–
Флаваноли	Катехин	2,88	–	–	–	–	–
Бифлавоноиди	Аментофлаван	–	291	175	–	112	85,50
	<i>p</i> -хидроксибензоева киселина	11,80	–	–	2,81	–	–
Хидроксибензоеве киселине	Протокатехинска киселина	0,95	2,20	1,89	1,75	–	–
	Гална киселина	5,25	–	–	7,93	–	–
	Цинаминска киселина	–	84,20	67,60	–	–	–
	<i>p</i> -кумаринска киселина	0,48	2,61	3,14	0,53	–	–
Хидроксицинаминске киселине	<i>o</i> -кумаринска киселина	0,33	2,22	1,35	0,16	–	–
	Кафена киселина	–	10,80	14,80	–	–	–
	Ферулна киселина	–	3,66	2,99	–	–	–
Кумарини	Ескулетин	–	5,52	4,97	–	–	–
	Умбелиферон	0,71	–	–	–	–	–
Циклохексанкарбоксилне киселине	Хининска киселина	1,85	–	–	2,51	–	–
Хлорогене киселине	5-О-кафеоилхинска киселина	2,29	–	–	2,13	–	–
Укупно	–	27,48	503,02	352,33	18,31	129,62	85,50

– једињење није детектовано

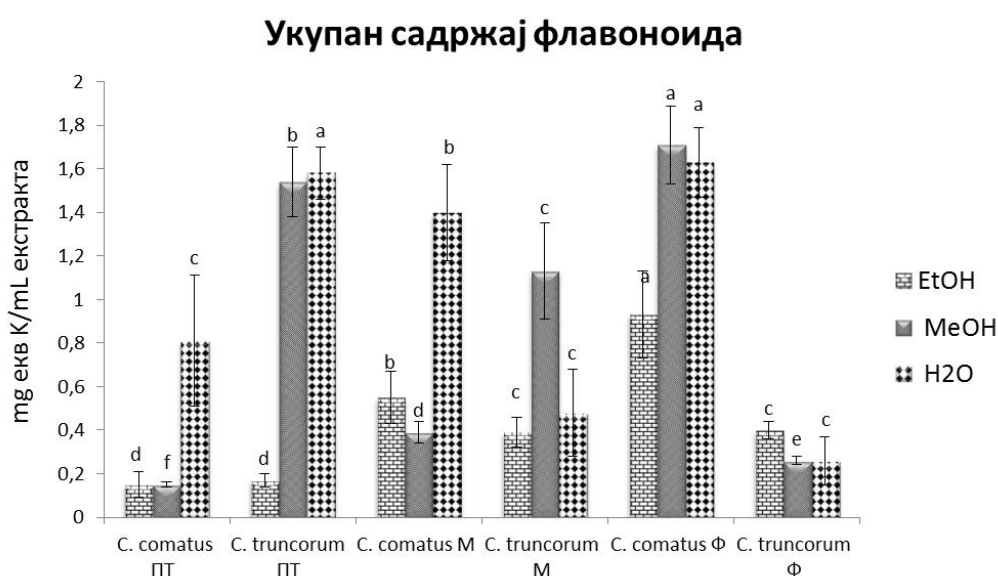
Од свих испитаних екстраката H₂O екстракти су се показали као најбогатији по укупном садржају фенола. Код њих је детектовано 37 различитих фенолних једињења, док је код осталих екстраката детектовано мање (EtOH 32, MeOH и ПСХ по 28 и CHCl₃ 26 различитих једињења). У погледу зступљености код H₂O и EtOH екстраката *p*-хидроксибензоева и хининска киселина забележиле су знатну присутност код свих типова

екстраката ПТ, М и Ф, баш као и даидзеин и генистеин, који су били детектовани доминантно у екстрактима потопљених култура (М и Ф) (Табела 5.7; Табела 5.8). Слично је и код анализираних МеОН екстраката (Табела 5.6), *p*-хидроксибензоева и хининска киселина су најзаступљеније, док су даидзеин и генистеин детектовани само код екстраката потопљених култура (М и Ф). Код CHCl_3 екстраката издвојио се екстракт Ф *S. comatus* који је забележио већи садржај кверцетина, даидзеина, генистеина али и у односу на остале анализираних CHCl_3 екстракте (Табела 5.9). Такође, код истог екстракта, забележена је највећи садржај *p*-хидроксибензоеве киселине (3983 $\mu\text{g/g}$) у односу на све анализираних типове екстраката. Код ПСХ екстраката најдоминантније једињење било је аментофлавон који је забележен само код екстраката потопљене културе (Табела 5.10).

5.15. Укупан садржај флавоноида

Укупан садржај флавоноида одређен је у свим анализираним екстрактима (ПТ, М и Ф) обе врсте. Код свих анализираних екстраката врсте *S. comatus* уочена је правилност у укупном садржају флавоноида, највише их је детектовано код екстракта Ф и М потопљених култура, и најмање у екстрактима ПТ (Слика 5.33).

Код врсте *S. truncorum* ЕтОН и МеОН екстракти ПТ истакли су се по високом садржају флавоноида, у односу на екстракте из потопљене културе (Слика 5.33). ЕтОН и H_2O екстракти ПТ врсте *S. comatus* из Кине забележили су већи садржај флавоноида (3,52 \pm 0,20 и 0,19 \pm 0,02 mg/g ЕтОН и H_2O екстракт, редом) у односу на испитивани сој *S. comatus* у нашој студији (0,15 \pm 0,06 и 0,81 \pm 0,30 mg ек. K/g с.м. за ЕтОН и H_2O екстракт, редом). За врсту *S. truncorum* нема података у литератури у погледу укупног садржаја флавоноида, ово су први налази према нашем сазнању.



Слика 5.33 Упоредни приказ укупног садржаја флавоноида у анализираним екстрактима

Статистички значајна разлика између укупног садржаја флавоноида у екстрактима одређена је помоћу Tukey теста са нивоом значајности $p < 0,01$ (Tukey, HSD, ANOVA). Упоредјени су резултати активности по типу екстракта (ПТ, М и Ф) у оквиру истог растварача (MeOH, EtOH и H₂O). Ознаке a,b,c,d,e,f - представљају разлике у активности између екстракта. Код EtOH екстраката издвојиле су се четири групе по разликама у активности, код MeOH шест, а код H₂O три.

5.16. Укупан садржај протеина

Укупан садржај протеина забележен је у H₂O екстрактима ПТ и М обе врсте, док протеини у екстрактима Ф нису били детектовани (**Error! Reference source not found.**). ајвећи садржај детектован је у екстрактима ПТ обе врсте ($10,95 \pm 0,68$ mg ек протеина/mL екстракта и $11,24 \pm 0,96$ mg ек протеина/mL екстракта код *C. comatus* и *C. truncorum*, редом).

Екстракти М показали су нешто нижи садржај протеина ($8,04 \pm 1,68$ mg ек протеина/mL екстракта, код *C. comatus* и $6,87 \pm 1,16$ mg ек протеина/mL екстракта код *C. truncorum*). За врсту *C. truncorum* нема података о садржају протеина до сада, а за *C. comatus* раније је детектован укупан садржај протеина који је у сагласности са нашим резултатима ($11,84$ g/100 g с.м.) (Stojković *et al.* 2013). Протеини имају способност да делују на липидну оксидацију, наиме албумини и трансферини способни су да спрече формирање реактивних супстанци тиобарбитурне киселине (Elias *et al.* 2008). Генерално, протеини мале молекулске масе сматрају се антиоксидансима. Металопротеини и ензими присутни у

гљивама, попут каталазе и глутатион-S-трансферазе имају улогу антиоксиданса (Qin *et al.* 2007; Sánchez, 2017).



Слика 5.34 Упоредни приказ укупног садржаја протеина у анализираним екстрактима

Утврђена је разлика укупног садржаја протеина у H₂O екстрактима између анализираних врста, али и самих нивоа екстракције (ПТ и М) а, b - стубићи означени различитим словима статистички се значајно разликују (Tukey, HSD, $p < 0,01$; $*p < 0,05$).

5.17. Укупан садржај угљених хидрата

Укупан садржај угљених хидрата одређен је у ПСХ екстрактима ПТ, М и Ф код обе врсте. Екстракти су били најбогатији глукозом (опсег детектованих концентрација од 8399,85 до 16802,04 mg ек. Glc/g с.м.), затим фруктозом (од 3891,25 до 1932,25 mg ек. Fru/g с.м.) и ксилозом од 2743,39 до 1116,90 mg ек. Xyl/g с.м.), а најмање су садржали сахарозе (од 9,03 до 56,35 mg ек. Sah/g с.м.) (Слика 5.35).

ПСХ екстракт М *C. truncorum* истакао се као најбогатији у садржају угљених хидрата. Генерално екстракти потопљених култура М и Ф истакли су се по већем укупном садржају угљених хидрата у одосу на ПСХ екстракт пореклом од ПТ, што је највероватније условљено саставом супстрата на коме је гљива расла, ПТ из природе и М из потопљене културе.



Слика 5.35 Упоредни приказ заступљености угљених хидрата у анализираним екстрактима

Статистички значајна разлика између укупног садржаја угљених хидрата у екстрактима одређена је помоћу Тукеу теста са нивоом значајности $p < 0,01$ и * $p < 0,05$ (Tukey, HSD, ANOVA). Поређење је рађено у колонама (Табела 5.11). Упоређени су резултати укупног садржаја глюкозе, фруктозе, ксилозе и сахарозе у различитим ПСХ фракцијама ПТ, М и Ф обе гљиве.

Табела 5.11 Укупан садржај угљених хидрата у анализираним полисахаридним екстрактима

Екстракти	глюкоза	фруктоза	ксилоза	сахароза
<i>C. comatus</i>				
ПТ	8778,07±254,09 ^e	2020,44±59,24 ^e	1116,9±34,20 ^d	9,03±1,33 ^f
М	13658,49±960,05 ^c	3158,32±690,15 ^c	1977,64±25,03 ^b	34,09±2,15 ^c
Ф	16151,56±696,24 ^b	3739,59±162,3 ^b	1984,75±39,28 ^b	24,13±1,92 ^d
<i>C. truncorum</i>				
ПТ	8399,85±139,10 ^f	1932,25±32,43 ^f	1154,09±53,36 ^d	20,57±0,80 ^e
М	16802,04±935,9 ^a	3891,25±451,36 ^a	2743,39±23,04 ^a	56,35±5,30 ^a
Ф	12273,08±930,3 ^d	2835,31±216,90 ^d	1664,09±2,25 ^c	40,80±2,25 ^b

a,b,c,d,e,f - ознаке представљају разлике у активности између екстракта одређене Тукеу тестом са нивоом значајности $p < 0,01$. У свакој колони различита слова означавају значајну статистичку разлику

5.18. Корелације

У циљу поређења резултата садржаја укупних фенола (УФ), флавоноида (УФл) и протеина (УП) са АО и АР активностима примењена је линеарна регресиона корелациона анализа (R^2) (Excell, 2013). Урађена је корелација за анализирани екстракте ПТ, М и Ф обе врсте. Поређени су резултати спектофотометријских тестова (ОН, DPPH, ABTS и FRAP) са садржајем УФ, УФл, и УП (у анализираним екстрактима). Метода НРМС корелирана само са укупним полисахаридима (УПСХ). Вредност коефицијента корелације одређен је скалом са слећим вредностима: 0,75-1 јака корелација; 0,50-0,75 средња корелација; 0,25-0,50 слаба корелација и 0-0,25 занемарљива корелација (Udovičić *et al.* 2007).

Добијене су јаке корелације за укупан садржај фенола и ОН, ABTS и FRAP теста (Табела 5.12), а вредност корелација кретала се од 0,84 до 0,87. Корелације указују да фенолна једињења могу знатно допринети активностима анализираних екстракта, оне су у складу са ранијим студијама за екстракте ПТ одређених гљива (Karaman *et al.* 2014; Теџановић *et al.* 2017). Укупан садржај флавоноида показао је средњу и слабу корелацију са спектрофотометријским тестовима, док је за укупан садржај протеина добијена јака корелација појединих екстраката са свим спектрофотометријским тестовима (вредност корелације кретала се 0,99 до 0,88). Корелација протеина са АР и АО активностима указује да су протеини гљива у вези са испољеним АР и АО активностима. Метода НРМС корелирана је само са укупним полисахаридима, екстракти ПТ *C. truncorum* и М *C. truncorum* показали су јаку корелацију, 0,83 и 0,81 редом.

Табела 5.12 Коефицијент корелације укупних садржаја

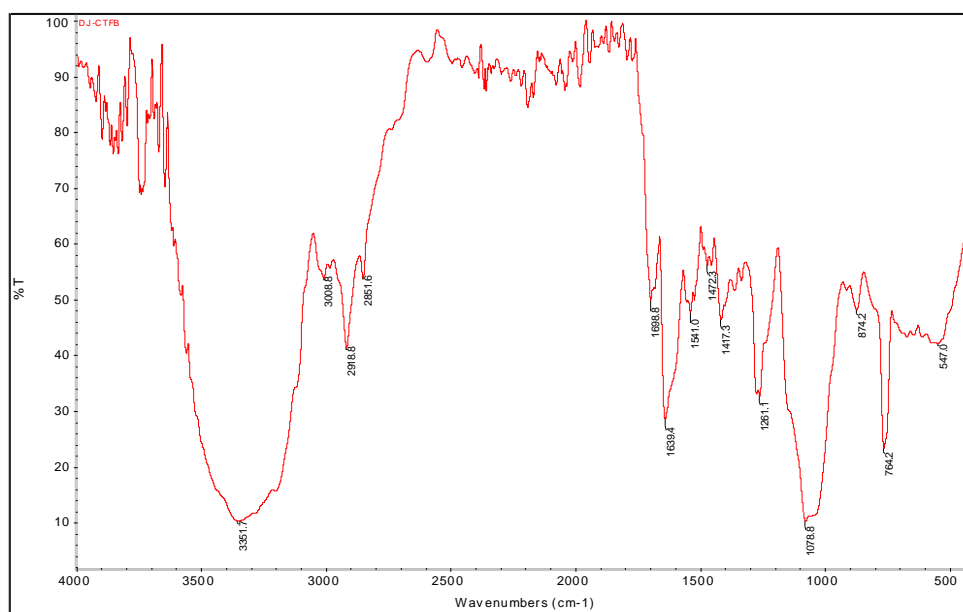
	ПТ <i>C. comatus</i>	ПТ <i>C. truncorum</i>	М <i>C. comatus</i>	М <i>C. truncorum</i>	Ф <i>C. comatus</i>	Ф <i>C. truncorum</i>
ОН - УФ	0,87	0,00	0,00	0,46	0,15	0,01
ОН - УФл	0,01	0,29	0,22	0,01	0,07	0,02
ОН - УП	0,70	0,99	0,00	0,00	-	-
DPPH - УФ	0,39	0,08	0,60	0,06	0,59	0,51
DPPH - УФл	0,43	0,16	0,54	0,58	0,06	0,06
DPPH - УП	0,95	0,85	0,03	0,26	-	-
ABTS - УФ	0,13	0,05	0,66	0,72	0,84	0,00
ABTS - УФл	0,66	0,01	0,42	0,14	0,14	0,04
ABTS - УП	0,03	0,88	0,98	0,23	-	-
FRAP - УФ	0,55	0,00	0,01	0,87	0,88	0,46
FRAP - УФл	0,26	0,30	0,17	0,29	0,18	0,08
FRAP - УП	0,00	0,03	0,99	0,01	-	-
НРМС - ПСХ	0,01	0,83	0,01	0,81	0,01	0,01

УФ - укупни феноли, УФл - укупни флавоноиди, УП - укупни протеини, ПСХ - полисахариди

5.19. Полисахариди

FTIR спектри ПСХ екстраката показују апсорпционе траке које су специфичне за полисахаридне структуре, протеине и полифенолна једињења у различитом степену.

FTIR спектар ПСХ екстракта изолованог из ПТ гљиве *S. truncorum* (Слика 5.36) садржи апсорпционе траке карактеристичне за полисахариде. Широка јака трака у региону од $3100\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ указује на присуство О-Н вибрација истезања у водоничним везама које су карактеристичне за интер- и интрамолекулске интеракције полисахаридних низова. Трака на око 2920 cm^{-1} релевантна је за вибрације истезања С-Н везе метиленских група. Апсорпција на 1153 cm^{-1} односи се на истезање вибрација С-О-С и С-С, које су значајне за глукане са α -гликозидним везама, док је трака на око 1079 cm^{-1} карактеристична за присуство β -глукана (Stone & Clarke, 1992). Слаба апсорпција на око 930 cm^{-1} везана је за вибрације угљенохидратног прстена.

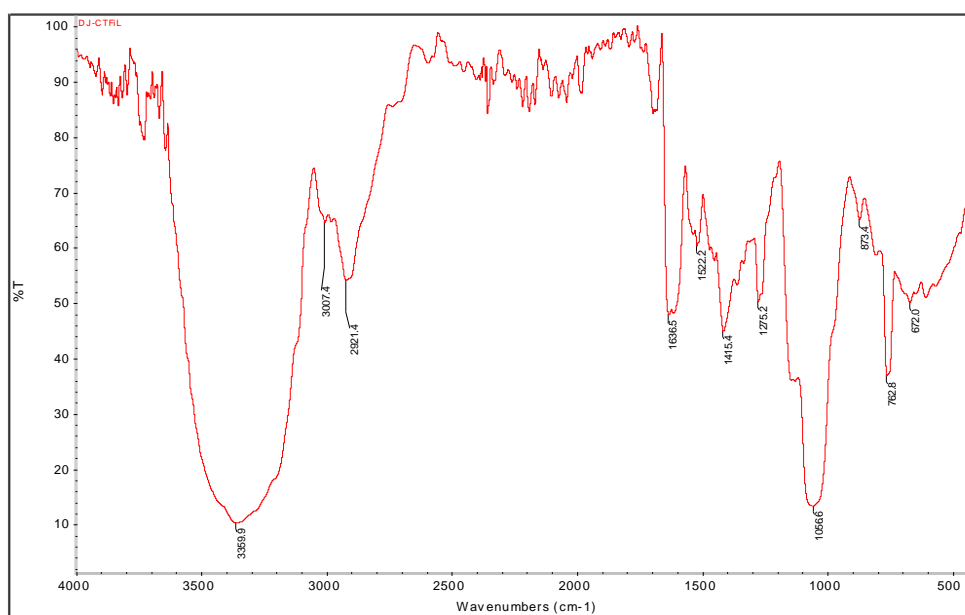


Слика 5.36 FTIR спектар ПСХ екстракта ПТ *S. truncorum*

Присуство протеина у полисахаридним екстрактима карактеришу фреквенце на око 1550 cm^{-1} и 1640 cm^{-1} . Трака на око 1640 cm^{-1} је карактеристична и за присуство адсорбоване воде у узорку. Типичне N-H вибрације на око 3400 cm^{-1} преклапају се са вибрацијама истезања -ОН група на $3000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ (Carey, 1992). Трака на 1640 cm^{-1} (област 1650 cm^{-1} - 1600 cm^{-1}) такође је индикативна и за присуство ароматичних С=С веза који су коњуговани са С=О (MacCarthy & Rice 1985). На присуство ароматичних једињења указују и

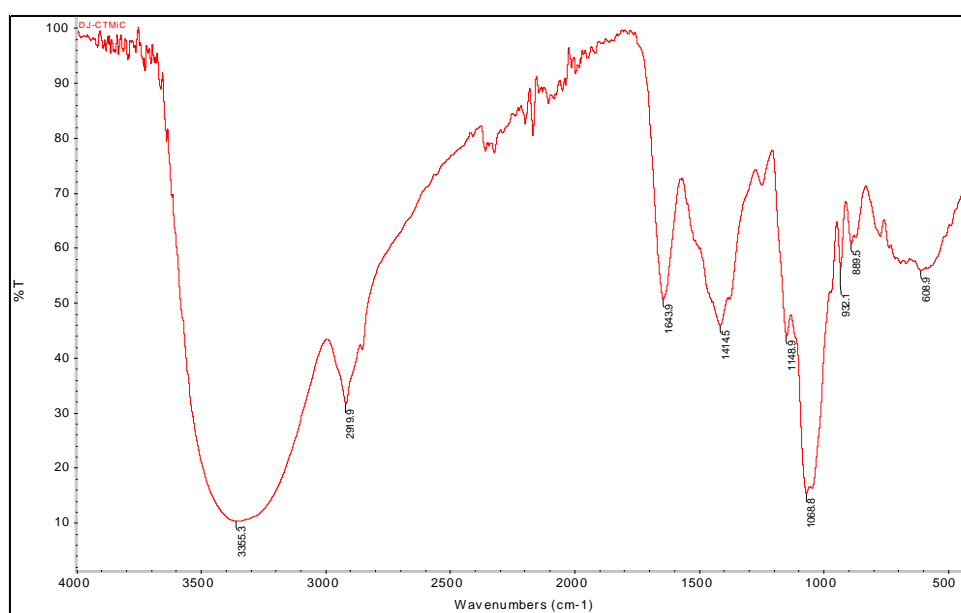
релевантне траке у подручју $3000\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$, као и оштар интензивни пик на 764 cm^{-1} , који прелази са апсорпцијом на 765 cm^{-1} индикативно за α -гликозидне везе.

FTIR спектар ПСХ екстракта изолованог из Ф потопљене културе *S. truncorum* (Слика 5.37) показује траку на 763 cm^{-1} , која је карактеристична за вибрације савијања C-H везе, а односи се на екваторијалну C1-H, односно на α -гликозидне везе. Интензивна трака на 1057 cm^{-1} одговара C-C и C-O вибрацијама истезања угљенохидратног прстена, апсорпција на око 1153 cm^{-1} односи се на C-O-C истезање гликозидне везе (Mathlouthi & Koenig 1986). Широка јака трака са максимумом апсорпције на 3356 cm^{-1} односи се на вибрације истезања OH групе полисахарида. Карактеристичне апсорпције на 1522 и 1637 cm^{-1} као и на $3100\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ указују на присуство протеина. Јака трака на 1637 cm^{-1} везана је такође за апсорпцију аромата (Harki *et al.* 1997), највероватније полифенола (C=C и C=O вибрације истезања). Трака на 1412 cm^{-1} одговара са апсорпцијом алифатичних група.



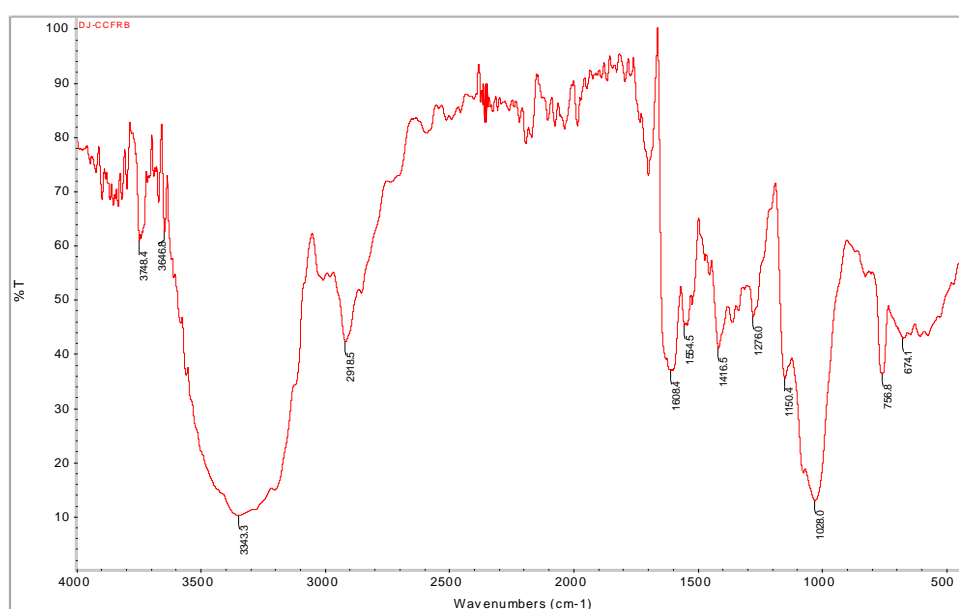
Слика 5.37 FTIR спектар ПСХ екстракта Ф *S. truncorum*

FTIR спектар ПСХ узорка *M. C. truncorum* (Слика 5.38) показује апсорпцију ниског интензитета на 890 cm^{-1} која је индикативна за β -гликозидне везе, док се трака на 932 cm^{-1} односи на вибрације пиранозног прстена. Трака на 1069 cm^{-1} је релевантна за С-О вибрације савијања, док се фреквенција на око 1150 cm^{-1} односи на С-О-С вибрације истезања гликозидне везе. Апсорпције на 1643 cm^{-1} и 1414 cm^{-1} указују на присуство протеина у полисахаридном екстракту. Трака на 2920 cm^{-1} односи се на вибрације истезања CH_2 групе, док је широка апсорпција на $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ индикативна за -OH валентне вибрације полисахарида, као и за -NH везе протеина.



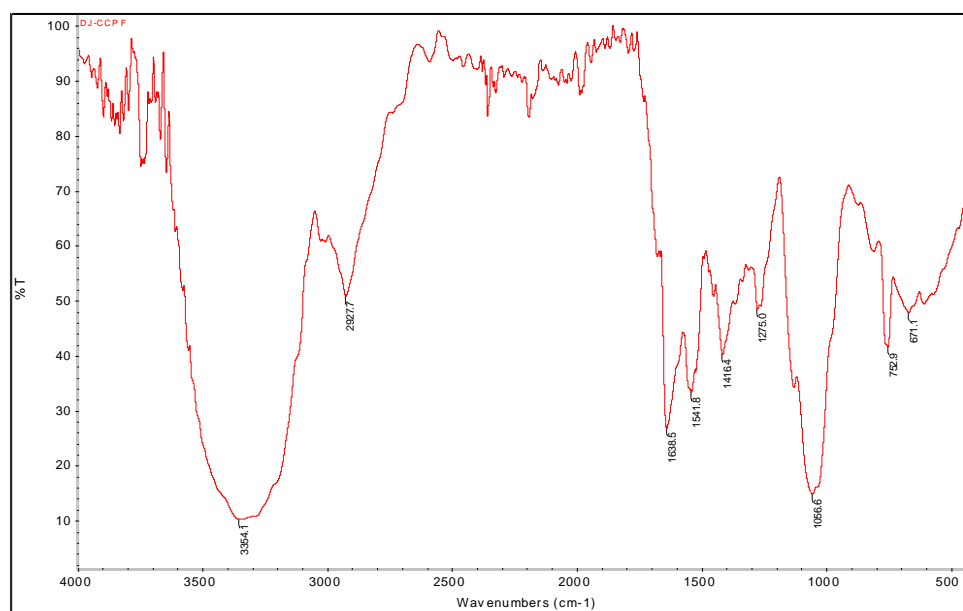
Слика 5.38 FTIR спектар ПСХ екстракта *M. C. truncorum*

FTIR спектар ПСХ екстракта изолованог из ПТ *S. comatus* (Слика 5.39) показује траке карактеристичне за гликозидне структуре као и апсорпције везане за протеине и пигменте. Интензиван оштар пик на 1028 cm^{-1} кореспондира са С-О вибрацијама истезања, док се трака на 1150 cm^{-1} односи на вибрације С-О-С веза. Фреквенција на 1416 cm^{-1} односи се на присуство алифатичних група. Јака трака на 1608 cm^{-1} ($1650\text{-}1600$) индикативна је за протеине, али и присуство ароматичних С=C, док се траке у области $1410\text{-}1310\text{ cm}^{-1}$ односе на валентне вибрације ОН групе фенолних једињења (Kozarski *et al.* 2012). Апсорпција на 1554 cm^{-1} такође је везана за присуство протеина. Оштра трака на 2918 cm^{-1} одговара вибрацијама CH_2 група, док су траке у области $3000\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ карактеристичне за вибрације ароматичних С=C-Н веза. Широка интензивна трака са максимумом на 3343 cm^{-1} индикативна за ОН и НН вибрације истезања.



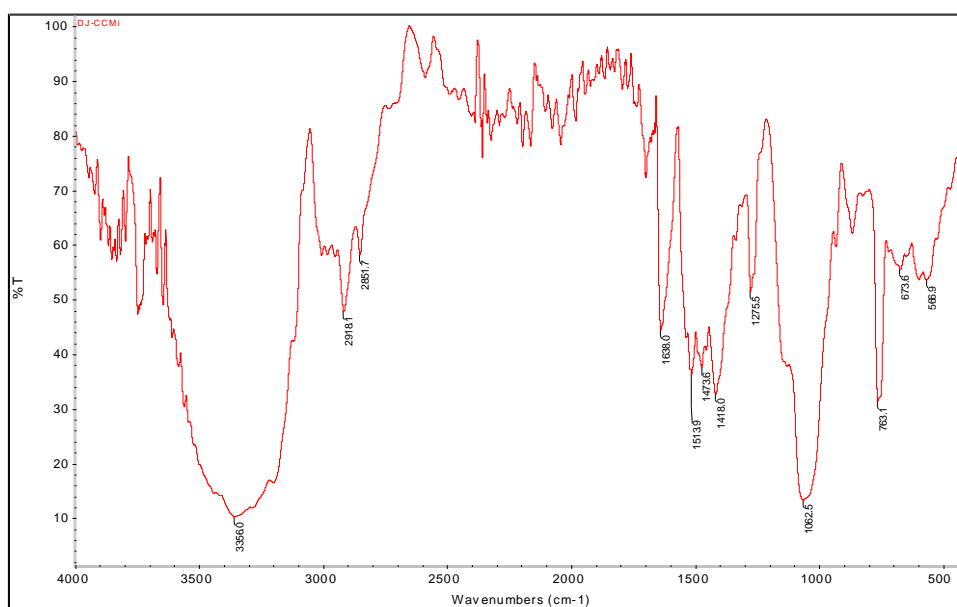
Слика 5.39 FTIR спектар ПСХ екстракта ПТ *S. comatus*

FTIR спектар ПСХ екстракта изолованог из Ф потопљене културе *S. comatus* (Слика 5.40) показује широку траку са максимумом на 3354 cm^{-1} , као и слабију траку на 2928 cm^{-1} које одговарају валенционим вибрацијама ОН и CH_2 група, редом. Апсорпција на око 1150 cm^{-1} везана је за вибрације истезања гликозидних веза, док се оштра интензивна трака на 1057 cm^{-1} односи на С-С и С-О вибрације угљенохидратног прстена. Поред наведених фреквенција уочавају се додатне интензивне апсорпције на 1638 cm^{-1} и 1542 cm^{-1} које се односе на протеине као и релативно слабе, али релевантне траке на $3000\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ и $1310\text{-}1410\text{ cm}^{-1}$ које су индикативне за присуство аромата и алифатичних низова, редом.



Слика 5.40 FTIR спектар ПСХ екстракта Ф *S. comatus*

FTIR спектар ПСХ екстракта изолованог из *M. C. comatus* (Слика 5.41) показује оштре, јаке траке које се односе на полисахаридне, али и протеинске структуре. Трака на око 890 cm^{-1} релевантна је за β -гликозидне везе, односно за аксијални C1-H мод, интензивна апсорпција на 1062 cm^{-1} и слабија на око 1160 cm^{-1} односе се на вибрације истезања прстена и гликозидне везе, респективно (Kačuráková *et al.* 2000) Широка јака трака на $3100\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ везана је за вибрације ОН група полисахарида и NH група протеина. Поред ових апсорпција уочавају се и додатне фреквенције, као што су интензивне траке на 1638 cm^{-1} и 1513 cm^{-1} које су везане за вибрације истезања C=O група (амидна трака I) и N-H група (амидна трака II), редом, у протеинима. Поред ових трака налазе се и фреквенције које се односе на полифенолна једињења, у региону $1310\text{--}1410\text{ cm}^{-1}$ као и траке на $3000\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ које су карактеристичне за ароматичне структуре (Wershaw & MacCarthy 1985).



Слика 5.41 FTIR спектар ПСХ екстракта *M. C. comatus*

Анализом хидролизованог ПСХ екстракта планарном хроматографијом, у односу на стандарде утврђено је да узорци *C. truncorum* ПТ, *C. truncorum* Ф и *C. comatus* ПТ садрже велику количину D-глюкозе. У истим узорцима нешто мање је била заступљена D-галактоза, затим маноза, фукоза и/или ксилоза. Поред наведених угљених хидрата, узорак *C. truncorum* ПТ садржи и рамнозу. Узорци *C. truncorum* М, *C. comatus* Ф и *C. comatus* М су највише садржали галактозу, затим нешто мање глюкозу и манозу и у траговима фукозу/ксилозу. Компоненте веома слабе покретљивости означене су као парцијално хидролизованог полисахаридних молекули. Мала количина олигосахаридних фрагмената била је видљива у зони покретљивости која одговара овим компонентама. Присуство

шећерних киселина са карбонилном и карбоксилном функционалном групом (тзв. уронске киселина) нису утврђене у анализираним узорцима.

Добијени резултати за ПСХ екстракте *C. truncorum* ПТ, *C. truncorum* Ф и *C. comatus* ПТ у сагласности су са истим испитаним екстрактима спектрофотометријском методом одређивања укупног садржаја у ПСХ екстрактима (глукоза је била најзаступљенија, затим фруктоза и ксилоза и знатно најмање сахароза).

5.20. Садржај макро елемената

Елементарном органском анализом испитан је садржај макроелемената у свим анализираним ПСХ екстрактима (Табела 5.13). У свим екстрактима установљен је највећи садржај С, затим Н, нешто мање N и најмање S. Добијене вредности за N указују на присуство протеина или присуство N непротеинске природе. Непротеински N се првенствено односи на хитин (из ћелијског зида), али и на слободне аминокиселине и нуклеинске киселине (Kozarski, 2012).

Табела 5.13 Елементарна анализа одабраних екстраката

Узорак	N	C	H	S
	%			
<i>C. truncorum</i> ПТ	4,15	34,71	5,58	0,55
<i>C. truncorum</i> Ф	1,73	37,27	5,76	1,20
<i>C. truncorum</i> М	4,35	57,23	8,20	0,54
<i>C. comatus</i> ПТ	4,03	38,82	5,96	1,16
<i>C. comatus</i> Ф	2,22	39,03	6,24	0,72
<i>C. comatus</i> М	1,43	31,65	5,53	1,00

5.21. Квалитативно и квантитативно одређивање биогених елемената

AAS спектрофотометријском техником у анализираним гљивама детектовани су макроелементи (Табела 5.14) и (Табела 5.15) микроелементи. Елементи су детектовани засебно у шеширу (Ш), дршци (Д) и ПТ обе испитиване гљиве. У погледу макроелемената код обе гљиве највише је детектовано К, затим Са и најмање Mg, што је у складу са ранијим студијама (Karaman & Matavulj 2005; Rašeta *et al.* 2016). *C. truncorum* је садржао нешто већи садржај К у поређењу са *C. comatus*. Код *C. truncorum* Д је забележила највећи садржај сва три испитана макроелемента (К, Са и Mg). Код *C. comatus* ПТ и Д су имале готово уједначен садржај К, док је Ш имао већи садржај Mg и Са.

Табела 5.14 Укупан садржај макроелемената у анализираним гљивама

Врста	K	Mg mg/g	Ca
<i>C. comatus</i> ПТ	19,99±0,39	0,70±0,02	2,97±0,05
<i>C. comatus</i> Ш	14,66±0,33	0,91±0,01	10,36±0,07
<i>C. comatus</i> Д	19,23±0,28	0,64±0,02	3,82±0,06
<i>C. truncorum</i> ПТ	23,36±0,36	0,79±0,03	4,22±0,04
<i>C. truncorum</i> Ш	21,46±0,21	0,83±0,02	3,84±0,11
<i>C. truncorum</i> Д	24,52±0,17	1,32±0,01	5,18±0,13

Од свих испитиваних микроелемената обе гљиве су се издвојиле по значајној концентрацији Fe. Највише га има у ПТ и Д *C. truncorum*. Овако висок садржај Fe детектован је код гљива *M. procera* (596±2,00 mg/kg) и *G. clavatus* (812±2,00) (Sarikurkcı *et al.* 2015), док је код *G. applanatum* и *G. lucidum* био знатно нижи (0,37±0,08 mg/kg и 0,62±0,12 mg/kg, редом) (Rašeta *et al.* 2016). Fe је неопходан нутријент у исхрани, а истовремено се не сме уносити у превеликим дозама, баш као и остали испитани микроелементи, односно тешки метали који се могу налазити у гљивама. Регулацивом Европске комисије прописане су дозвољена границе за присуство тешких метала у исхрани. Оне су израчунате на основу телесне масе, човек просечне тежине 60 kg има потребу за 48,00 mg Fe по дану (Kalač & Svaboda, 2000; Sarikurkcı *et al.* 2015). У зависности од количине конзумирања гљива могу се оквирно израчунати оптималне количине порција гљива. У погледу Zn и Pb обе испитиване врсте су акумулирале сличан садржај у свим анализираним деловима талуса (ПТ, Д и Ш). Cu је нешто мање заступљен, док је најмањи садржај Mn и Cd присутан код обе анализираних врсте.

Табела 5.15 Укупан садржај микроелемената у анализираним гљивама

Врста	Mn	Fe	Zn	Cu	Cd	Pb
	mg/kg					
<i>C. comatus</i> ПТ	6,72±0,01	168,05±0,73	50,22±0,12	34,02±0,18	1,95±0,01	56,95±0,32
<i>C. comatus</i> Ш	11,22±0,02	203,12±0,68	60,15±0,17	49,19±0,05	2,31±0,01	47,01±0,26
<i>C. comatus</i> Д	3,39±0,02	128,43±0,72	37,17±0,05	26,09±0,07	1,49±0,02	47,91±0,11
<i>C. truncorum</i> ПТ	14,13±0,03	513,73±0,78	67,22±0,37	16,51±0,25	0,79±0,00	60,75±0,26
<i>C. truncorum</i> Ш	8,98±0,02	291,50±0,68	69,67±0,22	33,58±0,32	2,68±0,01	54,09±0,31
<i>C. truncorum</i> Д	10,39±0,01	402,73±0,55	54,25±0,19	25,27±0,22	1,83±0,01	43,50±0,27

5.22. Масне киселине

Узорци гљива су анализирани на гасном хроматограму (GC) у циљу идентификације и квантификације масних киселина. Од укупно 36 метил-естара масних киселина у анализираним врстама детектовано је 20 код врсте *C. comatus* и 24 код врсте *C. truncorum* (Табела 5.16). Код обе испитиване врсте најзаступљенија је линолна киселина (C18:2n6c) са 74,19% односно 70,09% код *C. comatus* и *C. truncorum*. Остале масне киселине биле су заступљене знатно мање. Палмитинска (C16:00) са 13,32% код *C. comatus* и 12,39% код *C. truncorum*, а олеинска (C18:1n9c) 4,32% код *C. comatus* и 9,08% код *C. truncorum*. Узевши у обзир да су остале детектоване масне киселине процентуално имале веома малу заступљеност, можемо рећи да су најзаступљеније масне киселине код анализираних гљиве биле линолна, палмитинска и олеинска што је у сагласности са раније спроведеним студијама код различитих врста гљива (Chang & Miles, 2004; Kalač, 2013; Novaković, 2015).

Врста *C. comatus* из Србије, анализирана у нашој студији, показала је готово идентичан садржај линолне киселине (74,19%) у поређењу са сојем који је растао у Португалу (74,86%) (Vaz et al. 2011), док је сој *C. comatus* пореклом из Турске показао нешто нижи садржај (62,36%) (Ergonul et al. 2012). Такође, код соја *C. comatus* пореклом из Турске анализиран је садржај масних киселина, посебно у дршци, посебно у плодном телу и показано је да се већи удео линолеинске киселине налази у дршци (59,50% дршка и 25,80% плодно тело) (Yilmaz et al. 2006).

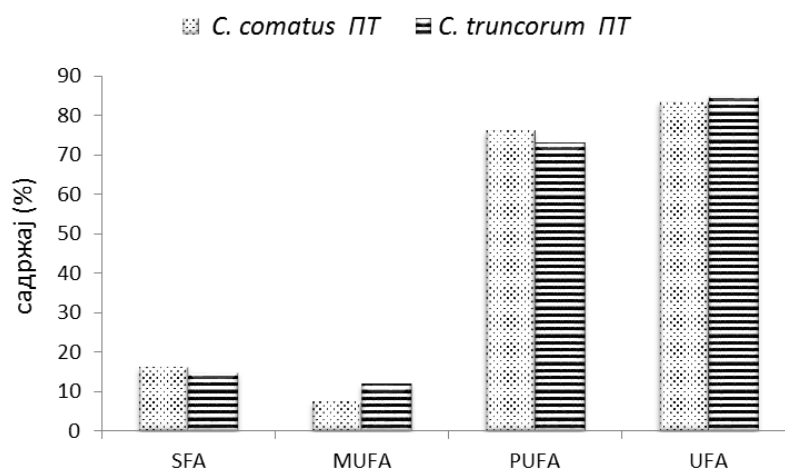
Садржај палмитинске и олеинске киселине био је приближан код соја *C. comatus* из Србије, Португала и Турске (Yilmaz et al. 2006; Vaz et al. 2011; Ergonul et al. 2012), док за врсту *C. truncorum* према нашим сазнањима нема података у литератури.

Табела 5.16 Метил-естри масних киселина анализираних гљива

	<i>C. comatus</i>	<i>C. truncorum</i>
	%	%
C6:0	0,21	0,16
8:00	0,09	0,08
10:00	0,00	0,00
11:00	0,00	0,00
12:00	0,00	0,05
13:00	0,00	0,00
14:00	0,40	0,17
14:01	0,00	0,00
15:00	0,31	0,17
15:01	0,00	0,00
16:00	13,32	12,39
16:01	0,83	2,04
17:00	0,11	0,09
17:01	0,11	0,46
18:00	0,78	0,92
18:1n9t	0,00	0,00
18:1n9c	4,32	9,08
18:2n6t	0,00	0,00
18:2n6c	74,19	70,09
20:00	0,00	0,05
18:3n6	0,00	0,00
20:01	2,11	0,24
18:3n3	0,00	0,15
21:00	0,00	0,00
20:02	0,47	0,20
22:00	0,25	0,26
20:3n6	0,00	0,00
22:1n9	0,08	0,15

Испитан је и процентуални садржај укупних незасићених (unsaturated fatty acid - UFA), мононезасићених (енг. mono unsaturated fatty acids - MUFA), полинезасићених (енг. polyunsaturated fatty acids - PUFA) и засићених (енг. saturated fatty acids - SFA) масних киселина (Слика 5.42). Процентуално најзатупљеније су незасићене (83,71% и 85,08% *C. comatus* и *C. truncorum*, редом) и полинезасићене масне киселине (76,25% и 73,11% *C. comatus* и *C. truncorum*, редом) код обе врсте, што је веома повољно са нутритивног аспекта (Chang & Miles 2004; Novaković, 2015). Храна богата незасићеним масним киселинама као што су линолна и олеинска препоручују се у исхрани особа које имају повишен холестерол, због чега се гљиве између осталог и сматрају здравом храном (Vaz *et al.* 2011).

Садржај засићених (16,29% и 14,92% *C. comatus* и *C. truncorum*, редом) и мононезасићених масних киселина (7,46% и 11,97% *C. comatus* и *C. truncorum*, редом) био је знатно мањи. Добијени резултати у сагласности су са раније спроведеним студијама (Vaz *et al.* 2011; Ergonul *et al.* 2012). Такође, поређењем *C. truncorum* са *C. micaceus* пореклом из Бангладеша добијени су слични резултати, најзаступљеније су биле незасићене масне киселине (70%) (Shoeba *et al.* 2017).



Слика 5.42 Садржај масних киселина

6. ЗАКЉУЧАК

У оквиру ове докторске дисертације испитана је биолошка активност екстраката плодних тела и потопљених култура (мицелије и филтрата) аутохтоних врста гљива *Coprinus comatus* и *Coprinellus truncorum*, са подручја Фрушке горе, Новог Сада и Сремских Карловаца. Биолошка активност аутохтоних гљива испитана је на нивоу екстраката плодних тела (из природе) и екстраката мицелија и филтрата потопљених култура (култивисаних у лабораторијским условима).

Испитивањем изоловане мицелије гљива *C. comatus* и *C. truncorum* у потопљеним културама, методом NMR, добијени су подаци о енергетском статусу и метаболизму фосфата код мицелије обе врсте. У узорцима мицелија помоћу ^{31}P NMR спектроскопије детектована су следећа једињења карактеристична за енергентски статус ћелије: аденозин три фосфат (ATP), полифосфати (PolyP), никотинамид аденин динуклеотид (NADP), уридин дифосфат глукоза (UDPG), фосфатни шећери (SP) и неоргански фосфат (Pi). Код обе анализираних врсте показано је да су најзаступљенија фосфатна једињења PolyP и Pi са значајним присуством SP код мицелије *C. comatus* култивисане у потопљеном медијуму. Показано је да ванадијум (V) у форми натријум-ортованадата (NaVO_3) има знатан утицај на метаболизам фосфата код обе врсте јер доводи до промена у садржају фосфатних шећера.

Применом ^{51}V NMR спектроскопије показано је да обе гљиве могу усвојити ванадат (V^{5+}) у виду мономера и редуковати га до ванидила (V^{4+}), односно нетоксичног облика који остаје присутан у цитоплазми. Подаци о утицају ванадијума на метаболизам фосфата код гљива имају веома битан допринос у разумевању физиологије мицелија анализираних гљива. Према нашем сазнању истраживања оваквог типа за врсте *C. comatus* и *C. truncorum* до сада нису рађена, те представљају нов научни допринос.

Применом скенинг електронске микроскопије (SEM) нису примећене промене морфологије након третирања мицелије са ванадијумом код врсте *C. comatus*.

Испитивањем антиоксидативног потенцијала (FRAP тест и HPMC метода) добијени су значајни резултати у погледу антиоксидативне способности испитаних екстраката гљива. Такође, антирадикалски спектрофотометријски тестови (ABTS $^{\bullet}$, DPPH $^{\bullet}$ и OH $^{\bullet}$) указали су на способност екстраката гљива да неутралишу слободне радикале. У погледу антиоксидативне активности екстракти плодног тела су показали бољу активност, док су у погледу неутрализације слободних радикала бољу активност показали екстракти потопљених култура.

Екстракти потопљених култура мицелије и филтрата истакли су се и у погледу антибактеријске активности у односу на екстракте плодног тела. Хлороформски екстракт филтрата потопљене културе *C. comatus* испољио је активност према шест од укупно десет ипитиваних бактеријских сојева. Такође, етанолни екстракт филтрата потопљене културе *C. comatus* показао се као најпотентнији у инхибицији ензима ацетилхолинестеразе (AChE) и постигао је активност сличну конвенционалном леку донепезилу. Према нашем сазнању, до сада су били испитивани само екстракти плодних тела гљива у погледу анти-ацетилхолин естеразне активности и ово је први податак о екстрактима потопљених култура гљива, са значајном постигнутом активношћу.

Утицај анализираних екстраката на вијабилност ћелија процењен је на туморској ћелијској линији HepG2 (хепатома ћелије) и бета ћелијама панкреаса пацова Rin-5F. Водени екстракти мицелије потопљене културе обе анализирание гљиве и полисахаридни екстракт плодног тела *C. comatus* утицали су на смањење вијабилности ћелија. Након третмана са воденим екстрактом мицелије *C. comatus* вијабилност је била смањена на 24% након 72 h у случају HepG2 и на 17% код Rin-5F ћелија. Водени екстракт мицелије *C. truncorum* смањио је вијабилност на 13% након 72 h (HepG2) и на 22% (Rin-5F). Полисахаридни екстракт плодног тела *C. comatus* смањио је вијабилност на 19% (HepG2) и на свега 3% код (Rin-5F). Насупрот томе, полисахаридни екстракт филтрата *C. truncorum* утицао је на побољшање вијабилности код обе анализирание ћелијске линије. Наиме, након 24 h проценат вијабилности био је 46%, а након 72 h примећен је пораст вијабилности на 87% код HepG2 ћелија (при концентрацији 450 µg/mL). Исти екстракт утицао је на пораст вијабилности код Rin-5F ћелија на 145% након 72 h (при концентрацији 900 µg/mL) због чега се овај екстракт даље препоручује као кандидат за испитивање потенцијалне протективне активности на бета ћелијама које су оштећене дијабетогеним агенсом.

Спектрофотометријским методама одређен је укупан садржај фенола и флавоноида у свим испитиваним екстрактима (EtOH, MeOH и H₂O), док је укупан садржај протеина одређен у H₂O екстрактима. За аутохтону врсту *C. truncorum* нема доступних података у литератури, па је одређивање укупног садржаја ове врсте такође нов научни допринос.

Добијене су јаке корелације за укупан садржај фенола и активности добијених у OH, ABTS и FRAP тестовима, за екстракте плодног тела и филтрата врсте *C. comatus* (0,87 и 0,84) и екстракта мицелије *C. truncorum* (0,87). Такође, добијене су јаке корелације укупног садржаја протеина и активности добијених у OH, DPPH, ABTS и FRAP тестовима, за екстракт потопљених култура мицелије *C. comatus* (0,98) и за екстракте плодних тела обе врсте (0,95 *C. comatus* и 0,99 *C. truncorum*).

Добијене корелације указују да фенолна једињења и укупан садржај протеина гљива могу знатно допринети антиоксидативној и антирадикалској активности анализираних екстракта. Управо за екстракте плодног тела и филтрата врсте *C. comatus* и екстракт мицелије *C. truncorum* који су показали високе корелације са антиоксидативним тсетовима утврђен је и највећи садржај фенолних једињења LC/MS хемијском карактеризацијом фенолног профила.

LC/MS методом детекције уочена је разлика између фенолних једињења присутних у плодном телу, мицелији и филтрату потопљене културе. Код екстраката потопљених култура детектован је већи број фенолних једињења и у већим концентрацијама (до 4615,88 $\mu\text{g/g}$ детектованих фенолних киселина). Екстракт филтрата *C. comatus* истакао се као најбогатији у садржају фенолних киселина у свим анализираним екстрактима CHCl_3 , MeOH , EtOH и H_2O (4615,88 $\mu\text{g/g}$; 987,73 $\mu\text{g/g}$; 1274,08 $\mu\text{g/g}$ и 319,12 $\mu\text{g/g}$ редом), осим ПСХ екстраката, где је екстракт плодног тела забележио већи садржај (503,02 $\mu\text{g/g}$). У погледу врсте *C. truncorum* CHCl_3 , MeOH и ПСХ екстракти мицелије потопљене културе имали су већи садржај фенолних једињења у односу на екстракте плодног тела и филтрата исте врсте.

Детектовани флавонол кверцетин и изофлавоноид даидзеин могу бити одговорни за испољену АСhЕ инхибиторну активност, док најзаступљенија детектована једињења хининска киселина и *p*-хидроксибензојева киселина највероватније имају утицаја у испољеној антиоксидативној и антирадикалској активности.

Употребом Фуријеве инфрацрвене спектроскопске методе (енг. Fourier transform infrared spectroscopy FTIR) детектовани су појединачни шећери у ПСХ екстрактима пореклом од плодног тела, мицелије и филтрата обе врсте. Одређене траке добијене FTIR спектроскопијом указују на разлике у присуству шећера и протеина код различитих екстраката.

Планарном хроматографијом показано је да екстракти плодног тела и филтрата *C. truncorum* и екстракт плодног тела *C. comatus* садрже велику количину D-глукозе, док екстракт мицелије *C. truncorum* и екстракти филтрата и мицелије *C. comatus* садрже највише галактозе.

Укупан садржај микро и макроелемената (K, Mg, Ca, Mn, Fe, Zn, Cu, Cd и Pb) одређен је у плодном телу, али и засебно само у шеширу и само у дршци код обе гљиве. Од макроелемената у свим испитаним узорцима уочен је највећи садржај K (23,36 mg/g), а од микроелемената највећи садржај Fe (513,73 mg/kg). Детектовани K и Fe у прописаним дозама могу имати позитиван ефекат са нутритивног аспекта, будући да су обе испитиване врсте јестиве.

GC детекција масних киселина показала је највећи проценат незасићене линолне масне киселине код обе врсте, док су друге масне киселине биле заступљене у мањој мери. Сходно томе, детектован је већи процентуални садржај укупних незасићених масних киселина обе врсте, што је пожељно са нутритивног аспекта и истиче гљиве као здраву храну.

Ово је једна од првих студија код нас која се бави компаративним прегледом биолошке активности и хемијског састава на нивоу екстракта плодног тела (генеративне фазе животног циклуса) и мицелије и филтрата (вегетативне фазе животног циклуса) гљива, конкретно врста *C. comatus* и *C. truncorum*.

Обе анализиране врсте гљива *C. comatus* и *C. truncorum* у потопљеној култури показале су способност редукције ванадијума у нетоксичан облик за мицелију, што даље упућује на потенцијалну употребу мицелије обogaћене ванадијумом у терапеутске сврхе код дијабетеса. Осим тога, екстракт филтрата потопљене културе *C. comatus* показао је веома добру активност у тесту инхибиције ензима ацетилхолинестеразе. Такође, екстракти обе гљиве, а нарочито екстракти потопљених култура показали су знатан садржај фенола који су највероватније одговорни за испољену антиоксидативну и антирадикалску активност. Послисахаридни екстракт филтрата *C. truncorum* издвојио се према утицају на побољшање вијабилности ћелија Rin-5F, због чега се препоручује његово даље испитивање услед потенцијалне протективне активности на бета ћелијама оштећеним дијабетогеним агенсом. Са нутритивног аспекта висок садржај незасићених масних киселина указује на обе анализиране врсте као здраву храну, па се на основу свих резултата може констатовати да обе испитиване гљиве имају знатан функционалан и терапеутски потенцијал у људској исхрани.

Добијени резултати у погледу испитивања потопљене културе гљива стављају акценат на њихову перспективу у даљој употреби у биотехнологији, као потентних извора биоактивних једињења са фармацеутским потенцијалом.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Adrio JL & Demain AL (2003) Fungal biotechnology (review). *Int Microbiol* 6: 191–199.
2. Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410.
3. Alva G, Cummings JL (2008) Relative tolerability of Alzheimer's disease treatments. *Psychiatry (Edgmont)* 5: 27–36.
4. Alves MJ, Ferreira ICFR, Dias J, Teixeira V, Martins A, Pintado M (2013). A Review on antifungal activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Curr. Top. Med. Chem.* 13: 2648–2659.
5. Ameri A, Vaidya JG, Deokule SS (2011) In vitro evaluation of anti-staphylococcal activity of *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma praelongum* and *Ganoderma resinaceum* from Pune, India. *Afr J Microbiol Res* 5: 328–333.
6. Ammirati JF, Traquair JA, Horgen PA (1985) Poisonous Mushrooms of the Northern United States and Canada. — University of Minnesota Press, USA
7. Arnao MB, Casas JL, del Rio JA, Acosta M, Garcia-Canovas F (1990) An enzymatic colorimetric method for measuring naringin using 2,29-azino bis (3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Anal. *Biochem* 185: 335–338.
8. Asatiani M, Elisashvili V, Wasser S, Reznick A, Eviatar N (2007) Free-radical scavenging activity of submerged mycelium extracts from higher basidiomycetes mushrooms. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 3090–3092.
9. Asatiani MD, Elisashvili V, Songulashvili G, Reznick AZ, Wasser SP (2010) Higher basidiomycetes mushrooms as a source of antioxidants *Progres in Mycology*, 1st edn. Rajasthan Law Book Binding Works, Jodhpur, India
10. Ata A (2009) Novel Bioactive natural products from marine and terrestrial sources. *Inn Chem Bio* 8: 51–60.
11. Baekelandt M (2002) Irofulven MGI Pharma. *Curr Opin Investig Dr* 3: 1517–1526.
12. Balkis A, Tran K, Lee YZ, Ng K (2015) Screening flavonoids for inhibition of acetylcholinesterase identified baicalein as the most potent inhibitor *J. Agric. Sci* 7:26–35.
13. Barbosa Filho JM, Paula Medeiros KC, Diniz MFFM, Batista LM, Athayde-Filho PF, Silva MS, da-Cunha EVL, Silva Almeida JRG, Quintans-Júnior LJ (2006) Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Rev Bras Farmacogn* 16: 258–285.
14. Barros L, Cruz T, Baptista P, Estevinho LM, Ferreira ICFR (2008) Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals *Food Chem Toxicol.* 46: 2742–2747.
15. Barros L, Ferreira MJ, Queiros B, Ferreira ICFR, Baptista P (2007) Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities *Food chem* 103: 413–419.
16. Barros L, Pereira C, Ferreira IFR (2013) Optimized analysis of organic acids in edible mushrooms from Portugal by ultra fast liquid chromatography and photodiode array detection, *Food Anal. Methods* 6: 309–316.
17. Beattie KD, Ulrich R, Grice ID, Uddin SJ, Blake TB, Wood KA, Steele J, Lu F, May TW, Tiralongo E (2011) Ethanolic and aqueous extracts derived from Australian fungi inhibit cancer cell growth *in vitro* *Mycologia*, 103: 458–465.
18. Benzie IFF & Strain JJ (1999) Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid and concentration. *Methods Enzym.* 299: 15–17.
19. Birt DF, Hendrich S, Wang W (2001) Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther* 90: 157–177.
20. Blackwell M (2011) The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot* 98: 426–438.
21. Bogavac M, Karaman M, Janjušević L, Sudji J, Radovanović B, Novaković Z, Simeunović J, Božin B (2015) Alternative treatment of vaginal infections - in vitro antimicrobial and toxic effects of *Coriandrum sativum* L. and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *J Appl Microbiol.* 119: 697–710.
22. Bogavac M, Karaman M, Sudji J, Radovanović B, Janjušević Lj, Četković N, Tešanović K (2017) Antimicrobial Potential of *Rosmarinus officinalis* Commercial Essential Oil in the Treatment of Vaginal Infections in Pregnant Women, *J. Nat. Prod. Comun* 12: 127–130.
23. Borišev M, Pajević S, Nikolić N, Orlović S, Župunski M, Pilipović A, Kebert M (2016) Magnesium and iron deficiencies alter Cd accumulation in *Salix viminalis* L. *Int J Phytoremediation* 18: 164–170.
24. Borovička J, Řanda Z, Jelínek E (2006) Antimony content of macrofungi from clean and polluted areas. *Chemosphere* 64: 1837–1844.

25. Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of quantities microgram of protein utilizing the principle of dye-binding protein. *Anal Biochem* 72: 248–254.
26. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 74: 2157–2184.
27. Čapo ID (2013) Uticaj gljive *Coprinus comatus* na regeneratorna svojstva Langerhansovih ostrvaca u aloksanskom dijabetesu kod pacova, Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu.
28. Carey PR (1992) *Biochemical Application of raman and resonance raman spectroscopies*. New York, Academic Press.
29. Carlile MJ, Watkinson SC, Godday GW (2001) *The fungi English, Book, Illustrated edition*: San Diego, USA
30. Carvajal AESS, Koehnlein EA, Soares AA, Eler GJ, Nakashima ATA, Bracht A, Peralta RM (2012) Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (*A. blazei*) and their antioxidant properties. *LWT-Food Sci Technol* 46: 493–499.
31. Castro CD, Meehan J, Koretsky AP, Domach MM (1995) In situ ³¹P nuclear magnetic resonance for observation of polyphosphate and catabolite responses of chemostat-cultivated *Saccharomyces cerevisiae* after alkalization *Appl. Environ. Microbiol* 61: 4448–4453.
32. Chan GCF, Chan WKC, Sze DMY (2009) The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol Oncol* 2: 1–25.
33. Chang CC, Yang HM, Wen HM, Chern JC (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal* 10: 178–182.
34. Chang HC (1999) Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Plant Sci* 18: 609–636.
35. Chang ST & Miles PG (2004) *Mushrooms-Cultivation, Nutritional value, Medicinal Effect and Environmental impact*. CRC Press 2: 1–451.
36. Chen KY (1999) Study of polyphosphate metabolism in intact cells by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy *Prog Mol Subcell Biol* 23: 253–273.
37. Chen MM (2000) *Cultivation techniques for Dictyophora, Polyporus umbellata, and Coprinus comatus*, Science and cultivation of edible fungi, Van Griensven (ed.) Balkema, Rotterdam, Netherlands
38. Chen ZZ & Yang J (2000) *The new century mushroom cultivation using technology*, People's Liberation Army Publishing House; Beijing, China.
39. Chung MJ, Chung CK, Jeong Y, Ham SS (2010) Anti-cancer activity of subfractions containing pure compounds of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extract in human cancer cells and in Balbc/c mice bearing Sarcoma-180 cells. *Nutr Res Pract* 4: 177–182.
40. CLSI (2003). *Methods for Dilution Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically*, 6th Ed, Approved Standard M7-A6. Wayne, Pennsylvania, USA
41. CLSI (2007). *Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Seventh Informational Supplement CLSI document M100-S17, Wayne, Pennsylvania, USA
42. Cohen N, Cohen J, Asatiani MD, Varshney VK, Yu HT, Yang YC, Li YH, Mau JL, Wasser SP (2014) Chemical composition and nutritional and medicinal value of fruit bodies and submerged cultured mycelia of culinary–medicinal higher basidiomycetes mushrooms. *Int J Med Mushrooms* 16: 273–291.
43. Colak A, Faiz O, Sesli E (2009) Nutritional composition of some wild edible mushrooms. *Turkish J Biochem* 34: 25–31.
44. Cooper DNW, Boulianne RP, Charlton S, Farrell EM, Sucher A, Lu BC, (1997) Fungal galectins, sequence and specificity of two isolectins from *Coprinus cinereus* *J. Biol. Chem* 272: 1514–1521.
45. Corner EJH (1932) A Fomes with two systems of hyphae. *Trans Br Mycol Soc* 17: 51–81.
46. Crans D, Bunch RL, Theisen LA (1989) Interaction of trace levels of vanadium (IV) and vanadium (V) in biological systems. *J Am Chem Soc* 111: 7597–7607.
47. Crans DC (2005) Fifteen years of dancing with vanadium, *Pure Appl Chem* 77: 1497–1527.
48. Crans DC (2015) Antidiabetic, chemical, and physical properties of organic vanadates as presumed transition-state inhibitors for phosphatases *J. Org. Chem* 80: 11899–11915.
49. Cui M, Zhang H, An L (2002) Tumor growth inhibition by polysaccharide from *Coprinus comatus* *WCJD* 10: 287–290.
50. Cui T & Chisti Y (2003) Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses and production. *Biotechnol Adv* 21: 109–122.

51. Cullings KW (1992) Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Mol Ecol* 1:233-240.
52. Cunningham GH (1954) Taxonomic problems of some Hymenomycetes. *Trans & Proc Roy Soc New Zealand* 82: 893-896.
53. De Silva DD, Rapior S, Hyde KD, Bahkali AH (2012) Medicinal mushrooms in prevention and control of diabetes mellitus. *Fungal Divers.* 56: 1–29.
54. Deacon J (2006) *Fungal biology*. Blackwell Publishing, 4th edition.
55. Dimitrić Marković JM, Pejin B, Milenković D, Amić D, Begović N, Mojović M, Marković SM (2017) Antiradical activity of delphinidin, pelargonidin and malvin towards hydroxyl and nitric oxide radicals: The energy requirements calculations as a prediction of the possible antiradical mechanisms. *Food Chem* 218: 440–446.
56. Ding Z, Wang W, Wang F, Wang Q, Zhang K (2012) Polysaccharides production by submerged fermentation of *Coprinus comatus* and their inhibitory effects on non-enzymatic glycosylation. *J Med Plants Res* 6:1375–1381.
57. Ding ZY, Lu YJ, Lu ZX, Lv FX, Wang YH, Bei XM, Wang F, Zhang KC (2010) Hypoglycaemic effect of comatin, an antidiabetic substance separated from *Coprinus comatus* broth, on alloxan- induced-diabetic rats. *Food Chem* 121: 39–43.
58. Dotan N, Wasser SP, Mahajna J (2011) The culinary-medicinal mushroom *Coprinus comatus* as a natural antiandrogenic modulator. *Integr Cancer Ther* 10: 148–159
59. Doyle JJ & Doyle JL(1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
60. Doyle JJ& Dickson EE (1987) Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon* 36: 715-722.
61. Đukić M, Ninković M, Jovanović M (2008) Oxidative Stress - Clinical Diagnostic Significance *J Med Biochem* 27: 409–425.
62. Ece A & Pejin B (2015). A computational insight into acetylcholinesterase inhibitory activity of a new lichen depsidone. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem* 30: 528–532.
63. Ehsan HOM & Saadabi AM (2012) Screening of Antimicrobial activity of wild mushrooms from Khartoum State of Sudan. *Microbiology Journal* 2: 64–69.
64. Elias RJ, Kellerby SS, Decker EA (2008) Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit Rev Food Sci Nutr* 48: 430–441.
65. Elisashvili V (2012) Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products (review). *Int J Med Mushrooms* 14: 211-239.
66. Ellman GL, Courtney KD, AndresV Jr, Feather-Stone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88–95.
67. Ergonul PG, Ergonul B, Kalyoncu F, Akata I (2012) Fatty Acid Compositions of Five Wild Edible Mushroom Species Collected from Turkey *Int. J. Pharm* 8: 463–466.
68. Espin CJ, Soler-Rivas G, Wichers JH (2000) Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J Agric Food Chem* 48: 648–656.
69. Ezawa T, Smith SE, Smith FA (2002) P metabolism and transport in AM fungi *Plant and Soil* 244: 221–230.
70. Falandysz J, Szymczyk K, Ichihashi H, Bielawski L, Gucia M, Frankowska A, Yamasaki S (2001) ICP/MS and ICP/AES elemental analysis (38 elements) of edible wild mushrooms growing in Poland. *Food Addit Contam* 18: 503–513.
71. Fan JM, Zhang JS, Tang QJ, Liu YF, Zhang AQ, Pan YJ (2006) Structural elucidation of a natural fucogalactan from the mycelium of *Coprinus comatus*. *Carbohydr. Res* 341: 1130–1134.
72. Fazenda ML, Seviour R, McNeil B, Harvey LM (2008) Submerged Culture Fermentation of “Higher Fungi”: The Macrofungi. *Ad. Appl Microbio.* 63: 33–103.
73. Ferreira IC, Barros L, Abreu RM (2009) Antioxidants in wild mushrooms. *Curr Med Chem* 16: 1543–1560.
74. Flik M (2010). *Koja je ovo gljiva?* Marso, Beograd, Srbija
75. Florianowicz T (1999) Antifungal activity of some metabolites of higher fungi (Basidiomycetes) An overview. *Acta Soc Bot Poloniae.* 68: 307–310.
76. Fraga C (2009) *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*. Wiley, New Jersey
77. Gessler NN, Averyanov AA, Belozerskaya TA (2007) Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochemistry (Mosc).* 72: 1091–1109.

78. Gill SS, Anderson GM, Fischer HD, Bell CM, Li P, Normand SLT, Rochon P (2009) Syncope and its consequences in patients with dementia receiving cholinesterase inhibitors: a population-based cohort study. *Arch Intern Med* 169: 867–873.
79. Gloer JB (1995) The Chemistry of Fungal Antagonism and Defense. *Can J Bot* 73: 1265-1274.
80. Glumac M, Pejin B, Karaman M, Mojović M, Matavulj M (2017) Lignicolous fungi hydrodistilled extracts may represent a promising source of natural phenolics. *Nat. Prod. Res.* 31: 104–107.
81. Gonzalez del Val A, Platas G, Arenal F, Orihuela JC, Garcia M, Hernandez P, Royo I, de Pedro N, Silver LL, Young K, Vicente MF, Pelaez F (2003) Novel illudins from *Coprinopsis episcopalis* (syn. *Coprinus episcopalis*) and the distribution of illudin-like compounds among filamentous fungi. *Mycol Res* 107: 1201–1209.
82. Grdović N, Dinić S, Arambašić J, Mihailović M, Uskoković A, Marković J, Poznanović G, Vidović S, Zeković Z, Mujić A, Mujić I, Vidaković M (2012) The protective effect of a mix of *Lactarius deterrimus* and *Castanea sativa* extracts on streptozotocin-induced oxidative stress and pancreatic β -cell death. *Br. J. Nutr* 108:1 163–1176.
83. Green CE, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite and nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem* 243: 709–714.
84. Greenfield NJ, Hussain M, Lenard J (1987) Effects of growth state and amines on cytoplasmic and vacuolar pH, phosphate and polyphosphate levels in *Saccharomyces cerevisiae*: a 31 P-nuclear magnetic resonance study, *Biochim. Biophys. Acta* 926: 205–214.
85. Gu YH & Leonard J (2006) In vitro effects on proliferation, apoptosis and colony inhibition in ER-dependent and ER-independent human breast cancer cells by selected mushroom species. *Oncol Rep* 15: 417–423.
86. Hagler AN & Ahrean DG (1981) Rapid diazonium blue B test to detect Basidiomycetous yeasts. *Int J Syst Evol Microbiol* 31: 204–208.
87. Halliwell B & Gutteridge JM. (2008) *Free radicals in Biology and Medicine*. 4th edition. Oxford. University press Inc. US
88. Halliwell B (2001) Free radicals and other reactive species in Disease. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons.
89. Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI (1987) The deoxyribose method: A simple test tube assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radical. *Analytical Biochemistry* 165: 215–219.
90. Han C & Liu T (2009) A comparison of hypoglycemic activity of three species of basidiomycetes rich in vanadium. *Biol Trace Elem Res* 127: 177–182.
91. Han C, Cu, B, Wang Y (2008) Vanadium uptake by biomass of *Coprinus comatus* and their effect on hyperglycemic mice. *Biol Trace Elem Res* 124: 35–39.
92. Han C, Cui B, Qu J (2009) Comparison of vanadium-rich activity of three species fungi of basidiomycetes. *Biol Trace Elem Res* 127:2 78–283.
93. Han C, Yuan J, Wang Y, Li L (2006) Hypoglycemic activity of fermented mushroom of *Coprinus comatus* rich in vanadium. *J Trace Elem Med Biol* 20: 191–196.
94. Harki E, Talou T, Dargen R, 1997. Purification, characterisation and analysis of melanin extracted from *Tuber mehno-sporum* Vitt. *Food Chem* 58: 69–73.
95. Hashimoto T, Conti SF, Naylor HB (1959) Studies of the fine structure of microorganisms, Observations on budding *Saccharomyces cerevisiae* by light and electron microscopy. *J Bacteriol* 77: 344–354.
96. Hawksworth DL (1991) The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol Res* 95: 641–655.
97. Heleno SA, Barros L, Martins A, Queiroz MJR, Santos-Buelga C, Ferreira IC (2012) Phenolic, polysaccharidic, and lipidic fractions of mushrooms from northeastern Portugal: Chemical compounds with antioxidant properties *J. Agric. Food Chem* 60: 4634–4640.
98. Ho CT, Lee CY, Huang MT (1992) Phenolic compounds in food and their effects on health I. Analysis occurrence & chemistry. ACS Publications, Washington, USA
99. Hobbs C (1995) *Medicinal Mushrooms An Exploration of Tradition, Healing, and Culture*. Botanica Press.
100. Hollander D, Ugurbil K, Brown TR, Shulman RG (1981) Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of the effect of oxygen upon glycolysis in yeast. *Biochemistry* 20: 5871–5880.
101. Hopple JS & Vilgalys R (1994) Phylogenetic relationships among coprinoid taxa and allies based on data from restriction site mapping of nuclear DNA. *Mycologia* 86: 96–107.

102. Hopple JS & Vilgalys R (1999) Phylogenetic relationships in the mushroom genus *Coprinus* and dark-spored allies based on sequence data from the nuclear gene coding for large ribosomal subunit RNA: Divergent domains, outgroups, and monophyly. *Mol Phylogenet Evol* 13: 1–19.
103. Hutchison LJ & Summerbell RC (1990) Studies on the systematic of ectomycorrhizal fungi in axenic culture. Reactions of mycelia to diazonium blue B staining. *Mycologia* 82: 36–42.
104. Ikekawa T, Nakanishi M, Uehara N, Chihara G, Fukuoka F (1968) Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann* 59: 155–157.
105. Ilić MD, Milanović SD, Carić MD, Vukić V, Kanurić KG, Ranogajec MI, Hrnjez D (2012) The Effect of Transglutaminase on Rheology and Texture of Fermented Milk Products. *J. Texture Stud* 44: 160–168.
106. Inouye S, Abe S, Yamagushi H (2004) Fungal terpenoid antibiotics and enzyme inhibitors. In: *Handbook of Fungal Biotechnology*, New York, USA
107. Jang MJ, Lee YH, Liu JJ, Ju YC (2009) Optimal Conditions for the Mycelial Growth of *Coprinus comatus* strains. *Mycobiology* 37: 103–108.
108. Janjušević L, Karaman M, Šibul F, Tommonaro G, Iodice C, Jakovljević D, Pejin B. (2017). The lignicolous fungus *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (1920): a promising natural source of antiradical and AChE inhibitory agents. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem* 32:355–362.
109. Ji J & Moore D (1993) Glycogen metabolism in relation to fruit body maturation in *Coprinus cinereus* Mycol. Res. 97: 283–289.
110. Jin CY, Kim GY, Choi Yung H (2008) Induction of apoptosis by aqueous extract of *Cordyceps militaris* through activation of caspases and inactivation of Akt in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *J Microbiol Biotechnol* 18: 1997–2003.
111. Kabata-Pendias A (2011) Trace elements in soils and plants. CRC Press, 4th edition.
112. Kačuráková M, Capeka P, Sasinková V, Wellner N, Ebringerová A (2000) FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr Polym* 43: 195–203.
113. Kalač P & Svoboda L (2000) A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chem* 69: 273–281.
114. Karaman M, Mimica-Dukić N, Matavulj M (2005) Lignicolous fungi as potential natural sources of antioxidants. *Arch Biol Sci* 57:93–100.
115. Karaman M (2009a) Autohtone gljive Basidiomycotina – potencijalni resursi biološki aktivnih materija. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu.
116. Karaman M, Mimica-Dukić N, Knežević P, Svirčev Z, Matavulj M (2009b) Antibacterial properties of selected lignicolous mushrooms and fungi from northern Serbia. *Int J Med Mushrooms* 11:269–279.
117. Karaman M, Kaišarević S, Somborski J, Kebert M, Matavulj M (2009c) Biological activities of the lignicolous fungus *Meripilus giganteus* (Pers.: Pers.) Karst. *Arch Biol Sci* 61: 853–861.
118. Karaman M, Emilija JD, Radomir MV, Matavulj MN, Popović MR (2010) Medicinal and edible lignicolous fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agents. *Phytother. Res* 24: 1473–1481
119. Karaman M (2012a) Lekovitost autohtonih makrogljiva Zadužbina Andrejević, Beograd, ISSN 0354–7671.
120. Karaman M, Matavulj M, Janjić Lj (2012b). Antibacterial agents from lignicolous macrofungi. Chapter 18. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. Antimicrobial Agents*, InTech, Rijeka, Croatia
121. Karaman M, Stahl M, Vulić J, Vesić M, Čanadanović-Brunet J (2014) Wild-growing lignicolous mushroom species as sources of novel agents with antioxidative and antibacterial potentials. *Int J Food Sci Nutr* 65: 311–319.
122. Karaman M, Bogavac M, Radovanović B, Sudji J, Tešanović K, Janjušević Lj (2017) *Origanum vulgare* essential oil affects pathogens causing vaginal infections. *J Appl Microbiol*, 122: 1177–1185.
123. Keirle MR, Hemmes DE, Desjardin DE (2004) Agaricales of the Hawaiian Islands. Agaricaceae: *Coprinus* and *Podaxis*; Psathyrellaceae: *Coprinopsis*, *Coprinellus* and *Parasola* *Fungal Divers* 15: 33–124.
124. Kim JI, Kang MJ, Im J, Seo YJ, Lee YM, Song JH, Lee JH, Kim ME (2010) Effect of King Oyster Mushroom (*Pleurotus eryngii*) on Insulin Resistance and Dyslipidemia in db/db Mice. *Food Sci biotechnol* 19: 239–242.
125. Kim YW, Kim KH, Choi HJ, Lee DS (2005) Anti-diabetic activity of beta-glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. *Biotechnol Lett* 27: 483–487.
126. Klaus A, Kozarski M, Nikšić M, Jakovljević D, Todorović N, Van Griensven LLD (2011) Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *LWT Food Sci Technol* 44: 2005–2011.

127. Ko KS, Lim YW, Kim YH, Jung HS (2001) Phylogeographic divergences of nuclear ITS sequences in *Coprinus* species sensu lato. *Mycol Res* 105: 1519–1526.
128. Kozarski M, Klaus A, Nikšić M, Vrvčić MM, Todorović N, Jakovljević D, Van Griensven LLD (2012) Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *J Food Comp Anal* 26: 144–153.
129. Kulaev I, Vagabov V, Kulakovskaya T (1999) New aspects of inorganic polyphosphate metabolism and function. *J. Biosci. Bioeng* 88: 111–129.
130. Lau CBS, Ho CY, Kim CF, Leung KN, Fung KP, Tse TF, Chan, HHL, Chow MSS (2004) Cytotoxic activities of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extract on human leukemia and lymphoma cells by induction of apoptosis. *Life Sci.* 75: 797–808.
131. Lepp NW, Harrison SCS, Morrell BG (1987) A role for *Amanita muscaria* L. in the circulation of cadmium and vanadium in a non-polluted woodland. *Environ. Geochem. Health* 9, 61–64.
132. Li B, Lu F, Suo X, Nan H, Li B (2010) Antioxidant properties of cap and stipe from *Coprinus comatus* *Molecules* 15: 1473–1486.
133. Li WL, Zheng HC, Bukuru J, Kimpe N (2004) Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus., *J Ethnopharmacol*, 92: 1–22.
134. Lilly VG & Barnett HL (1951) *Physiology of fungi*. McGraw-Hill Book Co. Inc. New York, USA
135. Lilly VG & Barnett HL (1953) The utilisation of sugars by fungi *West va Univ. Agric. Expt. Sta. Bull.* 362: 5–58.
136. Lindberg D (2008) *The Beginnings of Western Science*. University Of Chicago Press, 2nd edition.
137. Lindequist U, Niedermeyer THJ, Julich WD (2005) *The Pharmacological potential of mushrooms*. eCAM, Published by Oxford University Press. *Evid Based Complement Alternat Med* 2: 285–299.
138. Liu GT (1999) Recent advances in research of pharmacology and clinical application of *Ganoderma* P. Karst. species (*Aphyllorphomycetdeae*) in China. *Int J Med Mushrooms* 1: 63–67.
139. Liu JK (2007) Secondary metabolites from higher fungi in China and their biological activity. *Drug Discov Ther* 1: 94–103.
140. Li-Weber M (2009) New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents wogonin, baicalein and baicalin *Cancer Treat. Rev* 35: 57–68.
141. Lorenzen K & Anke T (1998) Basidiomycetes as a sources for new Bioactive Natural Products. *Curr Org Chem* 2: 329–336.
142. Luo H, Liu, Y, Fang L, Li X, Tang N, Zhang K (2007) *Coprinus comatus* damages nematode cuticles mechanically with spiny balls and produces potent toxins to immobilize nematodes *Appl Environ Microbiol* 73: 3916–3923.
143. Lv Y, Han L, Yuan C, Guo J (2009) Comparison of hypoglycemic activity of trace elements absorbed in fermented mushroom of *Coprinus comatus*. *Biol Trace Elem Res* 131: 177–185.
144. Lyngstad M & Grasdalen H (1993) A new NMR airlift bioreactor used in 31P-NMR studies of itaconic acid producing *Aspergillus terreus*. *J Biochem Biophys Methods* 27: 105–116.
145. Ma ZJ & Fu Q (2009) Comparison of hypoglycemic activity and toxicity of vanadium (iv) and vanadium (v) absorbed in fermented mushroom of *Coprinus comatus*. *Biol Trace Element Res* 132: 278–284.
146. MacCarthy P & Rice JA, (1985) *Spectroscopic methods (other than NMR) for determining functionality in humic substances*. *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*, Wiley New York 527–560.
147. Magner LN (1992) *A History of Medicine*. Taylor & Francis, CRC Press, 2nd edition, New York, USA.
148. Mannazzu I, Guerra I, Ferretti R, Pediconi D, Fatichenti F (2000) Vanadate and dopper induce overlapping oxidative stress responces in the vanadate-tolerant yeast *Hansenula polymorpha*. *Biochim and Biophys Acta* 1475: 151–156.
149. Mannazzu I, Guerra I, Strabbioli R, Masia A, Maestrone GB, Zoroddu MA, Fatichenti F (1997) Vanadium affects vacuolization and phosphate metabolism in *Hansenula polymorpha*. *FEMS Microbiol* 147: 23–28.
150. Manzi P, Aguzzi A, Pizzoferrato L (2001) Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chem* 73: 321–325.
151. Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majimab T, Nishimurac SI, Lee YC (2005) Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochem* 339: 69–72.
152. Mathlouthi M & Koenig JL, 1986. Vibrational spectra of carbohydrates. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 44: 7–89.
153. Mattila P, Konko K, Eurola M, Pihlava JM, Astola J, Vahteristo L, Hietaniemi V, Kumpulainen J, Valtonen M, Piironen V (2001) Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *J Agric Food Chem* 49: 2343–2348.

154. McDonald S, Prenzler PD, Antolovich M, Robards K (2001) Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chem* 73: 73–84.
155. Mehrotra RS (1951) Physiological studies of some Phytophatoes. *Lloydia* 14: 122-128.
156. Mikiashvili NA, Elisashvili VI, Wasser SP, Nevo E (2006) Comparative study of lectin activity of higher Basidiomycetes. *Int J Med Mushrooms* 8: 31–38.
157. Milovanović I, Misan A, Sarić B, Kos J, Mandić A, Simeunovic J, Kovač D (2012) Evaluation of protein and lipid content and determination of fatty acid profile in selected species of cyanobacteria. In *Proceedings of the 6th Central European Congress on Food, CEFood*.
158. Mizuno T (1999) The extraction and development of antiitumour-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *Int J Med Mushrooms* 1: 9–29.
159. Mkrtychyan JA (2014) Qualitative analysis of fatty acids composition in different collections of coprinoid mushrooms. *Proceedings of the Yerevan State University, Chemistry and Biology* 1: 37–41.
160. Mojović M (2006) *Primena EPR spin-trap metode za detekciju kratkoživećih radikalskih vrsta u biološkim i hemijskim sistemima, Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu.*
161. Monsigny M, Petit C, Roche AC (1988) Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micro-method. *Analitical Biochem* 175: 525–530.
162. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays *Journal of Immunological Methods* 65: 55–63.
163. Moylan JS & Reid MB (2007) Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. *Muscle Nerve* 35:411–429.
164. Nagy GL, Házi J, Vágvölgyi Cs, Papp T (2011) Phylogeny and species delimitation in the genus *Coprinellus* with special emphasis on the haired species. *Mycologia* 104: 254–275.
165. Naumann A, González MN, Hernández OS, Hoegger PJ, Kües U (2008) Correct identification of wood-inhabiting fungi by ITS analysis, *Curr Trends Biotechnol Pharm* 1: 41–61.
166. Navon G, Shulman RG, Yamane T, Eccleshall TR, Lam KB, Baronofsky JJ, Marmur J (1979) Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of wild-type and glycolytic pathway mutants of *Saccharomyces cerevisiae* *ACS Biochem* 18: 4487–4499.
167. Ng TB (2004) Peptides and proteins from fungi. *Peptides* 25: 1055–1073.
168. Nguyen TK, Lee MW, Yoon KN, Kim HY, Jin GH, Choi JH, Im KH, Lee TS (2014) In vitro antioxidant, anti-diabetic, anticholinesterase, tyrosinase and nitric oxide inhibitory potential of fruiting bodies of *Coprinellus micaceus*. *J Mushrooms* 12: 330–340.
169. Nilsson S. & Persson O (1977) *Fungi of Northern Europe 1: Larger Fungi (Excluding Gill Fungi)*. Penguin Books UK
170. Nishikimi M, Rao NA, Yagi K (1972) The occurrence of super oxide anion in the reaction of reduced Phenazine methosulphate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 46: 849–853.
171. Novaković A (2015) *Biopotencijal autohtonih gljiva u funkciji nutraceutika, Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu.*
172. Novaković A, Karaman M, Milovanović I, Belović M, Rašeta M, Radusin T, Ilić N (2016) Edible mycorrhizal species *Lactarius controversus* Pers. 1800 as a source of antioxidant and cytotoxic agents. *Hem. Ind* 70: 113–122.
173. Orčić D, Francšković M, Bekvalac K, Svirčev E, Beara I, Lesjak M, Neda Mimica-Dukic (2014) Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chem* 143: 48–53.
174. Orhan I & Üstün O (2011) Determination of total phenol content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition in selected mushrooms from Turkey. *J Food Compost Anal* 24: 386–390.
175. Paoletti R & Kritchevsky D (1989) *Advances in Lipid Research*. Academic Press 23:1–305.
176. Papagianni M (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes (review). *Biotechnol Adv* 22: 189-259.
177. Papas AM (1999) *Antioxidant status, diet, nutrition and health*, CRC Press, UK
178. Paterson RRM (2006) *Ganoderma – A therapeutic fungal biofactory*. *Phytochemistry* 67: 1985–2001.
179. Paudler W (1974) *Nuclear Magnetic Resonance*. Boston: Allyn and Bacon Chemistry Series. USA.
180. Peay KG, Kennedy PG, Bruns TD, (2008) Fungal Community Ecology: a hybrid beast with a molecular master. *Bioscience* 58: 799–810.

181. Pejin B, Iodice C, Tommonaro G, De Rosa S (2008) Synthesis and biological activities of thio-avarol derivatives. *J. Nat. Prod.* 71: 1850–1853.
182. Pejin B, Tommonaro G, Iodice C, Tesevic V, Vajs V, De Rosa S (2012a) A new lichen depsidone from *Lobaria pulmonaria*. *Dig J Nanomater Biostruct* 7: 1663–1666.
183. Pejin B, Tommonaro G, Iodice C, Tesevic V, Vajs V (2012b) Acetylcholinesterase inhibition activity of acetylated depsidones from *Lobaria pulmonaria*. *J. Nat. Prod.* 26: 1634–1637.
184. Pejin B, Tommonaro G, Iodice C, Tesevic V, Vajs V, De Rosa S (2013a) A new depsidone of *Lobaria pulmonaria* with acetylcholinesterase inhibition activity. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 28: 876–878.
185. Pejin B, Jovanović KK, Mojović M, Savić AG (2013b) New and highly potent antitumor natural products from marine-derived fungi: covering the period from 2003 to 2012. *Curr. Top. Med. Chem.* 13: 2745–2766.
186. Pejin & Karaman (2017). Antitumour natural products from marine-derived fungi. In: Reference Series in Phytochemistry: Fungal Metabolites, Kishan Ramawat, Jean-Michel Mérillon (eds.) Springer Publishing Inc., Switzerland.
187. Pero RW & Lund H (2011) Dietary quinic acid supplied as the nutritional supplement AIO + AC-11® leads to induction of micromolar levels of nicotinamide and tryptophan in the urine, *Phytother. Res* 25: 851–857.
188. Pero RW, Lund H, Leanderson T (2009) Antioxidant metabolism induced by quinic acid. Increased urinary excretion of tryptophan and nicotinamide, *Phytother. Res.* 23:335–346.
189. Pilatus U & Techel D (1991) ³¹P-NMR-studies on intracellular pH and metabolite concentrations in relation to the circadian rhythm, temperature and nutrition in *Neurospora crassa*. *Bioch Biophys Acta* 1091: 349-355.
190. Popović M, Vukmirović S, Stilinović N, Capo I, Jakovljević V (2010) Anti-oxidative activity of an aqueous suspension of commercial preparation of the mushroom *Coprinus comatus*. *Molecules* 15: 4564–4571.
191. Powell M (2014) Medicinal Mushrooms – A Clinical Guide. Mycology Press, UK.
192. Pruitt K, Tatusova T, Maglott D (2007) NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res* 35: 61–65.
193. Puttaraju NG, Venkatesaiah SU, Dharmesh SM, Urs SMN, Somasundaram R (2006) Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 54: 9764–9772.
194. Qin G, Tian S, Chan Z, Li B (2007) Crucial role of antioxidant proteins and hydrolytic enzymes in pathogenicity of *Penicillium expansum*: analysis based on proteomics approach. *Mol Cell Proteomics* 6: 425–438.
195. Radnović D, Matavulj M, Karaman M (2007) Mikologija - Skripta za studente biologije. Univerzitet u Novom Sadu. Prirodno-matematički fakultet. Novi Sad.
196. Ranković B (2003) Sistematika gljiva. Univerzitet u Kragujevcu. Prirodno-matematički fakultet. Kragujevac.
197. Rašeta M, Karaman M, Jakšić M, Šibul F, Kebert M, Novaković A, Popović M (2016) Mineral composition, antioxidant and cytotoxic biopotentials of wild-growing *Ganoderma* species (Serbia): *G. lucidum* (Curtis) P. Karst versus *G. applanatum* (Pers.) Pat. *Int J of Food Sci Tech* 12: 2583–2590
198. Ravi B, Renitta RE, Prabha ML, Issac R, Naidu S (2013) Evaluation of antidiabetic potential of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in alloxan-induced diabetic micellimmunopharmacol Immunotoxicol 35: 101–109.
199. Rayman MP (2008) Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *Br J Nutr* 100: 254–268.
200. Redhead SA, Vilgalys R, Moncalvo J-M, Johnson J, Hopple JS (2001) *Coprinus* Pers. and the disposition of *Coprinus* species sensu lato. *Taxon* 50: 203–241.
201. Rehder D (2008) Bioinorganic vanadium chemistry. Chichester, New York: J.Wiley and Sons, USA.
202. Reis FS, Barros L, Martins A, Ferreira ICFR (2011) Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chem Toxicol* 50: 191-197.
203. Ren J, Shi JL, Han CC, Liu ZQ, Guo JY (2012) Isolation and biological activity of triglycerides of the fermented mushroom of *Coprinus comatus*. *BMC Complement Altern Med* 12: 52–55.
204. Ren L, Hemar Y, Perera CO, Lewis G, Krissansen GW, Buchanan PK (2014) Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. *Bioact Carbohydr Dietary Fibre* 3: 41–51.
205. Roberts JKM (1986) NMR methods for determination of intracellular pH. In: Linskens, H.F. and Jackson, J.F. eds. Modern methods of plant analysis, Nuclear Magnetic Resonance, Springer-Verlag, 2: 106–124.
206. Sánchez C (2017) Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms *Synth Syst Biotechnol* 2: 13–22
207. Sarikurkcu C Tepe B, Kocak MS, Uren MC (2015) Metal concentration and antioxidant activity of edible mushrooms from Turkey *Food Chem* 175: 549–555

208. Schafer DJ (2010) Keys to sections of *Parasola*, *Coprinellus*, *Coprinopsis* and *Coprinus* in Britan Duck End House, Hawleys Lane, Whitchurch, Buckinghamshire, UK
209. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, Fungal Barcoding Consortium 109: 6241–6246.
210. Sharma SK, Gautam N, Singh Atri N (2015) Optimized extraction, composition, antioxidant and antimicrobial activities of exo and intracellular polysaccharides from submerged culture of *Cordyceps cicadae*. BMC Complement Altern Med. 2015:1–8.
211. Shoeba M, Mondala P, Kylinb H, Nahara N (2017) Chemical and biological activity of mushrooms naturally occurring in Bangladesh Asian J of Pharmacognosy 1: 42–51.
212. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods Enzymol 299: 152–178.
213. Smiderle FR, Alquini G, Tadra-Sfeir MZ, Iacomini M, Wichers HJ, Van Griensven LLD (2013) *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1 → 6)- β -D-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. Carbohydr Polym 94: 91–99.
214. Smith H, Doyle S, Murphy R (2015) Filamentous fungi as a source of natural antioxidants. Food Chem 185: 389–397.
215. Smith MR (2016) Cord-forming Palaeozoic fungi in terrestrial assemblages Bot J Linn Soc 180: 452–460.
216. Solomons GL (1975) Submerged culture production of mycelial biomass. The Filamentous Fungi, Industrial Mycology. Edward Arnold Press: London, UK.
217. Stamets P (2002) Novel antimicrobials from mushrooms. Herbal Gram 54: 2–6.
218. Stilić N (2013) Farmakološke, toksikološke i biokemijske osobine preparata gljive *Coprinus comatus*, Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu.
219. Stojković D, Reis F, Barros L, Glamočija J, Ćirić A, Griensven L, Soković M, Ferreira I (2013) Nutrients and non-nutrients composition and bioactivity of wild and cultivated *Coprinus comatus* (O. F. M Müll.) Pers. Food Chem Toxicol 59: 289–296
220. Stokes DJ, (2008) Principles and practice of variable pressure environmental scanning electron microscopy (VP-ESEM). John Wiley & Sons Chichester, UK
221. Stone BA & Clarke AE (1992) Chemistry and Biology of (1,3)- β -glucans. Australia: La Trobe University Press, 47-49.
222. Suay I, Arenal F, Asensio FJ, Basilio A, Cabello MA, Diez MT, Garcia JB, Gonzales del Val A, Gorrochategui J, Hernandez P, Pelaez F, Vicente MF (2000) Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. Antonie van Leeuwenhoek. Intl J Gen Mol Microbiol 78: 129–139.
223. Summerbell RC (1985) The staining of filamentous fungi with diazonioblue B. Mycologia 77: 587–593.
224. Sužnjević DŽ, Pastor FT, Gorjanović SŽ (2011) Polarographic study of hydrogen peroxide anodic current and its application to antioxidant activity determination. Talanta 85: 1398–1403.
225. Szwajgier D & Borowiec K (2012). Phenolic acids from malt are efficient acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. J. Inst. Brew 118: 40–48.
226. Teles APC & Takahashi JA (2013) Paecilomide, a new acetylcholinesterase inhibitor from *Paecilomyces lilacinus*. Microbiol. Res 168: 204–210.
227. Tešanović K, Pejin B, Šibul F, Matavulj M, Rašeta M, Janjušević Lj, Karaman M (2017) A comparative overview of antioxidative properties and phenolic profiles of different fungal origins: fruiting bodies and submerged cultures of *Coprinus comatus* and *Coprinellus truncorum*. J Food Sci Technol 54: 430–438.
228. Tommonaro G, García-Font N, Vitale RM, Pejin B, Iodice C, Cañadas S, Contelles JM, Oset-Gasque MJ (2016) Avarol derivatives as competitive AChE inhibitors, non hepatotoxic and neuroprotective agents for Alzheimer's disease. Eur. J. Med. Chem 122: 326–338.
229. Tommonaro G, Pejin B, Iodice C, Tafuto A, De Rosa S (2015) Further *in vitro* biological activity evaluation of amino-, thio- and ester-derivatives of avarol. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 30: 333–335.
230. Trowell H, Southgate DA, Wolever TM, Leeds AR, Gassull MA, Jenkins DJ (1976) Letter: Dietary fibre redefined. Lancet 1: 967–967.
231. Tsai SY, Tsai HL, Mau JL (2009) Antioxidant properties of *Coprinus comatus*. J. Food Biochem 33: 368–389.
232. Tsiani E & Fantus IG (1997). Vanadium compounds, biological actions and potential as pharmacological agents. TEM, 8: 2–65.

233. Udovičić M, Baždarić K, Bilić-Zulle L, Petrovečki M (2007) Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije? *Biochemia Medica* 17: 10–15.
234. Vagabov VM, Trilisenko LV, Shchipanova IN, Sibeldina LA, Kulaev IS (1998) Changes in inorganic polyphosphate length during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol (Moscow)* 67: 154–157.
235. Vamanu E (2014) Antioxidant properties of mushroom mycelia obtained by batch cultivation and tocopherol content affected by extraction procedures. *BioMed Res. Int* 2014: 1–8.
236. Varrot A, Basheer SM, Imberty A (2013) Fungal lectins: Structure, function and potential applications *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23: 678–685.
237. Vaz JA, Barros L, Martins A, Santos-Buelga C, Vasconcelos MH, Ferreira ICFR (2011) Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. *Food Chem* 126: 610–616.
238. Von Usedom A (2003) *Stoffe, Materie, Periodensystem, Chemische Bindung.*: Mentor-Verl. Munchen, Germany
239. Vukojević J (2002) *Praktikum iz mikologije i lihenologije*, III izdanje. Naučna knjiga, Beograd.
240. Wang G, Wang J, Fu Y, Bai L, He M, Li B, Fu K (2013) Systemic treatment with vanadium absorbed by *Coprinus comatus* promotes femoral fracture healing in streptozotocin-diabetic rats *Biol Trace Elem Res.* 51:424–433.
241. Wang XM, Zhang J, Wu LH, Zhao YL, Li T, Li JQ, Wang YZ, Liu HG (2014) A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. *Food Chem* 151: 279–285.
242. Wang Y, Bao L, Yang X, Li L, Li S, Gao H, Yao XS, Wen H, Liu HW (2012) Bioactive sesquiterpenoids from the solid culture of the edible mushroom *Flammulina velutipes* growing on cooked rice *Food Chem.* 132: 1346–1353.
243. Wershaw RL & MacCarthy P. (Eds.), *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water.* Wiley–Interscience, New York, USA
244. Wasser S (2003) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 258–274.
245. Wasser SP & Weis AL (1999) Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev Immunol* 19: 65–96.
246. Wasser SP (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 258–274.
247. Wasser SP (2011) Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 1323–1332.
248. Wills WH (1954) The utilisation of carbon and nitrogen compounds by *Phytophthora parasitica* Dastur var. nicotianade (Breda de Haan) Tucker. *J Elisha Mitchell Scient Soc* 70: 231–235.
249. Willsky GR, White DA, McCabe BC (1984) Metabolism of added orthovanadate to vanadyl and high-molecular weight vanadates in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 259: 13273–13281.
250. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci* 87: 4576–4579.
251. Wolf ERS, Wisbeck E, Silveira MLL, Gern RMM, Pinho MSL, Furlan SA (2008) Antimicrobial and antineoplastic activity of *Pleurotus ostreatus*. *Appl Biochem Biotechnol* 151: 401–412.
252. Wu WC, Hsiao JR, Lian YY, Lin CY, Huang BM (2007) The apoptotic effect of cordycepin on human OEC-M1 oral cancer cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 60: 103–111.
253. Xiao C, Wu QP, Tan JB, Cai W, Yang XB, Zhang JM (2011) Inhibitory effects on alpha-glucosidase and hypoglycemic effects of the crude polysaccharides isolated from 11 edible fungi. *J Med Plants Res* 5: 6963–6967.
254. Xie Y, Yang W, Chen X, Xiao J (2014). Inhibition of flavonoids on acetylcholine esterase: binding and structure-activity relationship. *Food Funct* 5: 2582–2589.
255. Xu X, Yan H, Chen J, Zang X (2011a) Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnol Adv* 29:667-674.
256. Xu Z, Chen X, Zhong Z, Chen L, Wang Y (2011) Ganoderma lucidum polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities. *Am J Chin Med* 39: 12–27.
257. Yang FC & Liau CB (1999) The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures *Process Biochem*, 33: 547–53.
258. Yang YC, Bestos M, Chen KJ (1993) Effect of osmotic stress and growth stage on cellular pH and polyphosphate metabolism in *Neurospora crassa* as studied by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1179: 141–147.

259. Yilmaz N, Solmaz M, Turkecul I, Elmastas M (2006) Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. *Food Chem*, 99: 168–174.
260. Ying J, Mao X, Ma Q, Zong Y, Wen H (1987) *Icons of Medicinal Fungi from China*, Science Press, Beijing, China
261. You L, Gao Q, Feng M, Yang B, Ren J, Gu L, Cui C, Zhao M (2013) Structural characterisation of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* and their antioxidant and antitumour activities. *Food Chem* 138: 2242–2249.
262. Zaidman BZ, Wasser SP, Nevo E, Mahajna J (2008) *Coprinus comatus* and *Ganoderma lucidum* interfere with androgen receptor function of LNCaP prostate cancer cells. *Mol Biol Rep* 35: 107–117.
263. Zenkova VA, Efremenkova OV, Ershova EY, Tolstych IV, Dudnik YV (2003) Antimicrobial activity of medicinal mushrooms from the genus *Coprinus* (Fr.) S. F. Gray (Agaricomycetidae). *Int J Med Mushrooms* 5: 1–6.
264. Zhang M, Cui SW, Cheung PCK, Wang Q (2007) Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends Food Sci Technol* 18:4–19.
265. Zhao L, Dong Y, Chen G, Hu Q (2010) Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydr Polym* 80: 783–789.
266. Zhao S, Rong CB, Kong C, Liu Y, Xu F, Miao QJ, Wang SX, Wang HX, Zhang GQ (2014) A novel laccase with potent anti-proliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from mycelia of mushroom *Coprinus comatus*. *BioMed Res Int* 2014: 1–8.
267. Zhong JJ & Xiao JH (2009) Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 113: 79–150.
268. Žižić M (2013) Metaboizam i metabolički efekti vanadijuma kod gljive *Phycomyces blakesleeanus* Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu.
269. Žižić M, Živić M, Spasojević I, Pristov Bogdanović J, Stanić M, Cvetić-Antić T, Zakrzewska J (2013) The interactions of vanadium with *Phycomyces blakesleeanus* mycelium: enzymatic reduction, transport and metabolic effects. *Res Microbiol* 164: 61–69.
270. Žižić M, Živić M, Maksimović V, Stanić M, Križak S, Antić TC, Zakrzewska J (2014) Vanadate influence on metabolism of sugar phosphates in fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *PLoS ONE*, 9: 2–8.
271. Žižić M, Dučić T, Grolimund D, Bajuk-Bogdanović D, Nikolic M, Stanić M, Križak S, Zakrzewska J (2015) X-ray absorption near-edge structure micro-spectroscopy study on vanadium speciation on fungus *Phycomyces blakesleeanus* mycelium. *Anal Bioanal Chem* 407: 7487–7496.
272. Žižić M, Miladinović Z, Stanić M, Hadžibrahimović M, Živić M, Zakrzewska J (2016) 51V NMR investigation of cell-associated vanadate species in *Phycomyces blakesleeanus* mycelium. *Res Microbiol* 167: 521–528.
273. Zjawioni JK (2004) Biologically active compounds from Aphylllophorales (polypore) fungi. *J. Nat. Prod.* 67: 300–310.

БИОГРАФИЈА

Кристина Тешановић рођена је 20. августа 1989. у Лозници. Природно-математички факултет у Новом Саду уписала је 2008. год., дипломирала 2012. год. и стекла звање Дипломирани биолог. Током студија била је активни члан Научно-истраживачког друштва Јосиф Панчић са учешћем на пројектима „Биодиверзитет паркова града Новог Сада“ финансираног од стране Градске управе за заштиту животне средине (2010. год.) и пројекта „Промовисање ентомологије као науке кроз упознавање са ентомофауном Фрушке горе“, финансираног од стране Министарства за науку и технолошки развој (2011. год.).



Након дипломирања 2012. год. уписала је Мастер академске студије на Одсеку за биологију и екологију, смер Микробиологија, по чијем је завршетку уписала Докторске академске студије, 2013 год. смер Доктор биолошких наука – Микробиологија. Од 2014. год. као Стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије прикључена је на пројекат под називом „Биолошки активни природни производи као потенцијални извори нових лекова и дијететских суплемената“ руководиоца др Неде Мимица-Дукић са Департмана за хемију, биохемију и заштиту животне средине, ПМФ-а у Новом Саду. Исте године изабрана је у звање *истраживач-приправник*.

У току докторских студија учествовала је у извођењу практичне наставе на Катедри за микробиологију у оквиру предмета Биологија алги и гљива и Општа микробиологија за студенте основних академских студија, као и на предмету Биоактивни метаболити микроорганизама за студенте мастер академских студија. Такође, учествовала је у извођењу 3 дипломска и 7 мастер радова студената на Катедри за микробиологију.

Године 2016. боравила је два месеца на стручном усавршавању у Братислави (Словачка) у оквиру међународног пројекта под називом „*The role of metal homeostasis, reduction and sporulation in the metal resistance of Gram-positive bacteria*“ чији је финансијер SCOPES Joint Research Projects and Institutional Partnerships, (2014-2017 год.) Швајцарска.

Учествовала је у реализацији 3 национална и 1 међународног пројекта. Коаутор је четири рада у међународним часописима (категорије M21, M22 и M23), једног предавања по позиву са међународног скупа штампано у изводу, једног саопштења са међународног скупа штампано у целини и 19 саопштења са међународних скупова штампаних у изводу.

Од 2015 члан је Друштва микробиолога Србије. Јула месеца 2017. изабрана је у звање *истраживач-сарадник* за ужу научну област Микробиологија на Департману за биологију и екологију, Природно-математичког факултета у Новом Саду.

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број: РБР

Идентификациони број: ИБР

Тип документације: ТД

Тип записа: ТЗ

Врста рада (дипл., маг., докт.): ВР

Име и презиме аутора: АУ

Ментори (титула, име, презиме, звање): МН

Наслов рада: НР

Језик публикације: ЈП

Језик извода: ЈИ

Земља публикавања: ЗП

Уже географско подручје: УГП

Година: ГО

Издавач: ИЗ

Место и адреса: МА

Физички опис рада: ФО

Научна област: НО

Научна дисциплина: НД

Предметна одредница, кључне речи: ПО

Универзална децимална класификација, УДК:

Чува се: ЧУ

Важна напомена: ВН

Монографска документација

Текстуални штампани материјал

Докторска дисертација

Кристина Тешановић

др Маја Караман, ванредни професор Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду
др Борис Пејин, научни сарадник Института за мултидисциплинарна истраживања (IMSI),
Универзитета у БеоградуBiological activity and chemical composition of autochthonous mushroom species *Coprinus comatus* (O.F. Müll.) Pers. Gray, 1797 and *Coprinellus truncorum* (Scop.) Redhead, Vilgalys & Monclavo, 2001

Српски (ћирилица)

Српски/Енглески/Руски

Република Србија

Војводина

2017.

Ауторски репринт

Нови Сад; Трг Доситеја Обрадовића 3, 21000 Нови Сад,
Република Србија

Број поглавља: 7; Страница: 130; Број слика: 52; Број табела: 20; Број литературних цитата 273;

Биологија

Микробиологија

Basidiomycota, макрогљиве, медицинске гљиве, секундарни метаболити, биолошка активност, NMR; SEM; слободни радикали, НРМС антиоксидативна активност, спектрофотометријски тестови; антимикуробна активност, вијабилност ћелија Her G2, Rin-5F, LC-MS-MS, фенолна једињења, FTIR спектроскопија, планарна хроматографија, GC-MS масне киселине, AAS, макро- и микроелементи

Библиотека Департмана за биологију и екологију,
Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, Трг Доситеја Обрадовића 3, 21000 Нови Сад, Република Србија

-

Извод: ИЗ

У оквиру ове докторске дисертације испитана је биолошка активност екстракта плодних тела и потопљених култура (мицелије и филтрата) аутохтоних врста гљива *Coprinus comatus* и *Coprinellus truncorum*. Такође, испитан је метаболизам фосфата мицелија обе врсте употребом нуклеарно магнетне резонантне спектроскопије (^{31}P NMR), утицај ванадијума на метаболизам фосфата као и идентификација облика ванадата присутних у ћелији мицелије (^{51}V NMR). Утврђена је антирадикалска и антиоксидативна активност етанолних, метанолних и водених екстракта гљива при чему су се екстракти потопљених култура издвојили по антирадикалској, а екстракти плодних тела по антиоксидативној активности.

Екстракти потопљених култура истакли су се и у погледу антибактеријске активности, где се као најпотентнији показао хлороформски екстракт филтрата потопљене културе *C. comatus*. Такође, етанолни екстракт филтрата потопљене културе *C. comatus* показао се као најпотентнији у антиацетилхолинестеразној активности у односу на конвенционални лек донепезил. Испитан је и утицај екстракта на вијабилност ћелијских линија HepG2 (хумане хепатома ћелије) и Rin-5F (β ћелије панкреаса пацова).

Спектрофотометријским методама одређен је укупан садржај фенола и флавоноида у већини анализираних екстракта.

LC/MS идентификацијом и квантификацијом фенолних киселина уочена је разлика између фенолних једињења присутних у плодном телу, мицелији и филтрату потопљене културе. Екстракти потопљених култура бележе већи број и већи садржај једињења.

Укупан садржај протеина одређен само у воденим екстрактима, а укупан садржај угљених хидрата у полисахаридним екстрактима. Употребом Фуријеве инфрацрвене спектроскопске методе (FTIR) детектоване су везе између угљених хидрата присутних у полисахаридним екстрактима, а планарном хроматографијом показано је да екстракти плодног тела и филтрата врсте *C. truncorum*, као и екстракт плодног тела врсте *C. comatus*, садрже велику количину D-глукозе, док екстракт мицелије *C. truncorum*, баш као и екстракти филтрата и мицелије *C. comatus*, садрже највише галактозе.

Квалитативном и квантитативном елементарном анализом (AAS) утврђен је виши садржај калијума и гвожђа у анализираним узорцима. GC-MS идентификацијом и квантификацијом масних киселина указано је на значајно присуство линолне киселине код обе врсте.

Како за аутохтону врсту *C. truncorum* постоји мало података у литератури, подаци о њеном хемијском саставу могу се сматрати иновативним.

Компаративним прегледом биолошке активности и хемијског састава екстракта плодног тела и мицелије и филтрата (потопљених култура) указано је да су анализирани екстракти извори биоактивних супстанци са медицинским потенцијалом, а потопљене културе датих гљива представљају атрактивне кандидате за даља биотехнолошка истраживања.

12.11.2015.

Датум прихватања теме од стране Сената:

ДП

Датум одбране: ДО

Чланови комисије: (Научни степен / име и презиме / титула / звање / назив организације / статус) КО

Председник:

Ментор:

Ментор:

Члан:

Члан:

Члан:

др Мирјана Богавац, редовни професор,
Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду
др Маја Караман, ванредни професор Природно-
математички факултет, Универзитета у Новом Саду
др Борис Пејин, научни сарадник Институт за
мултидисциплинарна истраживања (IMSI),
Универзитет у Београду

др Јелена Марковић, доцент, Природно-
математички факултет, Универзитета у Новом Саду
др Милан Жижич, научни сарадник Институт за
мултидисциплинарна истраживања (IMSI),
Универзитет у Београду

др Александра Новаковић, научни сарадник, Научни
институт за прехранбене технологије, Универзитет у
Новом Саду

UNIVERSITY OF NOVI SAD FACULTY OF SCIENCES KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO

Identification number: INO

Document type: DT

Type of record: TR

Contents code: CC

Author: AU

Mentors: MN

Monograph documentation

Textual printed material

PhD Thesis

Kristina Tešanović

Associate professor Maja Karaman, PhD, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

Dr Boris Pejin, Research Associate, Institute for

Multidisciplinary Research (IMSI), University of Belgrade

Title: TI

Language of text: LT

Serbian (Cirilic)

Language of abstract: LA

Serbian (Cirilic)/English / Russian

Country of publication: CP

Republic of Serbia

Locality of publication: LP

Vojvodina

Publication year: PY

2017.

Publisher: PU

Author's reprint

Publication place: PP

Novi Sad; Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia

Physical description: PD

Chapters: 7; Pages: 130; Pictures: 52; Tables: 20;

References: 273;

Scientific field SF

Biology

Scientific discipline SD

Microbiology

Subject, Key words SKW

Basidiomycota, *Coprinus comatus*, *Ciprinellus truncorum*, medical fungi, free radicals, secondary metabolites, biological activity, NMR; HPMC antioxidant activity, antimicrobial activity, Hep G2, Rin-5F, LC-MS-MS, phenolic compounds, FTIR spectroscopy, planar chromatography, GC-MS fatty acids, AAS, macro- and microelements

Universal decimal classification, UDC

Holding data: HD

Library of Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia

Note: N

-

Abstract: AB

The biological activity of extracts of basidiocarps (fruiting bodies) and submerged cultures (mycelium and filtrate) of autochthonous mushroom species *Coprinus comatus* and *Coprinellus truncorum* was examined. Furthermore, the metabolism of phosphate of mycelia of both types was studied using nuclear magnetic resonance spectroscopy (³¹R NMR), the influence of vanadium on phosphate metabolism and the identification of vanadate oxidation states present in the mycelia cell (⁵¹V NMR).

The antiradical and antioxidant activity of methanolic, ethanolic and water fungal extracts was determined. Extracts of submerged cultures achieved the best antiradical activity while fruit body extracts showed the best antioxidant activity.

Extracts of submerged cultures also highlighted in terms of antibacterial activity, where the chloroform extract of the submerged culture *C. comatus* showed as the most potent. Also, the ethanolic extract of the submerged culture of *C. comatus* was found to be most relevant in anti-acetylcholinesterase activity compared with the conventional donepezil drug. The influence of extracts on the viability of cell lines HepG2 (human hepatocytes cells) and Rin-5F (β pancreatic cells of the rat) was also examined.

Spectrophotometric methods determined the total content of phenol and flavonoids in most of the analyzed extracts.

The LC/MS identification and quantification of phenolic acids revealed the difference between the phenolic compounds present in the fruiting body, mycelium, and the submerged culture filtrate. Extracts of submerged cultures record a greater number and higher content of compounds.

The total content of proteins determined only in water extracts and the total content of carbohydrates in polysaccharide extracts. Using the Fourier infrared spectroscopic method (FTIR), the links between the sugar present in the polysaccharide extracts were detected, and planar chromatography showed that the extracts of the fruiting body and the filtrate of type *C. truncorum*, as well as the extract of the fruiting body of the species *C. comatus*, contain a large amount of D-glucose, while the extract of the *C. truncorum* mycelia and mycelia of *C. comatus*, contain the most galactose.

GC-MS identification and quantification of fatty acids indicated a significant presence of linoleic acid in both species, while qualitative and quantitative elemental analysis (AAS) has determined a higher content of potassium and iron in the analyzed samples.

Since there is no data in the literature for the autochthonous species *C. truncorum*, the studies on its chemical composition can be considered advanced as innovative.

A comparative review of the biological activity and the chemical composition of the extracts of the fruiting body and mycelia and filtrates of medium of submerged cultures indicated that the extracts were analyzed by sources of bioactive substances with medical potential, and the submerged cultures of these mushrooms are attractive candidates for biotechnological research.

12.11.2015.

Accepted by the Scientific Board on, ASB:

Defended: DE

Thesis Defend Board: DB

President:

Dr Mirjana Bogavac, Full professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad

- Mentor: Dr Maja Karaman, Associate Professor, Faculty of Science, University of Novi Sad
- Mentor: Dr Boris Pejin, Research Associate, Institute for Multidisciplinary Research (IMSI), University of Belgrade
- Member: Dr Jelena Marković, Assistant professor, Faculty of Science, University of Novi Sad
- Member: Dr Milan Žižić, Research Associate, Institute for Multidisciplinary Research (IMSI), University of Belgrade
- Member: Dr Aleksandra Novaković, Research Associate, Scientific Institute of Food Technology, University of Novi Sad

УНИВЕРСИТЕТ В НОВИ САДЕ ЕСТЕСТВЕННО-МАТЕМАТИЧЕСКИЙ ФАКУЛТЕТ КЛЮЧЕВАЯ ДОКУМЕНТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Серийный номер: СН	Монографическая документация
Идентификационный номер: ИН	Текстуально напечатанный материал
Тип документации:	аспирантура
Тип записи:	Тешанович Кристина
Вид работы (диплом, магистерская, аспирантура):	Д-р Мая Караман, профессор
Фамилия и имя автора:	Естественно-математический факультет, Университет в Нови Саде
Научный руководитель (учёная степень, фамилия, имя, должность):	Д-р Борис Пейн, научный сотрудник института мультидисциплинарных испытаний (ИМИ) Университет в Белграде
Заголовок работы: ЗР	Биологическая активность и химический состав автохтонных видов грибов <i>Coprinus comatus</i> (O.F. Müll.) Pers. Gray, 1797 и <i>Coprinellus truncorum</i> (Scop.) Redhead, Vilgalys & Monclavo, 2001
Язык публикации: ЯП	Сербский (кирилица)
Язык: ЯИ	Сербский/английский
Страна опубликования: СО	Республика Сербия
Ужая географическая область: УГО	Воеводина
Год: Г	2017
Издательство: И	Авторское самостоятельное
Адрес: А	Нови Сад, Площадь Доситея Обрадовича 3, 21000 Нови Сад, Республика Сербия
Физическое описание работы: ФОР	Количество глав: 7, страниц 130, фотографии 52, таблиц 20, ссылок 273
Научная область: НО	Биология
Научная дисциплина: НД	Микробиология
Ключевые слова: КС	Basidiomycota, макрогрибы, медицинские грибы, свободные радикалы, вторичные метаболиты, биологическая активность, NMR; SEM, НРМС антиоксидантная активность, спектрофотометрические тесты, антимикробная активность, цитотоксическая активность, Нер G2, Rin-5F, LC-MS-MS, фенольные соединения, FTIR спектроскопия, планарная хроматография, GC-MS жирных кислот, AAS, макро и микроэлементы.
УДК	
Хранится:	Библиотека кафедры для биологии и экологии, Естественно-математический факультет, Университет в Нови Саде, Площадь Доситея Обрадовича 3, 21000 Нови Сад, Республика Сербия
Важные пометы:	-
Аннотация:	В рамках данной работы была исследована биологическая активность экстракта плодородных

тел и погруженных видов культур (мицелии и филтрата) автотонных видов грибов *Coprinus comatus* и *Coprinellus truncorum*. Также, исследован метаболизм фосфата обеих видов мицелий с помощью ядерного магнитного резонанса спектроскопии (^{31}P ЯМР), влияние на содержание ванадия в метаболизме фосфата, а также идентификация формы ванадата присущего в клетках мицелий (51V ЯМР). Установленная антирадикальная и антиоксидантная активность метанольных, этанольных и водных экстрактов гриба, причём выделяются экстракты погружённых культур по антирадикальной активности и экстракты плодородных тел по антиоксидантной активности.

Экстракты погружённых культур выделялись и в плане антибактериальной активности, причем, наиболее мощным из филтратов оказался экстракт хлороформа погруженной культуры *C. comatus*. А также этанольный экстракт филтрата погружённой культуры *C. comatus* оказался наиболее мощным в анти-ацетихолинестеразной активности по сравнению с традиционным лекарством донепезилом. Было исследовано и влияние экстрактов на виабильность клеток линий HepG2 (гуманые гепатома клетки) и Rin-5F (β клетки поджелудочной железы крыс).

Методом спектрофотометрии определена совокупность фенола и флавоноида в большинстве проанализированных экстрактах.

С помощью ЛСМС идентификации и квантификации фенольных кислот была замечена разница между соединениями фенола, присущих в плодородном теле, и мицелии, и филтрата погружённой культуры. Экстракты погружённых культур отражают больше количество и более высокое содержание соединений.

Общее содержание белков выделен только в водяных экстрактах, и общее содержание углеводов в полисахаридных экстрактах. Используя инфракрасный метод спектроскопии Фурье (ИКМСФ) были обнаружены связи между сахарами, присущими в полисахаридных экстрактах, а планарной хроматографией было показано, что экстракты плодородного тела и филтратов вида *C. truncorum*, а также и экстракты плодородного тела вида *C. comatus* содержат большое количество D-глюкозы, в то время как экстракт мицелии *C. truncorum*, именно как и экстракт филтрата и мицелии *C. comatus*, содержат больше всего галактозы.

GC-MS идентификацией и квантификацией жирных

кислот показано значительное наличие линолевой кислоты у обоих видах. А качественным и квантитативным элементарным анализом установлено большее содержание калиума и железа в анализированных шаблонах.

Из-за того, что для автохтонного вида *S. truncogum* практически не было данных в литературе, данные о её химическом составе можно считать прогрессивным и инновационным.

Сравнительный анализ биологической активности и химического состава экстрактов плодородного тела и мицелии и фильтрат (погружённых культур) показывает, что проанализированные экстракты – источники биологически активных веществ с медицинским потенциалом, и погружённые культуры данных грибов являются привлекательными кандидатами для биотехнологических исследований.

12.11.2015.

Дата принятия темы Сенатом:

Дата защиты:

Члены комиссии: (учёная степень, имя и фамилия, название, название организации, статус)

Председатель:

Научный руководитель:

Научный руководитель:

Член:

Член:

Член:

Д-р Мирьяна Богавац, профессор, Медицинский факультет, Университет в Нови Саде

Д-р Мая Караман, профессор
Естественно-математический факультет,
Университет в Нови Саде

Д-р Борис Пейн, научный сотрудник института
мультидисциплинарных испытаний (ИМСИ)
Университет в Белграде

Д-р Елена Маркович, доцент, Естественно-математический факультет, Университет в Нови Саде

Д-р Милан Жижич, научный сотрудник института
мультидисциплинарных испытаний (ИМСИ)
Университет в Белграде

Д-р Александра Новакович, научный сотрудник,
Институт пищевых технологий, Университет в Нови Саде