



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO MATEMATIČKI FAKULTET  
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU



Aleksandra Novaković

# BIOPOTENCIJAL AUTOHTONIH GLJIVA U FUNKCIJI NUTRACEUTIKA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof. dr Maja Karaman

Kandidat:

Aleksandra Novaković MSc.

---

Novi Sad, 2015 godina

*Posvećeno Dimitriju...*

---

## ZAHVALNICA

*Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u okviru realizacije projekata Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije br. III 46001. Zahvaljujem se rukovodiocu projekta dr Jasni Mastilović na podršci i razumevanju.*

*Zahvaljujem se prof. dr Maji Karaman, mentoru, na pomoći i savetima tokom izvođenja eksperimenta i pisanja ove doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se prof. dr Milanu Matavulju, dr Nebojši Iliću i dr Borisu Pejnu na pomoći i razumevanju tokom uobličavanja ove doktorske disertacije i sugestijama tokom pisanja rada.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Sonji Kaišarević na svesrdnoj pomoći tokom izvođenja eksperimentalnog dela ove disertacije.*

*Od velikog značaja bila mi je saradnja sa Filipom Šibulom u vezi hemijske karakterizacije ekstrakata, na čemu mu se toplo zahvaljujem.*

*Duboku zahvalnost dugujem dr Aleksandri Torbici i Jeleni Tomić na svesrdnoj pomoći tokom realizacije eksperimenta u delu koji se odnosi na detekciju proteinskih frakcija, za razumevanje i podršku.*

*Tanji Tasić i Predragu Ikoniću se zahvaljujem za veliku podršku i razumevanje.*

*Zahvaljujem se Ivanu Milovanoviću i Mioni Belović za svakodnevnu pomoć i razumevanje.*

*Braniki i Jeleni iz laboratorije LECOTOX dugujem veliku zahvalnost.*

*Petru Radiviću i Miroslavu Karamančiću beskrajno hvala za uzorke gljiva i za podršku tokom ovih godina.*

*Dugujem duboku zahvalnost dr Goranu Anačkovu za odanost, divno prijateljstvo, za podršku, razumevanje, pomoć...*

*Mojoj Tanji hvala za divno i iskreno prijateljstvo...*

*Mojoj porodici, beskrajno hvala na ljubavi i podršci.*

---

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE .....	2
2.1. Opšte i specifične karakteristike gljiva.....	2
2.1.1. Morfologija gljiva.....	2
2.1.2. Životni ciklus gljiva.....	3
2.1.2.1. Ishrana gljiva.....	3
2.1.2.2. Fiziologija gljiva.....	4
2.1.2.3. Ekologija gljiva .....	4
2.2. Klasifikacija.....	5
2.2.1. Razdeo Basidiomycota .....	6
2.3. Nutritivni potencijal gljiva.....	7
2.4. Farmakološki potencijal gljiva.....	9
2.5. Oksidativni procesi u ćeliji, antioksidantni sistemi zaštite i molekulske osnove bolesti .....	11
2.5.1. Antioksidativna aktivnost .....	14
2.5.2. Kancerogeneza .....	15
2.5.3. Antimikrobna aktivnost .....	21
2.5.4. Antikancerogena aktivnost.....	30
2.6. Bioaktivna jedinjenja iz gljiva .....	39
2.6.1. Fenolne kiseline.....	39
2.6.2. Flavonoidi .....	44
2.6.3. Askorbinska kiselina .....	45
2.6.4. Tokoferoli .....	45
2.6.5. Karotenoidi.....	46
2.6.6. Terpenoidi .....	46
2.6.7. Steroli .....	47
2.6.8. Proteini .....	48
2.7. Ispitivane vrste gljiva .....	54
2.7.1. <i>Laetiporus sulphureus</i> (Fr.) Murr. ....	54
2.7.2. <i>Meripilus giganteus</i> (Pers.:Pers.) Karst. ....	55
2.7.3. <i>Auricularia auricula judae</i> (Bull.:Fr.)Wettstein.....	56

---

2.7.4.	Fistulina hepatica Schäff.:Fr. ....	57
2.7.5.	Lactarius contraversus (Pers. ex Fr.) .....	58
2.7.6.	Armillaria mellea (Vahl ex Fr.) P. Karst.....	59
2.7.7.	Lycoperdon perlatum Pers. ex Pers.....	60
2.7.8.	Macrolepiota procera (Scop.) Singer.....	61
2.7.9.	Coprinellus disseminatus (Pers.) Gray.....	62
3.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	63
4.	EKSPERIMENTALNI DEO .....	64
4.1.	Sakupljanje gljiva i priprema uzoraka .....	64
4.2.	Postupak priprema ekstrakata.....	65
4.2.1.	Priprema etanolnog, metanolnog i heksanskog ekstrakta.....	65
4.2.2.	Priprema vodenih ekstrakata .....	65
4.2.3.	Priprema frakcija .....	66
4.3.	HPLC-MS/MS detekcija odabranih fenolnih jedinjenja .....	66
4.4.	Detekcija masnih kiselina gasnom hromatografijom .....	67
4.5.	Određivanje ukupnog sadržaja proteina .....	68
4.6.	Karakterizacija proteina "LAB-ON-A-CHIP" kapilarnom elektroforezom.....	68
4.7.	Kvantitativno određivanje mikro- i makro-elemenata atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom - AAS .....	69
4.8.	Spektrofotometrijsko utvrđivanje antioksidantne aktivnosti <i>in vitro</i> .....	69
4.8.1.	Određivanje sadržaja ukupnih fenola .....	69
4.8.2.	Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	70
4.8.3.	Određivanje „skevendžer“ aktivnosti primenom DPPH-testa .....	71
4.8.4.	Neutralizacija OH <sup>•</sup> radikala testom sa dezoksiribozom .....	72
4.8.5.	Određivanje kapaciteta "hvatanja" NO <sup>•</sup> radikala.....	73
4.8.6.	Određivanje kapaciteta "hvatanja" O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> radikala .....	74
4.8.7.	Određivanje redukcionog potencijala primenom FRAP-testa .....	75
4.9.	Određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata gljiva.....	75
4.9.1.	Priprema 70% metanolnog ekstrakta.....	75
4.9.2.	Kulture mikroorganizama.....	76
4.9.3.	Priprema suspenzije mikroorganizama i standardizacija inokuluma .....	76
4.9.4.	Utvrđivanje MIC i MBC/MFC vrednosti .....	77
4.9.5.	Antibiotska osetljivost bakterijskih kultura.....	77
4.10.	Određivanje citotoksičnog efekta.....	78

---

4.10.1. Čelijska kultura .....	78
4.10.2. Pasažiranje kontinualnih čelijskih linija .....	78
4.10.3. Priprema ćelija.....	78
4.10.4. Sađenje ćelija .....	79
4.10.5. Tretman ćelija.....	79
4.10.6. Merenje citotoksičnosti ekstrakta gljiva .....	80
4.10.7. MTT test .....	80
4.10.8. SRB test .....	80
4.11. Statistička analiza .....	81
5. REZULTATI I DISKUSIJA .....	82
5.1. Hemijski sastav ekstrakata gljiva.....	82
5.1.1. Ispitivanje prisustva fenolnih jedinjenja u ekstraktima .....	82
5.1.2. Ispitivanje prisustva flavonoida u ekstraktima.....	84
5.1.3. Ispitivanje ekstrakata primenom HPLC-MS/MS tehnike .....	85
5.1.4. Ispitivanje prisustva masnih kiselina .....	87
5.1.5. Ispitivanje sadržaja proteina .....	92
5.1.6. Ispitivanje prisustva makro- i mikro-elemenata .....	99
5.2 Biološka aktivnost ekstrakata .....	101
5.2.1. Određivanje „skevendžer“ aktivnosti primenom DPPH-testa .....	102
5.2.2. Određivanje kapaciteta "hvatanja" OH• radikala.....	104
5.2.3. Određivanje kapaciteta "hvatanja" NO• radikala.....	105
5.2.4. Određivanje kapaciteta "hvatanja"O <sub>2</sub> • radikala .....	107
5.2.5. Određivanje redukcionog potencijala primenom FRAP-testa .....	108
5.2.6. Antimikrobna aktivnost odabranih vrsta gljiva .....	111
5.2.7. Antibiotička rezistencija ispitivanih sojeva.....	117
5.2.8. Antiproliferativna aktivnost vodenih i etanolnih ekstrakata .....	117
5.2.8.1. <i>Lactarius contraversus</i> .....	118
5.2.8.2. <i>Macrolepiota procera</i> .....	118
5.2.8.3. <i>Lycoperdon perlatum</i> .....	119
5.2.8.4. <i>Coprinellus disseminatus</i> .....	120
5.2.8.5. <i>Auricularia auricula-judae</i> .....	121
5.2.8.6. <i>Meripilus giganteus</i> .....	121
5.2.8.7. <i>Armillaria mellea</i> .....	122
5.2.8.8. <i>Laetiporus sulphureus</i> .....	123

---

---

5.2.8.9. <i>Fistulina hepatica</i> .....	123
5.3. Korelacija ukupnih fenola i flavonoida sa testovima citotoksičnosti .....	131
5.3.1 Analiza ukupne biološke aktivnosti svih analiziranih vrsta gljiva .....	134
6. ZAKLJUČCI .....	137
7. REFERENCE .....	143
8. PRILOZI .....	159
PRILOG 8.1. Fenoli .....	159
PRILOG 8.2. Flavonoidi .....	162
PRILOG 8.3. Parametri za kvantifikaciju standardnih fenolnih jedinjenja .....	165
Priilog 8.4. Frakcije proteina po molekulskim masama .....	166
PRILOG 8.5. Antioksidativni testovi .....	170
PRILOG 8.6. Askorbinska kiselina .....	188
PRILOG 8.7. Antiproliferativna aktivnosti .....	191
Lista skraćenica .....	208

---

## 1. UVOD

Gljive su od početka ljudske civilizacije bile predmet njenog posebnog interesovanja. Poznato je da je njihova jestivost privlačila još stare civilizacije Grka, Rimljana, Egipćana, Kineza i Meksikanaca koji su cenili bogatstvo ukusa i arome gljiva, ali su kroz tradicionalnu upotrebu upoznavali i njihova lekovita svojstva. Pored svoje jestivosti mnoge su se nejestive gljive već nekoliko hiljada godina koristile u medicinske svrhe, što je posebno bilo izraženo u kulturama na Dalekom istoku, kao što su kineska, japanska i korejska (Wasser, 2002). Takođe su i stare civilizacije naroda na zapadu, tačnije sa podneblja Srednje Amerike, kulture Asteka, Maja i Inka, koristile gljive u lečenju, ali i u religijskim ritualima, pridavajući im time posebna svojstva, diveći se njihovim "božanskim" moćima.

Poznato je da danas na svetu ima oko 1,5 miliona vrsta gljiva, a da od toga u prirodi postoji oko 140.000 vrsta makrogljiva. Smatra se da je do sada poznato samo 10% od tog broja. Pri tome se za ljudsku upotrebu može koristiti samo 5%, pa je za tek oko 650 vrsta do danas utvrđeno da poseduju različita medicinska i farmakološka svojstva, što ih može svrstati u medicinske makrogljive (Wasser, 2002; Rai i sar., 2005).

Svedoci smo značajnog tehnološkog razvoja početkom novog milenijuma, kao i niza negativnih posledica sa kojima se susreće savremeni čovek: nedostatak hrane, zagađenje životne sredine i razvoj bolesti savremenog doba, koje nastaju pre svega kao posledica konstantnog izlaganja čoveka faktorima stresa, pri čemu su urbane sredine posebno ugrožene.

Unatoč velikom napretku koji je doživela savremena civilizacija, danas se, početkom 21. veka susrećemo sa porastom učestalosti oboljenja kao što su kancer, kardiovaskularna oboljenja i Alchajmer za koje savremena medicina još uvek nema prava rešenja, a koje odnose veliki broj ljudskih života svakog dana. Upravo zbog toga raste i potreba za hitnim pronalaženjem novih bioaktivnih jedinjenja koja će u budućnosti poslužiti kao supstance koje će imati ulogu u prevenciji i lečenju bolesti savremenog doba. Stoga je danas sve više uočljiva veza između hrane i lekova.

Pojam **nutraceutika** prvi put upotrebljen pre oko 25 godina kako bi se njime opisao jedinstvo hrane i lekova, koje predstavljaju dva ključna činioca ljudskog zdravlja. Stephen Defelice je 1989. godine definisao pojam „nutraceutika“ kao svaku supstancu koja predstavlja hranu ili deo hrane i koja pruža medicinske ili zdravstvene koristi, uključujući prevenciju i tretman same bolesti (DeFelice, 1995; Pandey i sar., 2010).

Upravo pronalaženje novih prirodnih izvora nutraceutika prestavlja imperativ mnogim naučno-istraživačkim timovima širom sveta. Bivajući svesni ogromnog prirodnog resursa novih supstanci sa bioaktivnim svojstvima, kakav predstavljaju gljive, kao i činjenice da je današnji svet suočen sa sve većom potrebom za očuvanjem sopstvenog zdravlja upotrebom proizvoda na prirodnoj bazi, pokušali smo da na temeljima istočnjačkih kultura i njihove tradicije duge nekoliko vekova, damo naš mali doprinos, kroz realizaciju ovog istraživanja pod naslovom „ **Biopotencijal autohtonih gljiva u funkciji nutraceutika**“.



## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Opšte i specifične karakteristike gljiva

U svetu živih bića, gljive (Fungi, Mycota ili Mycotalia) i gljivama slični organizmi (Straminipila gde spadaju vodene plesni – heterokontni zoosporni organizmi i sluzave gljive) jesu eukariotski organizmi, koji se odlikuju jedinstvenom građom, jedinstvenim ćelijskim komponentama i ćelijskom organizacijom (Radnović i sar., 2007). Prisustvo specifičnih ugljenih hidrata trehaloze i manitola, kompleksnost životnih ciklusa (npr. pojava potpunog odsustva polnog razmnožavanja i skraćena dužina diploidne faze), mogućnost rasta na osnovu bespolne reprodukcije, pojava dikariontske faze (koegzistencija dva jedra u ćeliji) i ishrana putem apsorpcije (Karaman, 2009) su karakteristike koje gljive čine drugačijim u odnosu na druge žive organizme i na osnovu kojih su svrstane u posebno carstvo živog sveta sa Whittakerovom klasifikacijom krajem XX veka.

Gljive predstavljaju jednu od najrasprostranjenijih grupa živog sveta na Zemlji, naseljavaju i opstaju čak i u ekstremnim okruženjima, kao što su pustinje ili oblasti sa visokim nivoom jonizujućeg zračenja (Vaupotic i sar., 2008; Dadachova i sar., 2007). Novije procene predviđaju da se broj vrsta gljiva na Zemlji kreće oko 1,5 miliona vrsta; ukupan broj opisanih vrsta je trenutno 100 hiljada, od čega je 14.000 opisanih makrogljiva. Imajući u vidu da se broj makrogljiva procenjuje na 150.000 jasno je da je samo oko 10% makrogljiva danas poznato nauci (Hawksworth, 2001; Cavalier-Smith, 1998; Wasser, 2011).

#### 2.1.1. Morfologija gljiva

Skup vegetativnih ćelija koje ne formiraju tkiva u fiziološkom smislu i nemaju diferencirane organe, naziva se talus ili telo gljive. Talus može biti plazmodijalan, jednoćelijski i micelijski. Gljive pokazuju veliku varijabilnost u pogledu sastava i veličine talusa, počev od sluzavih gljiva i jednoćelijskih mikroskopskih kvasaca, preko višćelijskih plesni do makroskopskih, „viših gljiva” tkz. pečurki.

Micelijalan (filamentozni – nalik na tkivo) talus sačinjavaju izdužene ćelije – hife, organizovane tako da proizvode spore za reprodukciju i diseminaciju (rasprostranjenje). Hife su cevaste tvorevine okružene sa čvrstim ćelijskim zidom od hitina, koje sadrže pokretnu masu protoplazme. Imaju izražen apikalni rast apsorbujući nutrijente iz supstrata. Većina hifa ima poprečne zidove – septe, koje su perforirane i kroz koje cirkulišu i jedra i citoplazma. Hife se ne sastoje od zasebnih ćelija, nego od odeljaka koji međusobno komuniciraju. “Niže gljive” nemaju perforirane septe, već celovite. Septe nisu prisutne kod većine Oomycota i Zygomycota (Radnović i sar., 2007).

Plodno telo upravo predstavlja produkt micelije koja direktno iz supstrata usvaja nutrijente, a osnovna funkcija plodnog tela gljive je da proizvede veliki broj spora koje će se raširiti u spoljašnjoj

sredini (Radnović i sar., 2007). Gljive za reprodukciju koriste spore, specifične ćelije, koje stvaraju direktno na miceliji ili na posebno diferenciranim strukturama - sporoforima.

### 2.1.2. Životni ciklus gljiva

Različite grupe gljiva pokazuju raznovrsne i specifične životne cikluse, smena bespolne haploidne i bespolne - dikarionske faze, sa polnom fazom gde dolazi do spajanja ćelija i jedara uz formiranje diploida, koji ponovo ulazi u redukcionu deobu (mejozu) uz ponovo započinjanje ciklusa bespolnog razmnožavanja. Stvaranje nove generacije kod viših gljiva započinje procesom klijanja spore, pri čemu se formira micelijski konac (primarna micelija), čije ćelije imaju pojedinačni nukleus sa  $n$  brojem hromozoma. U zavisnosti od parametara sredine i specifičnosti vrste primarna micelija osvaja brzo supstrat. U ovom stadijumu micelija je difuzna ili se hife grupišu u tzv. plektenhim. Do reprodukcije dolazi kada se stvore povoljni uslovi u okruženju. Kod bespolne reprodukcije, spore za rasprostranjenje formira primarna micelija ili direktno na miceliji ili na sporoforima. Spajanja micelija komplementarne polarosti je neophodno u slučaju polnog razmnožavanja, što ima za posledicu plazmogamiju i stvaranja sekundarne micelije. Ćelija sa dva nesparena jedra uočavaju se u sekundarnoj miceliji u vreme izduživanja hifa (dikarionska faza). U odgovarajućim uslovima, formiraju se sporokarpi, na kojima se stvaraju fertilne ćelije, askusi ili bazidije. U ovom se stadijumu odvija spajanje polnih ćelija, tj. fuzija jedara i stvaranje  $2n$  hromozoma (veoma kasno u reproduktivnom ciklusu). Slede tri uzastopne deobe posle kojih se  $n$  jedra redistribuišu u bazidiospore od kojih ponovo nastaje primarna micelija, posle oslobađanja (Karaman, 2009). Različite vrste gljiva imaju različit životni vek, neke gljive su jednogodišnje i nestaju odmah pošto završe životni ciklus, ponovo se stvaraju zahvaljujući trajnim sporama, druge su višegodišnje u formi micelije preživljavaju dugo dok ne formiraju sporofore (do nekoliko vekova).

#### 2.1.2.1. Ishrana gljiva

U pogledu ishrane gljive imaju relativno jednostavne osnovne zahteve, koriste organski materijal kao izvor ugljenika, elektrona i energije. Način ishrane apsorpcijom nutrijenata izdvaja ih u zasebno carstvo organizama (klasifikacija Roberta H. Whittaker-a iz 1969. godine), pored biljaka i životinja koji se ishranjuju fotosintezom i ingestijom. Budući da poseduju složen ćelijski zid, gljive ne mogu da usvajaju čestice fagocitozom, nego moraju da apsorbuju jednostavne, rastvorljive nutrijente. Uglavnom se to ostvaruje izlučivanjem ekstracelularnih enzima depolimeraza, koji vrše vanćelijsku digestiju, a zatim se rastvoreni nutrijenti apsorbuju.

Većina gljiva iskorištava ugljene hidrate (prvenstveno glukozu ili maltozu) i azotne veze za sintezu sopstvenih aminokiselina i proteina. Prema izvoru azota, neke vrste sposobne su da opstanu na mineralnom azotu, dok su druge pravi heterotrofi i zahtevaju prisustvo organskog azota. Drugi esencijalni elementi za život gljiva su: kiseonik, fosfor, kalijum, magnezijum, sumpor, mangan, bakar, gvožđe, cink, vitamini. Za život im je neophodna slobodna voda, toplota i svetlost. Gljive jesu aerobni organizmi, a samo su neki kvasci fakultativni anaerobi (Duraković, 2003).

### 2.1.2.2. Fiziologija gljiva

Gljive su veoma prilagodljive na različita staništa, zbog izuzetnog metaboličkog potencijala, a pre svega zbog raznovrsnosti i brojnosti enzimskih reakcija koje se odvijaju u njima. Pored ovih svojstava, mogu da sintetišu različite sekundarne metabolite, među kojima su neki otrovni, a neki lekoviti za čoveka. Makrogljive produkuju brojne sekundarne metabolite koji imaju veliki terapijski značaj, koji nastaju kao intermedijeri primarnog metabolizma a koji se uglavnom klasifikuju na osnovu pet glavnih metaboličkih izvora (Lorenzen i Anke, 1998).

**Sekundarni metaboliti koji potiču direktno iz glukoze** - pokazuju brojne biološke i farmakološke aktivnosti, od kojih je najznačajnija imunomodulatorna i antikancerogena. U ovu grupu se ubrajaju: polisaharidi ( $\beta$ -D-glukan), heteropolisaharidi (glikoproteini) i hranljiva vlakna (hitin).

**Sekundarni metaboliti koji potiču iz šikiminske kiseline** - jedinjenja koja sadrže aromatični prsten, kao što su: strobilurini, odemansini, anisaldehyd, armilarsin, hinoni.

**Sekundarni metaboliti koji nastaju acetat-malonatnim putem** - pokazuju snažno antiviralno delovanje usled interakcije sa omotačem virusa. Primeri jedinjenja ove grupe su: poliacetileni, poliketidi.

**Sekundarni metaboliti koji nastaju u acetat-mevalonatnom putu** - pokazuju antibaktericidnu, antikancerogenu, antimikrobnu, anti-inflamatornu aktivnost i nematocidni efekat. Predstavnici ove grupe metabolita su terpeni (monoterpeni, seskviterpeni), koji su dominantni za Basidiomycotinae.

**Sekundarni metaboliti koji nastaju iz aminokiselina** - pokazuju insekticidnu aktivnost, kao i nematocidni efekat. Ovi metaboliti su peptidne strukture (bovericin, omfalotin, muskarin, ibotenična kiselina) i lektini (GLLs u *Ganoderma lucidum*).

### 2.1.2.3. Ekologija gljiva

Gljive dobro rastu na svim mestima gde postoji organska materija pogodna za razgradnju. Na osnovu načina na koji dolaze do hranljivih materija i neophodne energije, gljive mogu biti:

- **Saprotrofne** - hranljive materije dobijaju iz mrtve organske materije životinjskog ili biljnog porekla ili mikrobijalne biomase.
- **Parazitne** - koriste hranljive organske materije živih biljaka, životinja ili gljiva.
- **Simbiotne** - obrazuju simbioze sa autotrofnim organizmima u mutualističkoj asocijaciji (sa algama u lišajevima ili sa višim biljkama, naročito šumskim drvećem) kao mikorizni partneri.

Prelazni oblici između isključivih parazita i isključivih saprotrofa su fakultativni saprotrofi koji najveći deo života provode na biljnim organima, ali se pod određenim uslovima mogu razvijati i na račun mrtve organske materije i fakultativni paraziti koji obično žive na zemljištu kao saprotrofi, ali

kada dođu u kontakt sa biljkom domaćinom, najčešće preko ozleda, ostvaruju zaraze i dalje se razvijaju kao paraziti.

Lignikolne gljive predstavljaju grupu taksona bogatu vrstama, čija je zajednička osobina da koriste drvenu masu kao supstrat i iz njega crpe sve potrebne materije za život. Ukoliko žive na živom drveću, ponašaju se kao paraziti a ukoliko žive na mrtvom drveće su saprotrofi. Esencijalni elementi za njihov metabolizam su ugljenik, azot, fosfor, kalijum, magnezijum, bakar, gvožđe i cink kojima se snabdevaju direktno iz drveta živeći, odnosno formirajući svoja plodna tela direktno na površini drveta i apsorbujući potrebne materije. Glavni izvori ugljenika su ugljeni hidrati, i to: skrob, celuloza i hemiceluloza (Karadžić, 1992, Dix i Webster, 1995). Lignikolnim gljivama nazivaju se pojedini predstavnici razdela Ascomycota i Basidiomycota čija je zajednička karakteristika da koriste drvenu masu kao supstrat iz koga crpe sve potrebne materije za život (ugljene hidrate: skrob, hemicelulozu, celulozu – kao najvažnije izvore ugljenika, mineralne materije: nitrata, fosfate i hloride, organske kiseline, alkaloida, proteine, vitamine, tanine i dr.), pri čemu izazivaju procese truljenja po tri osnovna principa izazivajući belu, mrku i meku trulež drveta. (Radnović i sar., 2007; Karaman, 2009)

**Gljive meke truleži** - (*Ascomycotina* i *Deuteromycotina*), uzrokuju gubitak mehaničke otpornosti, drvo postaje vlažno i spongiozno. Nalaze se na drvnom materijalu sa visokim sadržajem vode i azota. Ove gljive razlažu celulozu i hemicelulozu, a samo neke delimično razlažu i lignin.

**Gljive bele truleži** - najefikasniji razgrađivači lignina iz razdela *Basidiomycota* (npr. *Agrocybe aegerita*, *Auricularia auricula-judae*, *Meripilus giganteus*, *Armillaria mellea*). Sposobne su za potpunu mineralizaciju, kako lignina, tako i svih ugljenohidratnih komponenata drveta, pa drvo dobija svetliju boju od normalne. Lignin se razgrađuje u oksidativnim procesima usled aktivnost sledećih enzima: *lignin-peroksidaze*, *Mn-zavisne-peroksidaze*,  $H_2O_2$ -produkujućih enzima i *lakaze*.

**Gljive mrke truleži** – razgrađuju celulozu i hemicelulozu, a lignin ostavljaju više-manje netaknut. Drvo potamni i ispuca u vidu naslaganih cigala. Čini ih svega oko 10 % lignikolnih vrsta gljiva i većina su pripadnici razdela *Basidiomycota* (npr. *Laetiporus sulphureus*, *Fistulina hepatica*).

## 2.2. Klasifikacija

Specifične karakteristike i ogroman diverzitet gljiva bili su osnovni razlog za niz nedoumica istraživačke javnosti u pogledu sistematske pripadnosti ovih organizama. Tradicionalna klasifikacija živog sveta bazirana na Whittakerovoj organizaciji razlikuje dva carstva: biljno (*Plantae*) – nepokretne organizme koji uzimaju hranu iz supstrata i životinjsko (*Animalia*) – pokretne organizme koji ingestiraju hranu. Zbog osobina koje se nalaze na prelazu između onih koje karakterišu biljke i onih koje karakterišu životinje gljive predstavljaju veliku misterioznu grupu organizama. Razvoj elektronske mikroskopije, kao i biohemije u periodu od 1945. do 1960. godine doveo je do podele živog sveta na ćelije sa primitivnim jedrom – prokariote i one sa pravim jedrom – eukariote. Whittaker je 1969. godine predložio klasifikaciju živih organizama na pet carstava, prokarioti su bili prihvaćeni kao konstituenti carstva *Monera*, a eukarioti su podeljeni na četiri carstva: *Protista* (protozoe i alge), *Plantae* (biljke), *Animalia* (životinje) i *Fungi* (gljive). Prema ovoj klasifikaciji gljive su svrstane u posebno carstvo prevashodno na osnovu ishrane koja se ostvaruje putem apsorpcije. Nova revolucija u biološkoj klasifikaciji počinje upotrebom molekularnih analiza sedamdesetih godina

prošlog veka; jedan od istaknutih taksonomskih markera je sekvenca DNK koja kodira ribozomalnu RNK (rDNK). rDNK ima nekoliko kodirajućih podjedinica (25S ili 28S, 18S, 5S, 5,8S) različitih dužina i konzervativnosti, a kad se tome dodaju više promjenljivi nekodirajući regioni (ITS, IGS i ETS) jasno je da postoji mogućnost sistematike na gotovo svim taksonomskim nivoima (Guarro i sar., 1999). Pored rDNK u sistematici se koriste i nukleotidne i aminokiselinske sekvence nekih važnih proteina.

Carl Woese komparacijom malih podjedinica rDNK prezentuje tri evolutivno različite grupe organizama koje naziva domeni, dva domena prokariota – Bacteria i Archaea i jedan eukaryota-Eucarya (Woese, 1990). U posljednje tri decenije primena molekularnih filogenetskih studija pruža mogućnosti boljeg razumevanja fungalnog diverziteta, plodna tela gljiva često imaju slične karakteristike pa determinacija vrsta može na osnovu morfoloških karakteristika biti neprecizna. Primena savremenih metoda, molekularnih markera i filogenetskog koncepta vrste može znatno doprineti preciznoj determinaciji vrsta (Čapelja i sar., 2014).

Donedavno su u carstvu Fungi postojala četiri podrazdela Ascomycotina, Basidiomycotina, Deuteromycotina, Mastigomycotina i Zygomycotina, dok je 2001. godine, na osnovu molekularnih analiza, izdvojen još jedan razdeo pored razdela Myxomycota pod imenom Glomeromycota, koje su ranije bile svrstavane u razdeo Zygomycota.

Regnum: Fungi	Regnum: Straminipila	Regnum: Sluzave gljive
Phylum: Chytridiomycota	Oomycota	Plasmodiophorales
Phylum: Zygomycota	Hyphohytridiomycota	Myxomycota
Phylum: Ascomycota	Labyrinthulales	Dictyosteliomycota
Phylum: Basidiomycota	Thraustrochytrales	Acrasimycota
Phylum: Glomeromycota		

Carstvo Straminipila obuhvata veliki broj biljnih patogena koje su po svom životnom stilu veoma slične pravim gljivama.

Gljivama slični organizmi nepoznatog statusa uključuju 4 grupe organizama koje su ranije bile poznate pod nazivom sluzave gljive. Većina njih nema ćelijski zid, vegetativni rast je u obliku ameboidnih ćelija ili protoplazmične mase, pretvarajući se u spore omeđane zidom. Tradicionalno se ova grupa organizama proučavala u sklopu mikologije, iako nema dokaza da su one bliske gljivama (Deacon, 2006).

### 2.2.1. Razdeo Basidiomycota

Ovom razdelu pripada 37% opisanih vrsta gljiva, osnovna karakteristika ovog razdela je septirana i granata micelija. Predstavnici ovog razdela razmnožavaju se najčešće polno, sporonosni organ je bazidiokarp, koji nosi bazidiospore - egzogene spore sa izraštajima (drščicama) – sterigme. Bespolni tip razmnožavanja je redak, odvija se konidijama, oidijama, hlamidiosporama, pupljenjem.

Razdeo Basidiomycota sadrži oko 23.000 opisanih vrsta, oko 10.000 vrsta iz 80 rodova i 550 familija. Ovom razdelu pripadaju jestive i ekonomski značajne vrste: *Agaricus bisporus*, *Cantharellus cibarius*, *Lentinula edodes*, osim toga za 700 vrsta ovog razdela utvrđeno je da poseduju značajne farmakološke aktivnosti (Mizuno, 1995; Wasser, 1995, 2002; Ferreira, 2010).

### 2.3. Nutritivni potencijal gljiva

Tokom čitave ljudske civilizacije, gljive su konzumirane uglavnom zbog dopadljivog i jedinstvenog ukusa (Wani i sar., 2010). Danas su gljive cenjene ne samo zbog dopadljive teksture i ukusa već zbog njihovih hemijskih i nutritivnih karakteristika (Ouzouni i sar., 2009). Pored visokokvalitetnih proteina gljive su dobar izvor hranljivih supstanci: masti, vlakana, fosfora, kalijuma, kalcijuma, gvožđa (Manzi i sar., 2001; Mendil i sar., 2005; Soylak i sar., 2005) i vitamina prevashodno B grupe (tiamin, riboflavin, niacin i ergosterol (provitamin D2)) (Barros i sar., 2008a, b). Osim navedenih jedinjenja gljive su izvor nezasićenih masnih kiselina, koje su bitne i značajne za ishranu i zdravlje, a koje čine najmanje 70% ukupnog sadržaja masnih kiselina gljiva. Različite studije na različitim vrstama gljiva poreklom iz Španije, Grčke, Italije, Portugala, Nigerije, Tajvana, Tanzanije, Turske, Poljske, Meksika, Kine, Indije (Leon-Guzmon i Lopez, 1997; Diez i Alvarez, 2001; Manzi i sar., 2001; Sanmee i sar., 2003; Miles i Chang, 2004; Gbolagade i sar., 2006; Yilmaz i sar., 2006; Ouzouni i sar., 2007; Barros i sar., 2008b; Mshandete i Cuff, 2008; Manjunathan i Kaviyarasan, 2011; Wang i sar., 2014) gljive su opisane kao namirnice bogate vodom, mineralima, proteinima i ugljenim hidratima sa niskim nivoom masti koje ih iz tog razloga čine pogodnim za niskokaloričnu ishranu.

Pored nutritivnog bogatstva, gljive se odlikuju bogatstvom specifične arome i teksture. Budućnost široke upotrebe gljiva bazira se upravo na ekonomski pristupačnoj proizvodnji, značajnoj nutritivnoj vrednosti gljiva i sadržaju medicinski aktivnih materija koje povoljno utiču na ljudski organizam (Barros i sar., 2008b). Među više od dvadeset vrsta gljiva koje se danas uzgajaju u svetu, vrsta *Agaricus bisporus* zauzima vodeće mesto, a potom vrste *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* i *Flammulina velutipes*. Hemijski sastav gljiva određuje njihovu hranljivu vrednost i organoleptičke osobine, a razlikuje se u zavisnosti od vrste gljive, podloge na kojoj se razvija, atmosferskih uslova, starosti i faze sakupljanja (Miles i Chang, 2004).

Sadržaj suve materije (s.m.) kod samoniklih i uzgajanih gljiva je veoma nizak često u rasponu od 80-140 g/kg s.m. Sadržaj suve materije posebno zavisi od starosti gljive, vremena skupljanja, uslova sredine u kojima su se razvile, ali i od karakteristika same vrste (Kalač, 2013).

Proteini su važan sastojak suve materije gljiva. Više od polovine ukupnog azota ulazi u sastav proteina. Sadržaj proteina zavisi od vrste gljiva, od supstrata na kome se razvijaju i vremena sakupljanja. Sadržaj proteina u svežim pečurkama iznosi od 228 i 249 g/kg s.m. na osnovu ispitanih 47 odnosno 30 vrsta (Bauer Petrovska, 2001; Uzun, 2009) odnosno od 19% do 35% u odnosu s. m. (Miles i Chang, 2004). Stoga je jasno da je sadržaj sirovih proteina kod gljiva ispod sadržaja proteina većine životinjskih mesa ali daleko iznad sadržaja proteina većine drugih namirnica uključujući i mleko. Pored vrsta koje se uobičajno koriste u ishrani interesantni su podaci koji govore o sadržaju proteina vrsta kao što su: *Laetiporus sulphureus* (159 g/100g), *Morchella esculenta* (11,5 g/100g), *Coprinus*

*comatus* (11,84 g/100g), *Lycoperdon perlatum* 1,94 g/100g (Petrović i sar., 2014; Heleno, 2013; Stojković i sar., 2013; Barros i sar., 2008a).

Ograničeni su podaci koji se odnose na istraživanja aminokiselina u gljivama, smatra se da sadrže gotovo sve aminokiseline, a raspon ukupnih aminokiselina kreće se od 93,6-230 g/kg, i od 39,7-86,8 g/kg za esencijalne aminokiseline. Osim svih esencijalnih aminokiselina u pečurkama se mogu naći i značajne količine: lizina, alanina, arginina, glicina, histidina, glutaminske kiseline, asparaginske kiseline, prolina i serina (Ayaz i sar., 2011; Kalač, 2013).

Kompozicija i sadržaj proteina i aminokiselina se značajno menja sa procesom prezervacije i kuvanja. Sadržaj proteina tokom sušenja gljiva pri temperaturi od 40°C je skoro stabilan, dok se procesom termičke obrade svežih gljiva sadržaj proteina značajno menja, odnosno smanjuje (Barros i sar., 2007a). Sadržaj arginina, glicina, serina, metionina i treonina se smanjio kod konzerviranih primeraka bukovače *P. ostreatus*, dok je kod zamrznutih uzoraka gljiva, posle 12 meseci ustanovljen značajno manji sadržaj alanina, glutamina, cisteina i tirozina (Jaworska i sar., 2011). Vrednosti nutritivno važnih jedinjenja su generalno manji kod zamrznutih gljiva u odnosu na konzervirane. Pored nutritivnog značaja aminokiseline u gljivama doprinose i ukusu gljiva.

Sadržaj ukupnih lipida (sirove masti) u gljivama je nizak, u rasponu između 20 i 30 g/kg s.m.), *L. perlatum* 0,05 g/100g s.m. (Barros i sar., 2008a), *L. sulphureus* 2,35 g/100g s.m. (Petrović i sar., 2014) odnosno od 1,1% do 8,3% s.m. (Miles i Chang, 2004). Ukupni lipidi gljiva sadrže predstavnike svih klasa lipidnih jedinjenja uključujući: slobodne masne kiseline, monogliceride, digliceride, trigliceride, sterole, sterolne estere i fosfolipide. Desetine masnih kiselina su identifikovane u lipidnim frakcijama gljiva. Međutim, samo linolna kiselina (C18:2c,n-6) i oleinska kiselina (C18:1c,n-9) izrazito prevladavaju, formirajući proporciju od dve trećine i više procenta svih identifikovanih masnih kiselina. Zasićena palmitinska kiselina (C16: 0) je treća po zastupljenosti, ali sa znatno manjim procentom učešća (Kalač, 2009; Pereira i sar., 2011; Vaz sar., 2011; Heleno i sar., 2011; Reis i sar., 2011). Visok udeo nezasićenih masnih kiselina i visok postotak linoleinske kiseline u gljivama jesu značajni faktori u pogledu osobina koje ukazuju da gljive predstavljaju zdravu hranu (Miles i Chang, 2004).

U odnosu na suhu materiju sadržaj ugljenih hidrata je značajan i predstavlja od 50 do 65% sadržaja gljiva (Wani i sar., 2010). Sadržaj ugljenih hidrata najčešće konzumiranih gljiva iznosi za *A. bisporus* 740,0 g/kg s.m., *F. velutipes* 859,9 g/kg s.m., *P. ostreatus* 679,3 g/kg s.m., dok divlje rastuće gljive sadrže manju količinu ugljenih hidrata (Manzi i sar., 2001). Polisaharidi iz gljiva su pre svega glikogen i nesvarljivi oblici, kao što su hranljiva vlakna, celuloza, hitin, manani, glukani, koji su važni za pravilno funkcionisanje digestivnog trakta. Od ugljenih hidrata najviše su zastupljene pentoze (ksiloze, riboze) i heksoze (glukoza, fruktoza, galaktoza, manoza), dominantan je šećerni alkohol manitol, šećerne kiseline, amino-šećeri i hitin (Miles i Chang, 2004).

Gljive sadrže dijetetska vlakna koja pripadaju klasi  $\beta$ -glukana, hitina i heteropolisaharida (pektinske supstance, hemiceluloza, poliuronidi) itd. Visokomolekularne komponente koje se nalaze u određenim namirnicama, a koje se izbacuju iz ljudskog organizma bez prethodne digestije i apsorpcije nazivaju se dijetetska vlakna. Većina aktivnih polisaharida iz gljiva, rastvorljivih i nerastvorljivih u vodi, klasifikuju se kao dijetetska vlakna. Sadržaj dijetetskih vlakana računato na 100 g s.m. kod vrsta *A. bisporus* iznosi 2,0 g, u *P. ostreatus* 4,1 g, odnosno 7,6 g, a kod divlje rastuće vrste, *Armillaria mellea* 27,6%, kod *Pleurotus sp.* i 10,4%, kod *A. bisporus* u odnosu na s.m. (Manzi i saradnici, 2001; Miles i Chang, 2004).

Mineralne komponente gljiva mogu se podeliti na makroelemente i mikroelemente. Makroelementi su: K, Na, Mg, P i S, dok su mikroelementi: Cu, Co, Fe, J, Mn, Mo, Zn i Se. Mikroelementi, mikronutritijenti ili "trace elements", su esencijalni sastojci hrane, neophodni za normalno funkcionisanje organizma, a potrebni su u vrlo malim količinama. Sadržaj makrokonstituenata kao što su: natrijum, kalijum i fosfor je približno konstantan, dok se sadržaj kalcijuma, magnezijuma i sumpora menja u zavisnosti od sastava supstrata na kome se gljiva razvija (Rudawska i Laski, 2005).

Gljive se smatraju značajnim izvorom vitamina, a posebno vitamina B grupe, tiamina (B1) i riboflavina (B2), piridoksina i niacina i askorbinske kiseline (vitamin C). Sadržaj timina kod pojedinih vrsta gljiva kreće se od 0,35 mg/100g s.m. (*Volvariella volvacea*), 1,14 mg/100g s.m. (*A. bisporus*), 1,16-4,80 mg/100g s.m. (*Pleurotus sp*) do 7,8 mg/100g s.m. (*L. edodes*). Sadržaj niacina kod različiti vrsta varira od 54,4mg/100g s.m. (*L. edodes*) do 108,7 mg/100 g s.m. kod vrsta *Pleurotus sp*. dok se sadržaj riboflavina kretao u vrednostima od 1,63 mg/100g s.m. za *V. volvacea* do 50mg/100g s.m. za *A. bisporus* (Miles i Chang, 2004). Pored ovih vitamina u gljivama se mogu naći ergosterol, biotin, fitohinon i tokoferoli (Matilla i sar., 2001; Barros i sar., 2008). Najpotentniji provitamin vitamina A,  $\beta$ -karoten, prisutan je u tragovima u gljivama, u znatno manjoj količini (od 0,07 do 0,60 mg/100g s.m.) u odnosu na biljke (Pereira i sar., 2012). Posebna pažnja poslednjih godina usmerena je na istraživanje prisustva ergosterola u gljivama (provitamin vitamina D2), na osnovu publikovanih rezultata sadržaj ergosterola kreće od 640 i 1770 mg/ kg s.m. (Kalač, 2013) odnosno od 4,0 do 44,0 mg/100g s.m. (Barreira i sar., 2014).

## 2.4. Farmakološki potencijal gljiva

Od drevnih vremena gljive se koriste u narodnoj medicini, o čemu svedoče zapisi Shen Nong iz dinastije Istočni Han u Kini (100-200. godine p.n.e.) koji spominje lekovita svojstva gljive *Ganoderma lucidum*, *Dendropolyporus umbellatus* i *Tremella fuciformis* (Wasser i Weis, 1999; Wasser, 2002). Antičke civilizacije su poznavale medicinska svojstva gljiva, Hipokrat u svojim zapisima (oko 400. godine p.n.e.) navodi upotrebu gljiva o moksi-biljnim oblogama za tretman hroničnih bubrežnih oboljenja. Lekar u Neronovoj vojsci, Pedanije Diskorid je sredinom 1. veka u svom delu „De Materia Medica” opisao gljivu „Agaricon” odnosno *Fomitopsis officinalis* koja se u to vreme koristila kao lek protiv tuberkuloze (Jacobs, 1985). Značajna svojstva gljiva poput lekovitog poznavali su i Rimljani koji su gljive nazivali hranom bogova. U delu „Istorija prirode” Plinije prvi put gljive deli na otrovne i jestive. Gljive su bile inspiracija mnogim umetnicima sveta, naročito u vreme renesanse. U mitologiji mnogih drevnih naroda gljive se smatraju simbolom dugovečnosti. Donedavno najstariji arheološki dokaz upotrebe gljiva predstavlja Tassili slika, otkrivena u kamenim pećinama Alžira, za koju se smatra da potiče još iz perioda od pre 5.000 godina p.n.e. Slika predstavlja najverovatnije šamana, sa pečurkama u rukama, za koje se pretpostavlja da su služile kao halucinogena sredstva tokom religijskih obreda (Samorini, 2001). Još zanimljivih detalja i dokaza o drevnoj upotrebi gljiva otkriva nam pronalazak „Otzi the Iceman” u Italijanskim Alpima devedeseth godina XX veka, mumije za koju se veruje da je je stara oko 5.300 godina. Među stvarima ovog drevnog lovca pronađene su dve drvenaste pečurke iz familije *Polyporaceae* (*Fomes fomentarius* i *Piptoporus betulinus*). Smatra se



da se jedna od njih koristila za paljenje vatre, a da je druga imala lekovita svojstva, odnosno da se koristila za tretman rana, kao i za pripremu čaja za poboljšanje imuniteta (Hobbs, 1995).

Gljive predstavljaju deo tradicije zemalja Istočne Azije, posebno Kine, Japana, Koreje ali i područja na kojima su živeli Sloveni (Wasser, 2002).

Danas su poznata brojna farmakološka svojstva gljiva. Lekovite gljive koriste u borbi protiv kancera u Kini, Rusiji, Japanu, Koreji, SAD i Kanadi. U ruskoj medicini primenjuje se ekstrakt gljive Chaga - *Inonotus obliquus* kao antitumorni lek i diuretik. Moderna istraživanja antitumornog potencijala ekstrakata gljiva vezuju se za radove Ikegawa i sar., koji su 1969. godine objavili jednu od prvih naučnih studija o antitumornom dejstvu supstanci dobijenih iz plodnih tela različitih vrsta gljiva, koja se ispoljavaju kroz posrednu aktivnost domaćina na implantirane ćelije tumora Sarcoma 180 kod životinja (Zaidman i sar., 2005). Nakon publikovanja ovih rezultata ubrzo su napravljeni prvi lekovi poreklom iz gljiva, polisaharidi  $\beta$ -glukani: krestin iz micelijuma gljive *Trametes versicolor*, lentinan iz plodnih tela gljive *Lentinula edodes*, i šizofilan (eng. schizophyllan) iz tečnosti dobijene submerznim gajenjem plodnih tela gljive *Schizophyllum commune*.

Poslednje tri decenije, veliki broj farmakološki aktivnih supstanci poreklom iz makrogljiva je identifikovano. Biološki aktivni polisaharidi su najpoznatije supstance poreklom iz gljiva koje se koriste kao adaptogeni i imunostimulatori. Imunomodulatorno dejstvo polisaharida gljiva ima profilaktički efekat što pripada neinvazivnom obliku lečenja, primer je prevencija metastaze tumora. Polisaharidi gljiva ostvaruju indirektno antitumorni efekat, aktiviranjem različitih odbrambenih imunih odgovora samog organizma, zbog čega su dobili naziv "biološki modulatori odgovora" (Mizuno, 1995; Mizuno i sar., 1995a, b; Mizuno, 1999). Najefikasniji imunostimulatorni polisaharid iz gljiva je lentinan, dobijen iz gljive *Lentinula edodes*. Lentinan stimuliše aktivnost ćelija ubica (NK-natural killers), T-ćelija, B-ćelija i makrofaga (Chihara, 1992), delujući na odbrambeni potencijal domaćina, što ima za posledicu pojačanu odbranu organizma od raznih vrsta kancera i infektivnih bolesti, uključujući i AIDS.

Danas je poznato preko 2.000 lekovitih vrsta gljiva, koje pored imunostimulatornog i antitumornog dejstva imaju i dodatne korisne efekte: lakše podnošenje hirurške intervencije, brži postoperativni tok, redukuju sporedne i neželjene efekte hemioterapije i radioterapije, sprečavaju oštećenja koja izazivaju citostatici i zračenja na ćelijama imunog sistema.

Gljive, posebno predstavnici radela Basidiomycota poseduju značajna farmakološka dejstva:

1. imunomodulatorno,
2. antioksidativno,
3. antikancerogeno,
4. kardiovaskularno,
5. hepatoprotektivno,
6. antimikrobno delovanje.

Bioaktivne molekule prisutne u gljivama su:

1. polisaharidi velike molekulske mase,
2. polisaharidno-proteinski kompleksi,
3. glikoproteini,

4. imunomodulatorni proteini,
5. triterpenoidi,
6. antioksidativne komponente,
7. određeni mikroelementi,
8. druge specifične komponente gljiva.

## 2.5. Oksidativni procesi u ćeliji, antioksidantni sistemi zaštite i molekulske osnove bolesti

Kod svih aerobnih organizama kiseonik je esencijalan za preživljavanje, međutim u slučaju neuravnoteženog metabolisanja kiseonika, a zahvaljujući svojoj visokoj reaktivnosti koja je posledica njegove biradikalne strukture on postaje toksičan po aeroban organizam (Gutteridge i Halliwell, 2000).

Najveći deo ATP kod sisara se sintetiše u mitohondrijalnom elektron-transportnom sistemu, pri čemu dolazi do kontrolisane četvoroelektronske redukcije  $O_2$  do  $H_2O$  na enzimu citohrom-oksidazi. Kada dođe do redukcije sa manje od 4 elektrona (što se dešava sa 3–5 %  $O_2$ ) dolazi do stvaranja različitih reaktivnih kiseoničnih vrsta, tj oblika kiseonika (ROS, engl. reactive oxygen species), koji mogu biti štetni po ćeliju (Morishita i Ohnishi, 2001).

Osim nepotpune redukcije kiseonika u elektron-transportnom sistemu, slobodni radikali i drugi ROS mogu se generisati i drugim enzimskim i neenzimskim mehanizmima, uključujući:

- toksične ksenobiotike,
- jonizujuće zračenje (usled homolitičkog raskidanja O–H veze u vodi i drugih veza),
- imuni odgovor (sinteza  $O_2^-$ , HOCl i NO od strane fagocita),
- inflamatorne procese,
- jone prelaznih metala,
- aktivnost redoks-enzima (ksantin-oksidade, NADPH oksidade),
- metabolizam membranskih lipida itd.

Jedan od glavnih izvora nastanka slobodnih radikala predstavlja citohrom P450-zavisni enzimi, uključeni u jednoelektronske redoks reakcije. Indukcija ovih enzima pod dejstvom ksenobiotika (alkohol, lekovi, toksini) povećava verovatnoću slučajnog generisanja i oslobađanja ROS.

Najznačajniji činiooci ROS obuhvataju radikalne vrste, kao što su:

- superoksid-anjon ( $O_2^{\bullet-}$ ),
- hidroksiradikal ( $\bullet OH$ ),
- peroksi-radikale ( $ROO\bullet$ ) i
- alkoksi-radikale ( $RO\bullet$ ),
- kao i neradikalne vrste –vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ),
- hipohloritnu kiselinu (HOCl),
- singlet-kiseonik ( $O_2$ ) i
- ozon ( $O_3$ ).

Najpotentniji je hidroksi-radikal, koji je sposoban da inicira lipidnu peroksidaciju i direktno se dodaje, tj. adira na druga jedinjenja, izazivajući oštećenja dezoksiribonukleinske kiseline, razarajući purinske i pirimidinske baze i dezoksiriboze (Halliwell i Gutteridge, 1990).

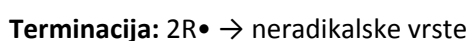
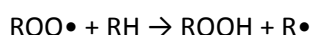
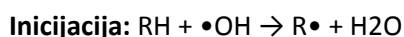
Superoksid-anjon je takođe veoma reaktivan, ali mu je radijus dejstva zbog slabe liposolubilnosti ograničen (Ferreira i sar., 2009).

Vodonik-peroksid ne ispoljava samostalno snažna oksidaciona svojstva, međutim pod dejstvom jona prelaznih metala ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ) generiše visokoreaktivni  $\bullet\text{OH}$ . Zbog liposolubilnosti, on lako difunduje kroz biološke membrane i prodire do ćelijskih ultrastruktura bogatih prelaznim metalima, kao što su mitohondrije (Halliwell i Gutteridge, 1990).

Pored reaktivnih kiseoničnih vrsta, za žive organizme su veoma toksični i reaktivni oblici azota (RNS, RNOS, engl. reactive nitrogen species). U reakciji azot(II)-oksida (generisanog u većim količinama od strane NO-sintaze u toku inflamatornih procesa), sa superoksidom nastaje peroksinitritni anjon ( $\text{ONOO}^-$ ), visokoreaktivna čestica koja lako reaguje sa biomolekulima i dovodi do njihovog oštećenja (oksidacije tiola i tioetara, nitrovanja i hidrosilacije aromatičnih jedinjenja uključujući aminokiseline i azotne baze, raskidanja lanaca DNK itd. (Carr i sar., 2000; Armstrong, 2002).

Ova grupa jedinjenja uključena je u razvoj neurodegenerativnih bolesti (npr. Parkinsonova bolest) i hroničnih inflamatornih oboljenja (npr. reumatoidni artritis). ROS i RNS dovode do oštećenja ćelijskih lipida, proteina, ugljenih hidrata i DNK, sa posledicama koje mogu varirati od smrti ćelije do neoplazija (Halliwell i Gutteridge, 2007) Dejstvo ROS na DNK obuhvata promene u azotnim bazama i raskidanje polinukleotidnih lanaca (Halliwell i Gutteridge, 1990). Uloga ROS je dokazana u preko 100 oboljenja ili kao primarni uzrok bolesti ili kao faktor koji dovodi do komplikacija, uključujući kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (npr. arteroskleroza, Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest, Daunov sindrom), multipla skleroza, dijabetes, akutna renalna insuficijencija, kao i u procesu starenja (Morishita i Ohnishi, 2001; Gutteridge i Halliwell, 2010; Halliwell, 2012).

Jedan od najčešćih štetnih procesa se ostvaruje kroz proces lipidne peroksidacije, odnosno slobodno radikalne oksidacije polinezasićenih masnih kiselina. Reakcija započinje usvajanjem protona sa molekula lipida, npr. pod dejstvom  $\bullet\text{OH}$ , pri čemu nastaju slobodni ugljenik-centrirani radikali sa konjugovanim dvostrukim vezama. Slobodni kiseonik može reagovati sa ovakvim radikalima, gradeći peroksi-radikale koji dalje mogu reagovati sa drugim molekulima polinezasićenih masnih kiselina:



U ovako formiranoj lančanoj reakciji, u slučaju zgusnutih bioloških membrana, dolazi do oštećenja velikog broja molekula lipida (Morishita i Ohnishi, 2001, Ferreira i sar., 2009). Pored narušavanja strukture i funkcije membrane, što u slučaju mitohondrijalne membrane može dovesti do dalje produkcije slobodnih radikala, aldehidi nastali u reakciji mogu dovesti do unakrsnog povezivanja molekula proteina. Proteini, aminokiseline prolin, histidin, arginin, cistein i metionin posebno su podložne napadu  $\bullet\text{OH}$  i oksidativnim oštećenjima, usled kojih dolazi do fragmentacija ili unakrsnog povezivanja, što dovodi do gubitka njihove funkcije.

Kod zdravih aerobnih organizama, produkcija slobodnih kiseoničnih radikalskih vrsta je u stalnoj ravnoteži sa antioksidantnim odbrambenim sistemom. Iako slobodni radikali imaju značajnu ulogu u nizu fizioloških procesa, poremećaj balansa između ovih reaktivnih vrsta i antioksidantnog sistema može da dovede do ozbiljnog narušavanja normalne homeostaze ćelije. Naime, narušavanje oksido-reduktivne ravnoteže usled povišenog nivoa slobodnih radikala, uz visok stepen njihove neselektivne reaktivnosti i nestabilnosti, čiji uzrok su nespareni elektroni, dovodi do stanja oksidativnog stresa. Kao posledica oksidativnog stresa javljaju se tzv. oksidativna oštećenja, koja se izražavaju kroz različita patološka stanja.

Kao posledica stalne izloženosti ovim visoko reaktivnim oksidansima koji mogu dovesti do ozbiljnih oštećenja tkiva, sam organizam razvio je sistem zaštite pomoću sposobnosti njihove neutralizacije.

Mehanizmi zaštite obuhvataju sledeće procese:

- kompartmentizaciju proizvodnje slobodnih radikala,
- postojanje zaštitnih enzima (npr. superoksid-dizmutaza koja razara  $\text{O}_2^-$ ),
- endogene i egzogene antioksidanse (tokoferoli, askorbinska kiselina, karotenoidi, melatonin, urat itd),
- vezivanje metalnih jona (npr. vezivanje Fe u kompleks sa feritinom), i
- reparacione procese.

Lokalizacija različitih zaštitnih sistema u ćeliji odgovara tipu i količini ROS koje se generišu u datoj ćelijskoj strukturi. Superoksid dizmutaza (SOD) kao enzim u primarnoj odbrani sistema, prisutna je u mitohondrijama, citosolu i ekstracelularnom prostoru. Katalaza, enzim čija je funkcija uklanjanje  $\text{H}_2\text{O}_2$ , prvenstveno se nalazi u peroksizomima, dok enzimski sistem glutation/glutation peroksidaza/glutation reduktaza ima funkciju uklanjanja  $\text{H}_2\text{O}_2$  formiranog van peroksizoma i očuvanja integriteta bioloških membrana, prisutan je u citosolu i mitohondrijama (Bogdanović, 2007).

U savremenom svetu, endogeni protektivni sistemi mogu biti nedovoljni za odbranu organizma od stresa (jonizujuće zračenje, pušenje, ksenobiotici, lekovi itd.) kome je organizam izložen, zbog čega veliku popularnost stiču egzogeni antioksidansi prirodnog porekla.

Najpoznatiji egzogeni antioksidansi su fenolna jedinjenja, naročito biljni polifenoli – fenolne kiseline i flavonoidi. Zahvaljujući sposobnosti doniranja atoma vodonika u stanju su da neutrališu nepoželjne radikalske vrste u organizmu, pri čemu sami prelaze u rezonantno stabilizovanu, mnogo inertniju radikalsku formu. Neka od ovih jedinjenja deluju i preventivno, putem kompleksiranja jona prelaznih metala (Frankel i Meyer, 2000).

### 2.5.1. Antioksidativna aktivnost

Antioksidansi su supstance koje u koncentracijama nižim od koncentracije supstrata lako podležu oksidaciji, odnosno značajno inhibiraju ili potpuno sprečavaju oksidaciju supstrata (Halliwell, 2006). Pored navedene definicije često se u literaturi navodi da je antioksidans svaki molekul koji se sam oksiduje i na taj način štiti od oksidativnih oštećenja ćelije i tkiva u organizmu ili osetljive komponente u prehrambenim proizvodima (Ferreira i sar., 2009).

Antioksidansi se mogu klasifikovati na osnovu porekla, hemijske prirode, rastvorljivosti u vodi i na osnovu mehanizma delovanja.

#### **Prema poreklu i hemijskoj prirodi antioksidansi mogu biti:**

Prirodni (askorbinska kiselina, tokoferoli, karotenoidi, fenoli i flavonoidi)

Sintetski (butilovani hidroksianizol, galati itd.)

#### **Prema hemijskoj prirodi molekuli antioksidanasa se dele na:**

Enzimske antioksidanse (superoksid dizmutaza, katalaza, glutation peroksidaza itd.) i

Neenzimske antioksidanse (albumin, bilirubin, vitamin C, flavonoidi itd.).

#### **Prema rastvorljivosti molekuli antioksidanasa se dele na:**

Antioksidanse rastvorljive u vodi (vitamin C, albumin, bilirubin itd.) i

Antioksidanse rastvorljive u mastima (vitamin E, karotenoidi, koenzim Q10 itd.).

#### **Prema mehanizmu delovanja antioksidansi se dele na:**

Primarne antioksidanse (butilovani hidroksianizol, galati, flavonoidi, vitamin E, fenolna jedinjenja itd.)

Sekundarne ili preventivne antioksidanse (limunska kiselina, askorbinska kiselina, sumporna jedinjenja, selen, fosfolipidi, karotenoidi, transferin, ceruloplazmin itd.)

Sinergiste (askorbinska kiselina, sulfiti,  $\beta$ -karoten, limunska kiselina, etilen-diamintetra-sirćetna kiselina (EDTA), fosfati itd.)

#### **Antioksidansi mogu biti sintetisani *in vivo* ili uneti putem hrane, uopšteno mogu se podeliti na:**

Antioksidanski enzimi, koji katalički uklanjaju reaktivne vrste (ROS, RNS, RCS) npr. superoksid dizmutaza (SOD), superoksid reduktaza, katalaza i peroksidaze.

Proteini koji utiču na smanjene formiranja reaktivnih vrsta, koji redukuju dostupnost jona koji imaju prooksidativno dejstvo (prelazni elementi Fe, Cu, Mn) npr. transferin, ceruloplazmin, albumin.

Antioksidansi koji poseduju „skevindžer“ aktivnost, npr. karotenoidi, fenoli, flavonoidi, terpenoidi.

Antioksidansi koji preferencijalno oksiduju, kako bi sačuvali važne biomolekule, npr.  $\alpha$ -tokoferol, bilirubin, askorbat, urat, albumin, plazmalogeni.

Kada se slobodni radikali formiraju *in vivo*, uloga različitih antioksidanasa zavisiće od prirode, mesta i načina generisanja reaktivne vrste, kao i od molekula koji može biti oštećen.

U toku svoje evolucije, aerobni organizmi su razvili mehanizam odgovora na oksidativno oštećenje posredovano reaktivnim vrstama kiseonika (ROS) koji mogu nastati u samoj ćeliji ili koji mogu biti poreklom iz spoljnih izvora. U ovakvim uslovima, antioksidantni zaštitni sistem odbrane, ROS i čitav redoks sistem predstavljaju bazu fizioloških procesa organizma (ćelijska proliferacija, diferencijacija, prenos signala, regulacija metabolizma i međućelijska komunikacija), citoprotektivni mehanizam (inflamacija, odbrana od mikroorganizama), ali i patofiziološki fenomen (starenje, kancerogeneza, apoptoza, nekroza, efektivno i toksično delovanje lekova). Pored navedenih endogenih mehanizama antioksidantsne zaštite, antioksidantsna zaštita može da bude egzogenog karaktera (antioksidansi agenasa unetih hranom). Ishrana koncipirana na konzumiranju namirnica bogatih snažnim antioksidantsnim agensima, poput askorbinske kiseline, vitamina E, karotenoida ili biljnih fenola, koji smanjuju nivo slobodno radikalskih vrsta, može da utiče na prevenciju, ali i terapijski da deluje na bolesti povezane sa oksidativnim stresom. Zahvaljujući svojstvima koja imaju antioksidansi prirodnog porekla, identifikacija novih, kao i iznalaženje novih izvora ovih jedinjenja predstavlja vrlo aktuelan problem.

Istraživanja ukazuju da gljive predstavljaju vrlo značajne izvore antioksidantnih komponenti. Vrste kao što su *Agaricus bisporus*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus*, *Phellinus linteus*, *Ganoderma lucidum* i *Inonotus obliquus* imaju značajnu antioksidantnu aktivnost i sposobnost hvatanja slobodnih radikala. Antioksidantsna aktivnost gljiva dovodi se uglavnom u vezu sa sadržajem fenolnih jedinjenja u njihovim ekstraktima, tokoferola, askorbinske kiseline i karotenoida. Više studija vrsta poreklom iz Finske, Indije, Koreje, Poljske, Portugala, Tajvana, Turske i Srbije ukazuju na značaj ovih jedinjenja u odnosu na antioksidantsnu aktivnost (Cheung i sar., 2003; Puttaraju i sar., 2006; Ferreira i sar., 2009; Karaman i sar., 2009). Poslednje dve decenije, intenzivirana su istraživanja antioksidantsnog potencijala različitih vrsta gljiva i njihovih ekstrakata. U Tabeli 2.1 prikazani su kvantifikovani antioksidansi u različitim vrstama gljiva različitog geografskog porekla.

## 2.5.2. Kancerogeneza

Pod kancerom, malignom neoplazmom, podrazumevaju se oboljenja za koja je karakteristična nekontrolisana deoba ćelija uz odsustvo apoptoze, invazivnost, prodiranje u okolna tkiva i njihovo uništavanje, i ponekad, metastaza, širenje po organizmu putem krvotoka i limfotoka, formiranje sekundarnih tumora (Weinberg, 1996).

Sam proces transformacije normalne ćelije u ćeliju tumora (kancerogeneza ili onkogeneza) je proces od više faza. Prva faza, inicijacija, dešava se usled promena na samom genomu ćelije (anomalija). Potreban je veći broj mutacija da bi se normalna ćelija transformisala u ćeliju kancera, što obično zahteva duži vremenski period. U fazi promocije, oštećena ćelija se deli, formirajući premaligni tumor. Pod dejstvom različitih faktora tumor prelazi u poslednju, ireverzibilnu fazu – progresiju. Dolazi do produkcije ćelija-klonova sa povećanim proliferativnim kapacitetom, invazivnošću i sposobnošću metastaziranja (Yuspa, 2000; Yokota, 2000). Postepeno dolazi do morfoloških promena u tkivu, odnosno stvaranja lezija. Kancer nastaje kao posledica anomalija u

genetskom materijalu (tačnije, delovima genoma zaduženim za kontrolu rasta i diferencijacije) jedne ćelije, usled interakcija sa endogenim ili egzogenim faktorima (Cooper, 1992).

Endogeni faktori obuhvataju genetske, hormonalne i imunološke faktore, kao i hemijske kancerogene, nastale normalnim metaboličkim procesima, reaktivni oblici kiseonika i azota (Yuspa, 2000), dok egzogeni predstavljaju uticaj agenasa iz okoline (fizički kancerogeni, kao što su UV i jonizujuće zračenje, hemijski kancerogeni, uključujući PAH-ove (policiklične aromatične ugljovodonike), mikotoksine, jone nekih teških metala i sl.. Biološki kancerogeni, tj. određeni virusi, bakterije i paraziti takođe utiču na genetski materijal. Rizik od pojave kancera značajno povećavaju faktori koji stimulišu deobu odnosno proliferaciju ćelija, zbog slučajnih mutacija koje se mogu javiti prilikom replikacije DNK. Primeri su steroidni hormoni (značajni kod hormon-zavisnih tumora) i sintetička jedinjenja kao što je saharin (Henderson i Feigelson, 2000). Genetske anomalije, odgovorne za kancerogenezu mogu obuhvatiti konverziju proto-onkogeno u onkogen, inhibiciju/brisanje tumor-supresorskih gena, inhibiciju gena koji regulišu apoptozu, aktivaciju ekspresije telomeraza itd. (Cooper, 1992; Ferreira i sar., 2010).

Proto-onkogeni su normalni geni koji pod određenim uslovima mogu preći u tumor-indukujući onkogen. Proto-onkogeni, kojih je poznato oko 100, često imaju ulogu u transdukciji signala – kodiraju faktore rasta, receptorske tirozin kinaze, regulatorne GTP-aze, transkripcione faktore itd. Neki od tipičnih primera su:

- Ras (najčešći je onkogen koji kodira GTP-aze; aktivacija dovodi do rasta, diferencijacije i preživljavanja ćelije),
- Wnt (ima ulogu u embriogenezi i morfološkom razvoju organizma),
- Myc (reguliše ekspresiju brojnih gena) i
- Trk (utiču na funkciju, preživljavanje i diferencijaciju neurona).

Proteini kodirani tumor-supresorskim genima (anti-onkogenima) imaju funkciju supresora metastaze (učestvuju u adheziji ćelija i sprečavaju njihovu disperziju), represije gena zaduženih za produženje ćelijskog ciklusa, blokiranja ćelijskog ciklusa u slučaju detektovanog oštećenja DNK, sve dok se DNK ne reparira, ili iniciranja apoptoze ukoliko je reparacija DNK neizvodljiva (Sherr, 2004). Ukoliko se javi mutacija kod nekog od ovih gena, tako da dođe do smanjenja ili gubitka aktivnosti, inhibirana je reparacija DNK, oštećenja se akumuliraju i povećava se verovatnoća nekontrolisane deobe ćelije.

Većina malignih ćelija ima sposobnost ekspresije telomeraze, enzima koji produžava telomere na krajevima DNK lanaca. Kod normalnih ćelija, prilikom svake mitoze ireverzibilno se gubi deo telomera, čime se efektivno ograničava maksimalan broj deoba, a u cilju sprečavanja nakupljanja prevelikog broja mutacija. Zahvaljujući telomeraznoj aktivnosti, ćelije kancera konstantno regenerišu telomere i time neograničeno produžavaju svoj život. Pod normalnim uslovima, IL-2 aktivirane citotoksične ćelije, NK (eng. natural killer) ćelije i makrofagi, u stanju su da prepoznaju i unište ćelije kancera. Međutim, ćelije kancera mogu se putem lučenja imunosupresorskih supstanci zaštititi od imunog sistema domaćina. Utvrđeno je da mnogi tumori luče PGE<sub>2</sub>, koji inhibira lučenje citokina (uključujući IL-2) iz T-helper leukocita, ekspresiju IL-2 receptora u T-ćelijama, prezentaciju antigena, produkciju citokina i citotoksičnog NO u makrofagima, i citotoksičnost NK ćelija. Pretpostavlja se da dolazi do lučenja i drugih signalnih molekula – IL-1, TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), GM-CSF (granulocyte/monocyte colonystimulating factor), TGF- $\beta$  i IFN $\gamma$  – koji dovode do aktiviranja imunosupresorskih mehanizama (Cooper, 1992).

Jedan od ograničavajućih faktora rasta tumora je apoptoza. Apoptoza predstavlja programiranu ćelijsku smrt, koja se (za razliku od nekroze) odvija uz aktivno učešće ćelija koja umire i strogu genetsku kontrolu, u cilju regulacije broja ćelija i formiranja tkiva, kao i uklanjanja oštećenih ili defektnih ćelija (Lowe i Lin, 2000; Sherr, 2004). Odgovarajućim signalnim putevima (internim ili eksternim, preko TNF- $\alpha$ , FasL i sl.) aktiviraju se kaspaze (cistein-aspartat proteaze), koje razgrađuju niz proteina, što dalje dovodi do razaranja ćelijskih struktura i odgovarajućih morfoloških promena (uključujući raspad citoskeleta, kondenzaciju i raspad hromatina, deformacije plazmatske membrane). Na kraju, ćelija biva razbijena na više vezikula koje se uklanjaju fagocitozom – eferocitozom. Ceo proces odvija se bez inflamatornog odgovora (makrofagi u ovom slučaju ne luče pro-inflamatorne medijatore), ili oštećenja okolnog tkiva (ćelijski sadržaj, uključujući i proteolitičke enzime, ostaje okružen membranom) (Cooper, 1992). Ovaj proces u ćelijama kancera može započeti usled iscrpljenja faktora rasta ili preživljavanja, hipoksije, gubitka interakcija sa ekstracelularnim matriksom, defekata u DNK, grešaka u signalnim putevima i sl. Ovim mehanizmom, brzina rasta tumora je <5 % od brzine očekivane na osnovu kinetike proliferacije ćelija. Potvrđeno je da je frekvencija apoptoze povišena u spontano povlačećim tumorima, kao i tumorima tretiranim citotoksičnim agensima. Međutim, neke tumore karakteriše povišena ekspresija zaštitnih proteina, kao što su Bcl-2 (blokira apoptotički signal), DcR3 (decoy receptor 3, vezuje FasL čime sprečava njegovu interakciju sa Fas receptorom i indukciju apoptoze) i FasL (izaziva smrt citotoksičnih T ćelija koje pokušaju da unište tumor), ili promene u proteinima zaduženim za iniciranje apoptoze, kao što je p53 (aktivira se u slučaju nepopravljivih oštećenja DNK). Zahvaljujući činjenici da ćelije kancera zadržavaju apoptotički mehanizam očuvanim, geni i proteini koji iniciraju i kontrolišu apoptozu predstavljaju potencijalne mete dejstva antikancer lekova. Ovi lekovi mogu inhibirati hiperaktivirane signale ćelijskog preživljavanja (kao što su Bcl-2, NF- $\kappa$ B i sl), regenerisati proapoptotičku aktivnost (p53), ciljati pro-apoptotičke receptore inaktivne kod normalnih ćelija ili aktivirati kaspaze (Lowe i Lin, 2000). Hemoterapija kancera podrazumeva primenu jedinjenja, prirodnog ili sintetičkog porekla, koja usporavaju, zaustavljaju rast ćelija kancera ili dovode do njihove smrti. Primenu hemoterapeutskih agenasa u velikoj meri ograničava njihova toksičnost prema zdravim ćelijama; jedino je tolerancija prema jedinjenjima baziranim na hormonskoj aktivnosti visoka. Dalje, utvrđeno je da je većina humanih malignih tumora hemorezistentna. Zbog svega navedenog, potraga za hemoterapeuticima niske toksičnosti i širokog spektra dejstva još uvek je u toku (Ferreira i sar., 2010). Velika većina antikancer jedinjenja predstavljaju primarne i sekundarne biomolekule, bilo u nativnoj formi, bilo strukturno modifikovane, uključujući polifenolna jedinjenja (antioksidansi, fitoestrogeni, inhibitori enzima faze 2, COX i ornitin dekarboksilaze, induceri diferencijacije), steroide (fitoestrogeni, inhibitori enzima faze 2), seskvi- i diterpene (induceri diferencijacije, inhibitori ornitin dekarboksilaze), polisaharide (indukuju imuni odgovor domaćina preko T-ćelija, posredovana kroz timus- zavisne imune odgovore)(Wasser, 2002).



Tabela 2.1. Pregled kvantifikovanih antioksidanasa u različitim vrstama gljiva

Vrsta gljive	Fenolne komponente	Tokoferoli	Askorbinska kiselina	Karotenoidi	Likopen	Zemlja porekla	Referenca
<i>Amanita porphyria</i>		245,58 <sup>d</sup>	211,17 <sup>d</sup>	0,13 <sup>d</sup>	0,01 <sup>d</sup>		Reis i sar., 2011
<i>Amanita crocea</i>	22.07 <sup>d</sup>	162.19 <sup>d</sup>			0.23 <sup>d</sup>		Leal i sar.,2013
<i>Amanita mairei</i>	5.94 <sup>d</sup>	58.59 <sup>d</sup>			0.11 <sup>d</sup>		Leal i sar.,2013
<i>Agaricus arvensis</i>	0,17 <sup>a</sup>	1,22 X 10 <sup>-3 a</sup>	0,02 <sup>c</sup>	8,52 X 10 <sup>-3c</sup>		Portugal	Barros i sar., 2008;
<i>Agaricus bisporus (white)</i>	4,32 X 10 <sup>-3 a</sup>		0,17 <sup>a</sup>			Finska	Mattila i sar., 2001;
<i>Agaricus bisporus (brown)</i>	4.69 X 10 <sup>-3 a</sup>		0.21 <sup>a</sup>			Finska	Mattila i sar., 2001;
<i>Agrocybe cylindracea</i>		5.27 <sup>c</sup>				Tajvan	Tsai i sar., 2007;
<i>Amanita caesarea</i>				2.07 <sup>a</sup>		Portugal	Valentao i sar., 2005;
<i>Auricularia mesenterica</i>		9.45 <sup>c</sup>	1.63 <sup>c</sup>			Tajvan	Mau i sar.,2001;
<i>Auricularia polytricha</i>	3.17 <sup>c</sup>					India	Puttaraju i sar., 2006;
<i>Auricularia polytricha</i>		23.61 <sup>c</sup>	3.28 <sup>c</sup>			Taiwan	Puttaraju i sar., 2006;
<i>Boletus badius</i>		8.80 <sup>c</sup>				Turska	Elmastas i sar., 2007;
<i>Boletus edulis</i>	10.19 <sup>c</sup>					Indija	Puttaraju i sar., 2006;
<i>Boletus edulis</i>		3.30X 10 <sup>-4a</sup>		2.73 X 10 <sup>-3c</sup>		Portugal	Barros i sar., 2008;
<i>Boletus edulis</i>		6.18 <sup>c</sup>				Taiwan	Tsai i sar., 2007;
<i>Boletus armeniacus</i>		0.07 <sup>d</sup>		0,15 <sup>d</sup>			Leal i sar.,2013
<i>Boletus poliporus</i>	0.31 <sup>d</sup>	28.04 <sup>d</sup>			0.04 <sup>d</sup>		Leal i sar.,2013
<i>Calocybe gambosa</i>		4.00 X 10 <sup>-4a</sup>	0.40 <sup>c</sup>	6.41 X10 <sup>-3c</sup>		Portugal	Barros i sar., 2008;
<i>Calvatia gigantea</i>			0.15 <sup>a</sup>			Indija	Agrahar-Murugkar i Subbulakshmi, 2005;
<i>Cantharellus cibarius</i>	2.00 <sup>c</sup>	3.00 X 10 <sup>-5a</sup>	0.42 <sup>a</sup>			Indija	Puttaraju i sar., 2006; Agrahar-Murugkar i Subbulakshmi, 2005;
<i>Cantharellus cibarius</i>	7.80 X 10 <sup>-3-2.54 X10-2 a</sup>	1.50 X 10 <sup>-4a</sup>	0.48 <sup>c</sup>	0.01 <sup>c</sup>		Portugal	[50,85,88] Mau i sar., 2002;
<i>Cantherallus clavatus</i>	13.22 <sup>c</sup>					Indija	Puttaraju i sar., 2006;
<i>Clitocybe alexandri</i>		3.55 <sup>e</sup>				Portugal	Heleno i sar., 2010;
<i>Clitocybe gibba</i>		0.22 <sup>e</sup>	19.47 <sup>e</sup>			Portugal	Heleno i sar., 2010;
<i>Collybia fusipes</i>		7.75 <sup>e</sup>	278,15 <sup>e</sup>	0,24 <sup>e</sup>		Portugal	Reis i sar., 2011

<i>Coprinus comatus</i>	45.01 <sup>f</sup>	Srbija	Stojković i sar., 2013;
<i>Coprinus comatus</i>	588.24 <sup>f</sup>	Portugal	Stojković i sar., 2013;
<i>Fistulina hepatica</i>	0.37, 0.55 <sup>a</sup>	Portugal	Heleno i sar., 2010;
	2.26 <sup>f</sup>		
<i>Flammulina velutipes</i>	0.17 <sup>a</sup>	Koreja	Kim i sar., 2008;
<i>Flammulina velutipes</i>	0,06 <sup>d</sup>	Portugal	Pereira i sar., 2012
<i>Fomitopsis pinicola</i>	125,25 <sup>f</sup>	Portugal	Reis i sar., 2011
<i>Hebeloma sinapizans</i>	71,62 <sup>f</sup>	Portugal	Reis i sar., 2011
<i>Ganoderma lucidum</i>	0.16a	Korea	Kim i sar., 2008;
<i>Grifola frondosa</i>	0.05, 0.11 <sup>c</sup> 0.05,	Tajvan	Mau i sar., 2004
<i>Lactarius deliciosus</i>	7.32 <sup>c</sup>	Indija	Puttaraju i sar., 2006;
<i>Lactarius deliciosus</i> ( <i>nepečena</i> )	10,50 <sup>a</sup>	Turska	Öztürk i sar., 2014;
<i>Lactarius deliciosus</i> ( <i>pečena</i> )	3.40 <sup>a</sup>	Turska	Öztürk i sar., 2014.
<i>Lactarius deliciosus</i>	0.02 <sup>a</sup>	Portugal	Barros i sar., 2007; Barros i sar., 2008; Valentao i sar., 2005;
<i>Lactarius piperatus</i>		Portugal	Barros i sar., 2007;
<i>Lactarius quieticolor</i>		Indija	Agrahar-Murugkar i Subbulakshmi, 2005;
<i>Laccaria laccata</i>	8.04 <sup>e</sup>	Portugal	Heleno i sar., 2010;
<i>Lentinus edodes</i>	0.01 <sup>a</sup>	Finska	Mattila i sar., 2001;
<i>Lentinus edodes</i>	0.03 <sup>a</sup>	Koreja	Kim i sar., 2008;
<i>Lepista nuda</i>	0.07 <sup>a</sup>	Portugal	Barros i sar., 2008a;
<i>Laetiporus</i> <i>sulphureus</i>	189.91 <sup>f</sup>	Srbija	Petrović i sar., 2014;
<i>Lycoperdon perlatum</i>	0.01 <sup>a</sup>	Portugal	Barros i sar., 2008;
<i>Macrolepiota procera</i>	10.00 <sup>c</sup>	Indija	Puttaraju i sar., 2006;
<i>Mycena rosea</i>	4.89 <sup>e</sup>	Portugal	Heleno i sar., 2010;
<i>Morchella conica</i>	16.90 <sup>c</sup>	Indija	Puttaraju i sar., 2006;
<i>Morchella esculenta</i>	0.07 <sup>c</sup>	Taiwan	Mau i sar., 2004;
<i>Pleurotus ostreatus</i>	0.35 <sup>d</sup>	Finland	Mattila i sar., 2001;
<i>Morchella esculenta</i>	14.79 <sup>d</sup>	Španija	Heleno i sar., 2013;
<i>Morchella esculenta</i>	0.08 <sup>d</sup>	Srbija	Heleno i sar., 2013;

<i>Pleurotus ostreatus</i>	0.71 <sup>a</sup>	0.30 <sup>c</sup>	0.25 <sup>c</sup>	0.03 <sup>c</sup>	Indija	Jayakumar i sar., 2008;
<i>Pleurotus ostreatus</i>	0.09 <sup>a</sup>				Korea	Kim i sar., 2008;
<i>Piptoporus betulinis</i>		577,62 <sup>f</sup>	87,9 <sup>f</sup>	0,09 <sup>f</sup>	Portugal	Reis i sar., 2011
<i>Pluteus murinus</i>		142,85 <sup>f</sup>	173,80 <sup>f</sup>	0,03 <sup>f</sup>	Portugal	Reis i sad., 2011
<i>Ramaria flava</i> ( <i>nepečena</i> )	6.76 <sup>a</sup>		5.13 <sup>a</sup>	0.04 <sup>a</sup>	Turska	Öztürk i sar., 2014.
<i>Ramaria flava</i> ( <i>pečena</i> )	10,7 <sup>a</sup>		4.86 <sup>a</sup>	0.14 <sup>a</sup>	Turska	Öztürk i sar., 2014.
<i>Ramaria botrytis</i>	0.36a	2.50 X 10 <sup>-4b</sup>	0.27 <sup>c</sup>	0.01 <sup>c</sup>	Portugal	Barros i sar., 2008;
<i>Russula delicata</i>		4.20 <sup>c</sup>	9.00 X 10 <sup>-3c</sup>		Turska	Elmastas i sar., 2007
<i>Russula integra</i>			0.20 <sup>a</sup>		Indija	Agrahar-Murugkar Subbulakshmi, 2005;
<i>Russula emetica</i>		122.97 <sup>f</sup>	266,15 <sup>f</sup>	0,11 <sup>f</sup>	Portugal	Reis i sar., 2011
<i>Sarcodon imbricatus</i>	0.03 <sup>a</sup>		0.16 <sup>c</sup>	2.53 X 10 <sup>-3c</sup>	Portugal	Barros i sar., 2007;
<i>Sparassis crispa</i>	5.50 <sup>c</sup>				Indija	Puttaraju i sar., 2006;
<i>Sparassis crispa</i>	0.76 <sup>a</sup>				Koreja	Kim i sar., 2008;
<i>Suillus granulatus</i>	2.00X 10 <sup>-3</sup> - 1.59 X 10 <sup>-2a</sup>				Portugal	Ribeiro i sar., 2006; 2007;
<i>Suillus collinitus</i>			0.92 - 3.79 <sup>a</sup>		Portugal	Valentao i sar., 2005;
<i>Termitomyces heimii</i>	37.00 <sup>c</sup>				Indija	Puttaraju i sar., 2006;
<i>Termitomyces microcarpus</i>	6.73 <sup>c</sup>				Indija	Puttaraju i sar., 2006;
<i>Tricholoma acerbum</i>	0.04 <sup>a</sup>	8.00 X 10 <sup>-5b</sup>	0.22 <sup>c</sup>	0.08 <sup>c</sup>	Portugal	Barros i sar., 2008;

\*Rezultati su predstavljeni: <sup>a</sup>mg/g s.m., <sup>b</sup>mg/g s.m., <sup>c</sup>mg/g po ekstraktu, <sup>d</sup>mg/100g s.m., <sup>e</sup>µg/g s.m., <sup>f</sup>µg/100g

### 2.5.3. Antimikrobna aktivnost

Razvoj antibiotika predstavlja jedno od najznačajnijih naučnih dostignuća u poslednjih 70 godina. Ovi sastojci deluju na nekoliko načina, uključuju se u metaboličke procese ili u strukturu mikroorganizma. Mehanizam aktivnosti je uglavnom povezan sa uključivanjem u sintezu ćelijskog zida, modifikovanja propustljivosti plazmatične membrane, uključivanjem u hromozomske replikacije ili sintezu proteina. Ćelijski zid je zaslužan za oblik i čvrstinu bakterijskih ćelija, delujući kao osmotska barijera. Peptidoglukanski sadržaj zida ćelije varira između 10 i 60% za Gram negativne i Gram pozitivne bakterije respektivno.  $\beta$ -Laktamski antibiotici blokiraju 3. fazu sinteze bakterijskog zida, te tako prekidaju rast i razvoj ćelijskog zida, ali ne i bakterijske ćelije. Ipak, mehanizam njihovog delovanja je specifičan i odvija se preko određenih struktura, a klasifikovani su prema fazi u kojoj deluju. Fosfomicin, D-cikloserin, glikopeptidi (bacitracin, vankomicin, teikoplanin) i  $\beta$ -laktami (penicilini, cefalosporini, karbapeneni i monobaktami) su neki od primera ove grupe. S druge strane, drugi antibiotici kao što su askolistin i daptamicin deluju na nivou ćelijske membrane. Aminoglikozidi i tetraciklini, makrolidi, oksazolidini, klinapristin, dalpofristin, klindamicin i hloramfenikol inhibiraju sintezu proteina, vezujući se sa 30S ili 50S ribozomskim podjedinicama. Hinoloni, rifampicin i metronidazol inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina. Sulfonamidi i trimetoprim su antimetabolički antibiotici koji inhibiraju metabolički lanac paraaminobenzojeve kiseline (PABA) suštinski važne za ćelijski rast.

Uprkos širokom spektru antibakterijskih komponenti, bakterijska rezistencija na antibiotike prvog izbora je u drastičnom porastu. Neki primeri bakterija, kao što su *Klebsiella spp.*, i *E. coli* proizvode širok spektar  $\beta$ -laktamaza, što se odražava kao otpornost na cefalosporine treće generacije. Drugi primer uključuje meticilin rezistentni *S. aureus* (MRSA), *Enterococcus spp.* otporni na vankomicin, *Acinetobacter spp.* sa rastućom otpornošću na karbapeneme i kolistin, takođe *Pseudomonas Spp.* otporan na aminoglikozide, karbapeneme i cefalosporine.

Bolesti koje su se lako lečile, danas postaju ozbiljan problem zbog stalno rastuće antibiotske rezistencije. Veza između multirezistentnih mikroorganizama i intrahospitalnih infekcija naglašava problem i hitnost pronalaska novih rešenja. U 2010. god. WHO je savetovala sve zemlje da uvedu kontrolne procedure za administriranje lekova protiv multirezistentnih bakterija, naglašavajući rizik zbog odsustva alternativne terapije protiv ovih mikroorganizama.

Zbog toga istraživanje novih antimikrobnih supstanci efikasnih protiv patogenih mikroorganizama otpornih na postojeće lekove je od ključnog značaja. Drugačije grupe organizama se sve više istražuju poslednjih godina, dok se među terestričnim organizmima sve više pažnje poklanja sesilnim organizmima među koje spadaju i gljive.

Jestive i nejestive gljive pokazuju antimikrobnu aktivnost protiv patogenih mikroorganizama uključujući i bakterije povezane sa nozokomijalnim (intrahospitalne) infekcijama (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas maltophilia*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*) i multirezistentne (MRSA, MRSE, VREF, PRSP, ERSP) Tabela 2.2 i 2.3.

Podaci dostupni iz literature ukazuju da izolovane komponente iz ekstrakata gljiva, pokazuju bolju antimikrobnu aktivnost prema Gram-pozitivnim nego prema Gram-negativnim bakterijama.

Među istraživanim gljivama, *Lentinus edodes* je najbolje proučena vrsta i čini se da poseduje široku antimikrobnu aktivnost protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Vrste iz roda *Boletus*, *Ganoderma* i *Lepista* puno obećavaju za buduće studije.

### **Antimikrobne supstance poreklom iz gljiva**

**Fenolna jedinjenja** - antimikrobna svojstva fenolnih jedinjenja objašnjava se prisustvom hidroksilnih grupa, efikasnost ovih jedinjenja se povećava sa povećanjem broja hidroksilnih grupa, kao i sa povećanjem stepena oksidacije samih molekula. Mehanizam antimikrobnog dejstva podrazumeva enzimsku inhibiciju, najverovatnije reakcijom sa sulfhidrilnim grupama ili nekim nespecifičnim interakcijama (Cowan, 1999).

**Flavonoidi** - antimikrobna aktivnost ovih jedinjenja se vezuje za sposobnost kompleksiranja ovih jedinjenja sa ekstracelularnim proteinima i polipeptidima ćelijskog zida mikroorganizama, osim ove sposobnosti flavonoidi narušavaju biomembranske sisteme (Cowan, 1999).

**Tanini** - antimikrobni efekat tanina ispoljava se zahvaljujući njihovoj sposobnosti da vezuju aminokiseline iz proteina, čime se inaktivišu adhezin, enzimi i transportni proteini ćelijskih membrana mikroorganizama (Cowan, 1999).

**Terpeni, terpenoidi i seskviterpeni** - mehanizam dejstva terpenoida na mikroorganizme nije u potpunosti razjašnjen. Imajući u vidu njihovu lipofilnu prirodu, pretpostavlja se da deluju narušavajući membranske funkcije ćelija mikroorganizama, a pojedini autori smatraju da mogu izazvati povećanu nespecifičnu membransku permeabilnost za molekule antibiotika (Cowan, 1999).

**Polisaharidi** - antimikrobnu aktivnost ispoljavaju većinom glukani ili heteroglukani, smatra se da se ova aktivnost vezuje za pojačavanje imunog odgovora, pa se stoga njihova upotreba preporučuje posebno kod imunosuprimiranih stanja.

**Proteini** - mehanizam antimikrobnog dejstva ostvaruju formiranjem jonskih kanala na ćelijskim membranama mikroorganizama.

U Tabelama 2.2. i 2.3. nalazi se pregled antimikrobne aktivnosti ekstrakata gljiva u odnosu na Gram-pozitivne bakterije i Gram-negativne bakterije na osnovu rezultata publikovanih u poslednje dve decenije.

Tabela 2.2. Pregled antimikrobne aktivnosti ekstraktata gljiva u odnosu na Gram-negativne bakterije

Vrsta mikroorganizma	Vrsta gljive	Reference
<i>Cupriavidus</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Hearst i sar., 2009 50
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Clitocybe alexandri</i> , <i>Hygrophorus agathosmus</i> , <b><i>Meripilus giganteus</i></b> (M), <i>Paxillus involutus</i> (M), <i>Pleurotus ostreatus</i> (M), <i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Rhizopogon roseolus</i> , <i>Suillus collitinus</i>	Sheena i sar., 2003; Tambekar i sar., 2006; Solak i sar., 2006; Kalyoncu i sar., 2008.
<i>Enterobacter cloacae</i>	<b><i>Armillaria mellea</i></b> , <i>Clitocybe geotropa</i> , <b><i>Meripilus giganteus</i></b> (M), <b><i>Meripilus giganteus</i></b> , <i>Paxillus involutus</i> (M), <i>Pleurotus ostreatus</i> (M), <i>Sparassis crispa</i>	Kalyoncu i sar., 2008; Kalyoncu i sar., 2010b
<i>Enterobacter faecalis</i>	<b><i>Armillaria mellea</i></b> , <i>Clitocybe geotropa</i> , <b><i>Meripilus giganteus</i></b> (M), <b><i>Meripilus giganteus</i></b> , <i>Sparassis crispa</i>	Kalyoncu i sar., 2008; Kalyoncu i sar., 2010b
<i>Escherichia coli</i>	<i>Agaricus bisporus</i> , <b><i>Armillaria mellea</i></b> , <b><i>Armillaria mellea</i></b> , <i>Boletus edulis</i> , <i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Clitocybe alexandri</i> , <i>Clitocybe geotropa</i> , <i>Cortinarius</i> sp., <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Hydnum repandum</i> , <i>Irpex lacteus</i> (M),	Rosa i sar., 2003; Tambekar i sar., 2006; Solak i sar., 2006; Kalyoncu i sar., 2008; Yamac i Bilgili 2006; Turkoglu i sar., 2007; Kalyoncu i sar., 2010b; Quereshi i sar., 2010; Ozen i sar., 2011
<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactarius camphoratus</i> , <i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Lactarius piperatus</i> , <i>Lactarius volemus</i> , <i>Laetiporus sulphureus</i> , <i>Lentinus edodes</i> , <i>Lepista nuda</i> , <i>Leucoagaricus cf. cinereus</i> (M), <b><i>Macrolepiota procera</i></b> , <i>Marasmius</i> sp. (M), <i>Marasmius cf. bellus</i> (M), <b><i>Meripilus giganteus</i></b> (M), <b><i>Meripilus giganteus</i></b> , <i>Morchella costata</i> (M), <i>Morchella hortensis</i> (M), <i>Navesporus floccosa</i> , <i>Paxillus involutus</i> (M), <i>Phellinus rimosus</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> (M), <i>Pleurotus ostreatus</i> (M), <i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Rhizopogon roseolus</i> , <i>Sparassis crispa</i> , <i>Suillus collitinus</i>	Barros i sar., 2007c; Hearst i sar., 2009 Karaman i sar., 2009; Signoretto i sar., 2011; Karaman i sar., 2014

<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Lee i sar., 1999; Hirasawa i sar., 1999; Signoretto i sar., 2011
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Hearst i sar., 2009
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Agaricus bitorquis</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Lactarius piperatus</i> , <i>Lentinus edodes</i> , <i>Lepista nuda</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Ramaria flava</i>	Ishikawa i sar., 2001; Dulger i sar., 2002; Tambekar i sar., 2006; Barros i sar., 2007c; Barros i sar., 2007d; Gezer i sar., 2006; Hearst i sar., 2009., Quereshi i sar., 2010; Öztürk i sar., 2011
<i>Morganella morganii</i>	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Agaricus bitorquis</i> , <i>Agaricus essettei</i> , <b><i>Laetiporus sulphureus</i></b>	Turkoglu i sar., 2007; Öztürk i sar., 2011
<i>Neisseria subflava</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Signoretto i sar., 2011; Ciric i sar., 2011;
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Barros i sar., 2007b
<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Signoretto i sar., 2011; Hirasawa i sar., 1999; Ciric i sar., 2011; Signoretto i sar., 2011
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Ishikawa i sar., 2001
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Agaricus bitorquis</i> , <b><i>Armillaria mellea</i></b> , <i>Clitocybe geotropa</i> , <b><i>Laetiporus sulphureus</i></b> , <b><i>Meripilus giganteus (M)</i></b> , <b><i>Meripilus giganteus</i></b> , <i>Pleurotus ostreatus (M)</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Sparassis crispa</i>	Tambekar i sar., 2006; Turkoglu i sar., 2007; Kalyoncu i Oskay, 2008; Kalyoncu i sar., 2010; Öztürk i sar., 2011
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Boletus edulis</i> , <i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Cortinarius sp.</i> , <i>Cortinarius abnormis</i> , <i>Cortinarius ardesiacus</i> , <i>Cortinarius archeri</i> , <i>Cortinarius austroalbidus</i> , <i>Cortinarius austrovenetus</i> , <i>Cortinarius austroviolaceus</i> , <i>Cortinarius coelopus</i> , <i>Cortinarius clelandii</i> , <i>Cortinarius Dermocybe sp.</i> ,	Dulger i sar., 2002; Sheena i sar., 2003; Tambekar i sar., 2006; Barros i sar., 2007b; Barros i sar., 2007c; Turkoglu i sar., 2007; Hearst i sar., 2009; Beattie i sad., 2010; Quereshi i sar., 2010; Ozen i sar., 2011

- Dermocybe canaria*, *Dermocybe kula*], *Cortinarius fulvobatus*, *Cortinarius ianthinus*, *Cortinarius memoria-annae*, *Cortinarius persplendidus*, *Cortinarius sinapicolor*, *Cortinarius submagellanicus*, *Cortinarius tricholomoides*, *Cortinarius vinosipes*, *Ganoderma lucidum*, *Hydnum repandum*, *Lactarius camphoratus*.
- Pseudomonas aeruginosa*  
*Lactarius edodes*, *Lepista nuda*, ? *delicious*, *Lactarius piperatus*, *Lactarius volemus*, ***Laetiporus sulphureus***, ***Macrolepiota procera***, *Navesporus floccosa*, *Phellinus rimosus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Ramaria flava*  
 Dulger i sar., 2002; Sheena i sar., 2003; Tambekar i sar., 2006; Barros i sar., 2007b; Barros i sar., 2007c; Turkoglu i sar., 2007 Hearst i sar., 2009; Beattie i sad., 2010; Quereshi i sar., 2010; Ozen i sar., 2011
- Pseudomonas maltophilia*  
*Lentinus edodes*  
 Ishikawa i sar., 2001
- Salmonella enteritidis*  
***Laetiporus sulphureus***, *Ramaria flava*  
 Sheena i sar., 2001; Barros i sar., 2008a
- Salmonella poona*  
*Lentinus edode*  
 Hearst i sar., 2009
- Salmonella typhi*  
*Agaricus bisporus*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus sajor-caju*  
 Tambekar i sar., 2006; Quereshi i sar., 2010
- Salmonella typhimurium*  
*Agaricus bisporus*, ***Armillaria mellea*** (M), ***Armillaria mellea***, *Clitocybe geotropa*, *Ganoderma lucidum*, *Hygrophorus agathosmus*, *Irpex lacteus* (M), *Lepista nuda*, *Meripilus giganteus* (M), ***Meripilus giganteus***, *Morchella costata* (M),  
 Dulger i sar., 2002; Rosa i sar., 2003; Sheena i sar., 2003; Tambekar i sar., 2006; Yamac i Bilgili, 2006; Kalyoncu i Oskay, 2008
- Salmonella typhimurium*  
*Morchella elata* (M), *Morchella esculenta* var. *vulgaris* (M), *Morchella hortensis* (M), *Navesporus floccosa*, *Paxillus*  
 Dulger i sar., 2002; Sheena i sar., 2003; Rosa i sar., 2003; Tambekar i sar., 2006; Yamac i Bilgili, 2006; Kalyoncu i



- Serratia marcescens*      *involutus* (M), *Phellinus rimosus*, *Pleurotus ostreatus* (M), Oskay, 2008  
*Pleurotus sajor-caju*, *Sparassis crispa*, *Suillus collinitus*,  
*Lentinus edodes*      Hearst i sar., 2009
- Veillonella dispar*      *Lentinus edodes*      Signoretto i sar., 2011; Ciric i sar., 2011
- Veillonella parvula*      *Lentinus edodes*      Hirasawa i sar., 1999
- Yersinia enterocolitica*      *Agaricus bitorquis*, ***Laetiporus sulphureus***, *Lentinus edodes*, Ishikawa i sar., 2001; Gezer i sar., 2006; Öztürk i sar., 2011  
*Ramaria flava*

Tabela 2.3. Pregled antimikrobne aktivnosti ekstrakata gljiva u odnosu na Gram-pozitivne bakterije

Mikroorganizam	Vrsta gljive	Referenca
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Lentinus edodes	Hirasawa i sar., 1999; Signoretto i sar., 2011; Ciric i sar., 2011
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Agaricus bitorquis</i> , <i>Agaricus essettei</i> , <i>Agaricus silvicola</i> , <b><i>Armillaria mellea</i></b> , <i>Boletus edulis</i> , <i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Clitocybe alexandri</i> , <i>Clitocybe geotropa</i> , <i>Cortinarius</i> sp., <i>Gloeoporus theleporoides</i> , <i>Hexagonia hydnoides</i> , <i>Hydnum repandum</i> , <i>Hypholoma fasciculare</i> , <i>Irpex lacteus</i> (M), <i>Lactarius camphorates</i> , <i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Lactarius piperatus</i> , <i>Lactarius volemus</i> , <b><i>Laetiporus sulphureus</i></b> , <i>Lentinus edodes</i> , <i>Lepista nuda</i> , <i>Leucopaxillus giganteus</i> (M), <b><i>Macrolepiota procera</i></b> , <b><i>Meripilus giganteus</i> (M)</b> , <b><i>Meripilus giganteus</i></b> , <i>Phellinus</i> sp., <i>Pleurotus ostreatus</i> (M), <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Ramaria botrytis</i> , <i>Ramaria flava</i> , <i>Rhizopogon roseolus</i> , <i>Sarcodon imbricatus</i> , <i>Sparassis crispa</i> , <i>Tricholoma portentosum</i>	Hirasawa i sar., 1999; Hatvani i sar., 2001; Ishikawa i sar., 2001; Hur i sar., 2003; Rosa i sar., 2003; Solak i sar., 2006; Barros i sar., 2007b; Barros i sar., 2007c; Barros i sar., 2007d; Turkoglu i sar., 2007; Barros i sar., 2008; Kalyoncu i sar., 2010; Ozturk i sar., 2011; Gezer i sar., 2006; Hearst i sar., 2009; Kalyoncu i sar., 2010; Barros i sar., 2010a; Signoretto i sar., 2011
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Hatvani, 2001
<i>Bacillus pumilis</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Hearst i sar., 2009
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Agaricus bitorquis</i> , <i>Agaricus essettei</i> , <i>Agaricus silvicola</i> , <b><i>Armillaria mellea</i></b> , <i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Clitocybe alexandri</i> , <i>Clitocybe geotropa</i> , <i>Cortinarius</i> sp., <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Hygrophorus agathosmus</i> , <i>Hypholoma fasciculare</i> , <i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Lactarius piperatus</i> , <i>Laetiporus sulphureus</i> , <i>Lentinus edodes</i> , <i>Lepista nuda</i> , <i>Leucopaxillus giganteus</i> (M), <b><i>Meripilus giganteus</i> (M)</b> , <i>Navesporus floccosa</i> , <i>Paxillus involutus</i> (M), <i>Phellinus rimosus</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> (M), <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Ramaria botrytis</i> , <i>Ramaria flava</i> , <i>Rhizopogon roseolus</i> , <i>Sparassis crispa</i> , <i>Suillus collinitus</i> , <i>Tricholoma acerbum</i> , <i>Tricholoma portentosum</i>	Hirasawa i sar., 1999; Hatvani i sar., 2001; Ishikawa i sar., 2001; Solak i sar., 2006; Gezer i sar., 2006; Barros i sar., 2007b; Barros i sar., 2007c; Barros i sar., 2007d; Turkoglu i sar., 2007; Barros i sar., 2008; Hearst i sar., 2009; Kalyoncu i sar., 2010; Quereshi i sar., 2010; Barros i sar., 2010a; Ozturk i sar., 2011; Karaman, 2012

<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Hearst i sar., 2009
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Hirasawa i sar., 1999
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Hirasawa i sar., 1999; Signoretto i sar., 2011; Ciric i sar., 2011;
<i>Listeria innocua</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Ishikawa i sar., 2001;
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Lentinus edodes</i> , <i>Pycnoporus sanguineus (M)</i> ,	Ishikawa i sar., 2001; Rosa i sar., 2003; Hearst i sar., 2009
<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Hearst i sar., 2009
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Agaricus bitorquis</i> , <i>Agaricus essettei</i> , <i>Agaricus silvicola</i> , <b><i>Armillaria mellea</i></b> , <i>Boletus edulis</i> , <i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Clitocybe geotropa</i> , <i>Cortinarius sp.</i> , <i>Cortinarius abnormis</i> , <i>Cortinarius ardesiacus</i> , <i>Cortinarius archeri</i> , <i>Cortinarius austroalbidus</i> , <i>Cortinarius austrovenetus</i> , <i>Cortinarius austroviolaceus</i> , <i>Cortinarius coelopus</i> , <i>Cortinarius clelandii</i> , <i>Dermocybe sp.</i> , <i>Dermocybe canaria</i> , <i>Dermocybe kula</i> , <i>Cortinarius fulvouiubatus</i> , <i>Cortinarius ianthinus</i> , <i>Cortinarius memoria-annae</i> , <i>Cortinarius persplendidus</i> , <i>Cortinarius sinapicolor</i> , <i>Cortinarius submagellanicus</i> , <i>Cortinarius tricholomoides</i> , <i>Cortinarius vinosipes</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Hydnum repandum</i> , <i>Hygrophorus agathosmus</i> , <i>Hypholoma fasciculare</i> , <i>Irpex lacteus (M)</i> , <i>Lactarius camphoratus</i> , <i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Lactarius piperatus</i> , <i>Lactarius volemus</i> , <b><i>Laetiporus sulphureus</i></b> , <i>Lentinus edodes</i> , <i>Lepista nuda</i> , <i>Leucopaxillus giganteus (M)</i> , <b><i>Macrolepiota procera</i></b> , <b><i>Meripilus giganteus (M)</i></b> , <b><i>Meripilus giganteus</i></b> , <i>Morchella elata (M)</i> , <i>Morchella esculenta var. vulgaris (M)</i> , <i>Navesporus floccosa</i> , <i>Nothopanus hygrophanus (M)</i> , <i>Paxillus involutus (M)</i> , <i>Phellinus rimosus</i> , <i>Pleurotus eryngii (M)</i> , <i>Pleurotus ostreatus (M)</i> .	Ishikawa i sar., 2001; Hatvani, 2001; Dulger i sar., 2002; Rosa i sar., 2003; Sheena i sar., 2003; Tambekar i sar., 2006; Gezer i sar., 2006; Yamac i Bilgili, 2006; Barros i sar., 2007c; Barros i sar., 2007d.; Turkoglu i sar., 2007; Kalyoncu i sar., 2008; Barros i sar., 2008a; Barros i sar., 2008b; Hearst i sar., 2009; Signoretto i sar., 2011; Kalyoncu i sar., 2010b Quereshi i sar., 2010; Ozturk i sar., 2011; Ozen i sar., 2011
MRSA	<i>Lentinus edodes</i> , <i>Phellinus linteus</i>	Hur i sar., 2004; Hearst i sar., 2009

<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Hygrophorus agathosmus</i> , <i>Lentinus edodes</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Suillus collitinus</i>	Ishikawa i sar 2001; Tambekar i sar., 2006; Yamac i Bilgili 2006; Hearst i sar., 2009
<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Hirasawa i sar., 1999
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Hirasawa i sar., 1999
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Hirasawa i sar., 1999; Signoretto i sar., 2011; Ciric i sar., 2011
<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Hirasawa i sar., 1999
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Agaricus cf. nigrecentulus (M)</i> , <i>Tyromyces duracinus (M)</i>	Rosa i sar., 2003
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Hatvani, 2001
<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Signoretto i sar., 2011
<i>Streptococcus sobrinus</i>	<i>Lentinus edodes</i>	Hirasawa i sar., 1999; Signoretto i sar., 2011; Ciric i sar., 2011
<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Agaricus bitorquis</i> , <i>Agaricus essettei</i> , <b><i>Laetiporus sulphureus</i></b> , <i>Ramaria flava</i>	Gezer i sar., 2006; Turkoglu i sar., 2007; Ozturk i sar., 2011
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Agaricus bitorquis</i> , <i>Agaricus essettei</i> , <i>Clitocybe alexandri</i> , <b><i>Laetiporus sulphureus</i></b> , <i>Lentinus edodes</i> , <i>Ramaria flava</i>	Hatvani, 2001; Solak i sar., 2006; Gezer i sar., 2006; Turkoglu i sar., 2007; Ozturk i sar., 2011
<i>Sarcina lutea</i>	<b><i>Armillaria mellea (M)</i></b> , <b><i>Armillaria mellea</i></b> , <i>Clitocybe geotropa</i> , <b><i>Meripilus giganteus (M)</i></b> , <b><i>Meripilus giganteus</i></b> , <i>Morchella costata (M)</i> .	Kalyoncu i sar., 2008; Kalyoncu i sar., 2010b

\*(M) ekstrakt micelije

#### 5.2.4. Antikancerogena aktivnost

Kancer je najveći uzrok smrtnosti u svetu. Očekuje se da će broj obolelih od kancera u naredne dve decenije biti veći od 22 miliona (Jemal i sar., 2011). Danas savremena terapija kancera broji više od 100 antikancerogenih lekova sa različitim mehanizmom delovanja. Brojne nuspojave, hemoterapije i radioterapije zahtevaju upotrebu dodatnih sredstava za održanje i poboljšanje imunog statusa bolesnika. Stoga upotreba prirodnih lekova poreklom iz gljiva, u antikancerogenoj terapiji, koja imaju citotoksična svojstva uz minimalne negativne prateće efekte privlači sve više pažnje (Ivanova i sar., 2011). Terapeutska svojstva gljiva se eksploatišu u tradicionalnoj medicini sveta još od antičkih vremena. Gljive predstavljaju veliki izvor moćnih novih farmaceutika. Postoje različiti podaci koji govore o broju vrsta gljiva, koje poseduju antikancerogenu aktivnost (200-331), oko 540 vrsta gljiva se koristi u medicinskoj praksi u Kini (Dai i sar., 2009). Ono što je najvažnije za savremenu medicinu, one predstavljaju neograničen izvor komponenti sa potencijalnim antitumorskim i imunostimulativnim svojstvima, uključujući jedinjenja male molekulske mase: hinone, cerebrozide, izoflavone, katehole, amine, triacilglicerole, seskviterpene, sterole, organski germanijum i selen. Pored navedenih jedinjenja, jedinjenja velike molekulske mase pokazuju antitumorsku i imunostimulativnu aktivnost, homo- i heteropolisaharidi, glikoproteini, glikopeptidi, proteini, RNK-protein kompleksi (Tabela 2.4.) (Ferreira i sar., 2010).

Brojne publikovane studije govore o rezultatima istraživanja ekstrakata gljiva i izolovanih jedinjenja iz različitih ekstrakata o njihovom potencijalnom citotoksičnom delovanju na različite ćelije kancera u *in vitro* i *in vivo* uslovima. U Tabelama 2.4. i 2.5. prikazuju komponente male i velike molekulske mase, klase jedinjenja koja su izolovana, jedinjenja, vrste iz kojih su izolovana kao i molekularni ciljevi.

Tabela 2.4. Komponente male molekulske mase sa antikancerogenim potencijalom

Klasa jedinjenja	Antikancerogeni agensi	Vrsta gljive	Molekulski targeti	Referenca
<b>Hinoni</b>	Panepoksidon	<i>Panus conchatus</i> , <i>P. rudis</i> , <i>Lentinus crinitus</i>	NF-KB inhibitor	Zaidman i sar., 2005;
	Cikloepoksidon	<i>Xylaria izolati</i>	NF-KB inhibitor	Zaidman i sar., 2005;
	Klavilaktioni (Clavilactones) CB, CD and CA	<i>Clitocybe clavipes</i>	Tirozin kinaze inhibitor	Zaidman i sar., 2005; Cassinelli i sar., 2000; Merlini i sar., 2000;
	Hinon $\gamma$ -L-glutamini-4-hidroksi-2,5-benzohinon)	<i>Agaricus bisporus</i>	DNA polimeraza inhibitor	Zaidman i sar., 2005; Tiffany i sar., 1978;
	(E)-2-(4-hidroksi-3-metil-2-butenil)-hidrohinon	<i>Piptoporus betulinus</i>	MPs inhibitor	Zaidmani sar., 2005; Lindequist i sar., 2005;
<b>Cerebrozidi</b>	(4E,8E)-N-D-2'-hidroksipalmitoil-1-O- $\beta$ -D-glikopiranozil-9-metil-4,8-	<i>Ganoderma lucidum</i>	DNA polimeraze $\beta$ inhibitori	Zaidman i sar., 2005; Paterson, 2006;
	(4E,8E)-N-D-2'-hidroksistearyl-1-O- $\beta$ -D-glukopiranozil-9-metil-4,8-sfingadienin	<i>Flammulina velupites</i>	Cdc2 kinaze modulator	Zaidman i sar., 2005; Chang i sar., 2004; Choi i sar., 2000;
<b>Izoflavoni</b>	Genistein	<i>P. linteus</i> , <i>Gymnopilus marginatus</i> , <i>G. patriae</i>	PKC $\beta$ inhibitor	Zaidman i sar., 2005; Gonindard i sar.,

Klasa jedinjenja	Antikancerogeni agensi	Vrsta gljive	Molekulski targeti	Referenca
<b>Kateholi</b>	Geranemini A-F	<i>G. parvisporus</i> , <i>Inonotus hispidus</i> , <i>Gerronema</i>	COX-2 inhibitori	Zaidman i sar., 2005; Silberborth i sar., 2002;
<b>Amini i amidi</b>	2-aminoenoksazin-3-jedan	<i>Lepiota americana</i>	Aromataze inhibitor	Zaidman i sar., 2005; Kim i sar., 2000;
<b>Triacilgliceroli</b>	Putrescine-1,4-dicinamidi	<i>Pholiota spumosa</i>	Indukcija apoptoze i nekroze	Poucheret i sar., 2006; Russo i sar., 2007;
<b>Seskviterpeni</b>	1-Oleoil-2-linoleoil-3-palmitoilglicerol	<i>Grifola frondosa</i>	inhibitor ciklooksigenaze	Zhang i sar., 2002; Zaidman i sar., 2005;
<b>Steroidi</b>	Iludin S i M i derivati	<i>Omphalotus illudens</i> , <i>Lampteromyces japonicus</i> <i>Lepiota americana</i> ,	Jedan derivat je DNA-alkilirajući agens Sulfataze inhibitor	Zaidman i sar., 2005; Poucheret i sar., 2006; Kim i sar., 2000; Zaidman i sar., 2005; Bok i sar., 1999;
	Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-jedan	<i>Grifola frondosa</i> , <i>Agaricus blazei</i>	Ciklooksigenaze inhibitor	Takaku i sar., 2001; Zhang i sar., 2002; Zaidman i sar., 2005;
	Lucidenična kiselina	<i>Grifola frondosa</i> , <i>Ganoderma applanatum</i> , <i>G. neojaponicum</i>	Ciklooksigenaze inhibitor	Can i sar., 1998; Zhang i sar., 2002; Zaidman i sar., 2005;
	Lakton lucidenične kiseline	<i>Ganoderma lucidum</i>	DNA polimeraze $\alpha$ , $\beta$ and RT inhibitori, NF-KB i AP-1 inhibitori,	Mizushima i sar., 1999; Zaidman i sar., 2005; Li i sar., 2005; Tang i sar., 2006; Paterson, 2006; Moradali i sar., 2007; Jiang i sar., 2008;
	Cerevisterol		DNA topoizomerase inhibitor	
	Lucidumol A and B			
	Ganoderiol F			
	Ganodermanondiol			
	Ganodermanontriol			
	Ganoderična kiselina A, F, H, W, X, Y			
	Poliporenična kiselina	<i>Piptoporus betulinus</i> , <i>Daedalea dickinsii</i>	MMPs inhibitor	Zaidman i sar., 2005; Lindequist i sar., 2005

Klasa jedinjenja	Antikancerogeni agensi	Vrsta gljive	Molekulski targeti	Referenca
	Dehidroebričonična kiselina	<i>Poria cocos</i>	DNA topozimeraze II inhibitor	Zaidman i sar., 2005;
<b>Organski germanium</b>		<i>Ganoderma lucidum</i>	Nepoznat	Chiu i sar., 2000; Moradali i sar., 2007;
<b>Mikroelementi</b>	Selenium	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Boletus edulis</i> , <i>Flammulina velutipes</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i>	DNA citozin- metiltransferaze inhibitor	Zaidman i sar., 2005;



Tabela 2.5. Komponente velike molekulske mase sa antikancerogenim potencijalom

Klasa jedinjenja	Antikancerogeni agensi	Vrsta gijve	Molekulski targeti	Referenca
<b>Homoglukani</b>	(1→3)-β-D-glukan	<i>Auricularia auricula</i> <i>Lyophyllum decastes</i> <i>Lentinus edodes</i>	IM pred kliničke studije na životinjskim modelima	Taguchi, 1983; Tari i sar., 1994; Mizuno, 1995;
	(1→3)-β-D-glukan		Povećanje aktivnosti imunog sistema;	Watanabe i Ogawa, 1995;
	(1→6)-β-D Lentinan, Šizofilan SPG,		kliničke studije (želuca, kolorektalnog dela, prostate i kancera dojke)	Bobek i Galbavy, 2000;
	Grifolan, GRN,	<i>Schizophyllum commune</i>	Povećanje aktivnosti imunog sistema, kliničke studije (želudac, cerviks, glava i kancer vrata)	Zaidman i sar., 2005;
	Skleroglukan, SSG,	<i>Grifola frondosa</i>	KS (gastrointestinalni trakt, pluća jetra i kancer dojke);	Lindequist i sar., 2005;
	Alkalno rastvorljivi glukan, Pleuran, SCG, H-3-B, PG101, GLP	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Pleurotus tuber-regium</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Sparassis crispa</i> <i>Cryptoporus volvatus</i> <i>Lentinus lepideus</i> <i>Ganoderma lucidum</i>	IM; KS	Poucheret i sar., 2006;
	(1→3)-β-D-glukan sa (1→2) ili (1→6)-β-D-glukan	<i>Pachyman</i> iz <i>Poria cocos</i> <i>Armillariella tabescens</i> <i>Lyophyllum decastes</i>	IM; <i>in vitro</i> ćelijske linije	Moradali i sar., 2007; Zhang i sar., 2007;
	(1→3)-β-D-glukan sa (1→2) ili (1→6)-β-D-glukan		IM; PKSŽ	Zhang i sar., 2007
	(1→3)-β-D-glukan sa (1→2) ili (1→6)-β-D-glukan		IM; PKSŽ	Mizuno, 1995; Zhang i sar., 2007
	(1→3)-β-D-glukan sa (1→2) ili (1→6)-β-D-glukan		IM; PKSŽ	
	(1→3)-β-D-glukan sa (1→2) ili (1→6)-β-D-glukan		IM; PKSŽ	
	(1→3)-β-D-glukan sa (1→2) ili (1→6)-β-D-glukan		IM; PKSŽ	
	(1→6)-β-D-glukan sa (1→3)-β-D -frakcijom	<i>Agaricus blazei Grifola frondosa</i>	IM; KS (kancer dojke, prostate, pluća, jetre i želuca)	Liu i sar., 1995; Zhuang i Wasser, 2004; Zaidman i sar., 2005;
Galaktoksiloglukan	<i>Hericium erinaceus</i>	IM; <i>in vitro</i> ćelijske linije	Wasser, 2002; Moradali i sar., 2007; Zhang i sar.,	

Klasa jedinjenja	Antikancerogeni agensi	Vrsta glijive	Molekulski targeti	Referenca
<b>Homoglukani</b>	Manogalaktoglukan	<i>Agaricus blazei</i> <i>Ganoderma lucidum</i> <i>Pleurotus pulmonarius</i> <i>Pleurotus cornucopiae</i> <i>Grifola frondosa</i>	IM; <i>in vitro</i> ćelijske linije	2007; Wasser, 2002; Moradali i sar., 2007;
	Manoksigloglukan		IM; PKSŽ	Wasser, 2002; Moradali i sar., 2007; Zhang i sar., 2007;
	Riboglukan	<i>Agaricus blazei</i> <i>Flammulina velutipes</i>	IM; <i>in vitro</i> ćelijske linije	Wasser, 2002; Moradali i sar., 2007; Zhang i sar., 2007;
	Ksiloglukan	<i>Agaricus blazei</i> <i>Grifola frondosa</i> <i>Polyporus confluens</i> <i>Pleurotus pulmonarius</i>	IM; PKSŽ IM; PKSŽ IM; PKSŽ IM; PKSŽ	Wasser, 2002; Moradali i sar., 2007; Zhang i sar., 2007; Mizuno, 2002
	Ksilogalaktoglukan	<i>Inonotus obliquus</i>	IM; <i>in vitro</i> ćelijske linije	Wasser, 2002; Moradali i sar., 2007; Zhang i sar., 2007
<b>Heteroglukani</b>	(1→3)-β-glukurono glukan	<i>Ganoderma lucidum</i>	IM; <i>in vitro</i> ćelijske linije	Moradali i sar., 2007; Zhang i sar., 2007
	Arabinogalaktan	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	IM; PKSŽ	Wasser, 2002; Zhang i sar., 2007;
	Fukogalaktan	<i>Sarcodon aspratus</i>	IM; PKSŽ	Wasser, 2002; Zhang i sar., 2007;
	Fukomanogalaktan	<i>Dictyophora indusiata</i> <i>Grifola frondosa</i>	IM; PKSŽ IM; PKSŽ	Wasser, 2002; Zhang i sar., 2007;
	Glukogalaktan	<i>Ganoderma tsugae</i>	IM; PKSŽ	Wasser, 2002; Moradali i sar., 2007; Zhang i sar., 2007;
<b>Glikani</b>	Manogalaktan	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	IM; <i>in vitro</i> ćelijske linije	Wasser, 2002; Moradali i sar., 2007; Zhang i sar., 2007;

Klasa jedinjenja	Antikancerogeni agensi	Vrsta gljive	Molekulski targeti	Referenca
	Manofukogalaktan	<i>Fomitella fraxinea</i>	IM; PKSŽ	Wasser, 2002;
	Ksilan	<i>Hericium erinaceus</i>	IM; PKSŽ	Wasser, 2002; Moradali i sar., 2007; Zhang i sar., 2007;
	Glukokilan	<i>Hericium erinaceum</i>	IM; PKSŽ	Wasser, 2002; Moradali i sar., 2007; Zhang i sar., 2007;
		<i>Pleurotus pulmonarius</i>	IM; PKSŽ	
	Manoglukoksilan	<i>Hericium erinaceus</i>	IM; PKSŽ	Wasser, 2002; Moradali i sar., 2007; Zhang i sar., 2007;
	Manogalaktofukan	<i>Grifola frondosa</i>	IM; PKSŽ	Wasser, 2002; Moradali i sar., 2007; Zhang i sar., 2007;
	Manan	<i>Dictyophora indusiata</i>	IM; PKSŽ	Wasser, 2002; Zhang i sar., 2007
	Glukomanan	<i>Agaricus blazei</i>	IM; PKSŽ	Wasser, 2002; Moradali i sar., 2007; Zhang i sar., 2007;
	Galaktoglukomanan	<i>Lentinus edodes</i>	IM; PKSŽ	Moradali i sar., 2007; Zhang i sar., 2007
	Galaktomanan	<i>Morchella esculenta</i>	IM; PKSŽ	Zhang i sar., 2007
	Tremelastin	<i>Tremella fuciformis</i>	IM; PKSŽ	Lindequist i sar., 2005.
<b>Glikani</b>	ATOM	<i>Agaricus blazei</i>	IM; PKSŽ	Liu i sar., 1996;
	AB-FP	<i>Agaricus blazei</i>	IM; PKSŽ	Wasser, 2002; Mizuno, 2002
	PSPC	<i>Tricholoma lobayense</i>	IM; PKSŽ	
<b>Glikoproteini (Polisaharidno proteinski kompleks)</b>	Galaktoksiloglukan-protein kompleks	<i>Hericium erinaceus</i>	IM; <i>in vitro</i> ćelijske linije	Lindequist i sar., 2005.
<b>Glikopeptidi</b>	Glukoksilan-protein	<i>Hericium caput-</i>	IM; <i>in vitro</i> ćelijske linije	Lindequist i sar., 2005.

Klasa jedinjenja (Polisaharidno proteinski kompleks)	Antikancerogeni agensi	Vrsta gljive	Molekulski targeti	Referenca
	kompleks Ganoderani	<i>medusae</i> <i>Ganoderma lucidum</i>	IM; <i>in vitro</i> ćelijske linije	Lindequist i sar., 2005; Moradali i sar., 2007; Moradali i sar., 2007; El Enshasy i Hatti-Kaul, 2013; Kidd, 2000; Zaidman i sar., 2005; Poucheret i sar., 2006; Lindequist i sar., 2005; Moradali i sar., 2007; Zhang i sar., 2007.
	PSP	<i>Trametes versicolor</i>	IM; PKSŽ	Mizuno, 1995; Kidd, 2000; Zaidman i sar., 2005; Lindequist i sar., 2005; Poucheret i sar., 2006; Moradali i sar., 2007; El Enshasy i Hatti-Kaul, 2013; Lindequist i sar 2005; Israilides i sad 2008; El Enshasy i Hatti-Kaul, 2013; Paterson, 2006; Moradali i sar., 2007; El Enshasy i Hatti- Kaul, 2013;
	PSK ili krestin	<i>Trametes versicolor</i>	Poboljšanje imunog sistema, kliničke studije za kancer glave, vrata, gornjeg gastro- intestinalnog trakta, debelog creva, pluća i dojke.	Moradali i sar., 2007; El Enshasy i Hatti-Kaul, 2013; Lindequist i sar 2005; Israilides i sad 2008; El Enshasy i Hatti-Kaul, 2013; Paterson, 2006; Moradali i sar., 2007; El Enshasy i Hatti- Kaul, 2013;
<b>Proteoglikani</b>	KS-2	<i>Lentinus edodes</i>	Imunomodulator; pred kliničke studije na životinjskim modelima	Moradali i sar., 2007; El Enshasy i Hatti-Kaul, 2013; Lindequist i sar 2005; Israilides i sad 2008; El Enshasy i Hatti-Kaul, 2013; Paterson, 2006; Moradali i sar., 2007; El Enshasy i Hatti- Kaul, 2013;
	Glikopeptid- kompleks	<i>Ganoderma lucidum</i>	Imunomodulator; predkliničke studije na životinjskim modelima	Moradali i sar., 2007; El Enshasy i Hatti-Kaul, 2013; Lindequist i sar 2005; Israilides i sad 2008; El Enshasy i Hatti-Kaul, 2013; Paterson, 2006; Moradali i sar., 2007; El Enshasy i Hatti- Kaul, 2013;
	GLIS	<i>Ganoderma lucidum</i>	Imunomodulator; predkliničke studije na životinjskim modelima	Moradali i sar., 2007; El Enshasy i Hatti-Kaul, 2013; Lindequist i sar 2005; Israilides i sad 2008; El Enshasy i Hatti-Kaul, 2013; Paterson, 2006; Moradali i sar., 2007; El Enshasy i Hatti- Kaul, 2013;
	PL	<i>Phellinus linteus</i>	Imunomodulator; predkliničke studije na životinjskim modelima	Moradali i sar., 2007; El Enshasy i Hatti-Kaul, 2013; Lindequist i sar 2005; Israilides i sad 2008; El Enshasy i Hatti-Kaul, 2013; Paterson, 2006; Moradali i sar., 2007; El Enshasy i Hatti- Kaul, 2013;
	LEM	<i>Lentinus edodes</i>	Imunomodulator; predkliničke studije na životinjskim modelima	Moradali i sar., 2007; El Enshasy i Hatti-Kaul, 2013; Lindequist i sar 2005; Israilides i sad 2008; El Enshasy i Hatti-Kaul, 2013; Paterson, 2006; Moradali i sar., 2007; El Enshasy i Hatti- Kaul, 2013;
Flamulin	<i>Flammulina velutipes</i>	Imunomodulator; <i>in vitro</i> ćelijske linije	Moradali i sar., 2007; El Enshasy i Hatti-Kaul, 2013; Lindequist i sar 2005; Israilides i sad 2008; El Enshasy i Hatti-Kaul, 2013; Paterson, 2006; Moradali i sar., 2007; El Enshasy i Hatti- Kaul, 2013;	

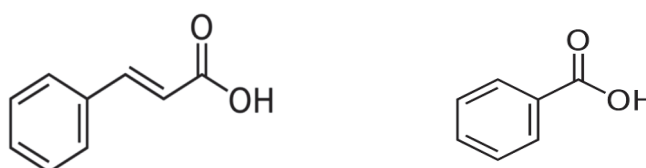
Klasa jedinjenja	Antikancerogeni agensi	Vrsta gljive	Molekulski targeti	Referenca
<b>Mesavina polisaharida i lignina</b>	Protein LZ8	<i>Ganoderma lucidum</i>	Imunomodulator; predkliničke studije na zivotinjskim modelima	Wang i sar., 1998; Lindequist i sar 2005; Moradali i sar., 2007;
	Klitocipin	<i>Clitocybe nebularis</i>	Cistein proteinaze, <i>in vitro</i> enzimski inhibitorni eseji	Brzin i sar. 2000; Galeša i sar., 2004;
<b>Proteini</b>	Lektini	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Boletus satanas</i> , <i>Grifola frondosa</i> , <i>Tricholoma mongolicum</i> , <i>Volvariella volvacea</i>	Imunomodulator, antiproliferativna aktivnost <i>in vitro</i> ćelijske linije	Lindequist i sar., 2005

## 2.6. Bioaktivna jedinjenja iz gljiva

### 2.6.1. Fenolne kiseline

Pod fenolnim kiselinama podrazumevaju se dve velike grupe jedinjenja: hidroksibenzojeve kiseline (C6C1), i hidroksicimetne ili fenilpropenske kiseline (C6C3) Tabela 2.6.

Tabela 2.6. Hemijske strukture derivata cimetne i benzojeve kiseline



	Derivata cimetne kiseline	Derivati benzojeve kiseline
$R^1=OH$	o-Kumarna kiselina	
$R^3=OH$	p-Kumarna kiselina	p-Hidroksibenzojeva kiselina
$R^3=R^4=OH$	Kafena kiselina	Protokatehinska kiselina
$R^2=OCH_3, R^3=OH$	Ferulna kiselina	Vanilinska kiselina
$R^2=R^3=OCH_3$		Veratrična kiselina
$R^2=R^3=R^4=OH$		Galna kiselina
$R^1=R^4=OH$		Gentisinska kiselina
$R^2=R^4=OCH_3, R^3=OH$	Sinapinska kiselina	Siriginska kiselina
$R^1=OH, R^4=HSO_3$		5-Sulfosalicilna kiselina
$R^2=R^3=OH$	3,4 ili 5-O-kafeoilkinska (caffeoylquin) kiselina	

U prirodi se javljaju pretežno u vidu estara sa šećerima, drugim fenolnim kiselinama, hidroksikiselinama itd. Dok neke od fenolnih kiselina (npr. orselinska) nastaju ciklizacijom poliketidnog niza, većina ih potiče iz šikimatnog (šikimat-arogenatnog) puta (Dewick, 2009). Brojne su studije poslednjih decenija istraživale bioaktivni potencijal gljiva koje se pripisuje različitim molekulima, uključujući i fenolne kiseline (Ferreira i sar., 2009). Brojni *in vitro* testovi pokazali su da su fenolne kiseline odlični "hvatači" slobodnih radikala, uključujući superoksid anjon radikal, hidroksi radikal, i peroksi radikal. Utvrđena je sposobnost inhibicije reaktivnih oblika azota, što doprinosi zaštiti od mutageneze i karcinogeneze (Morishita i Ohnishi, 2001). Fenolne kiseline su identifikovane kod različitih vrsta širom sveta, a iako su nenutritivna jedinjenja, u ishrani mogu obezbediti zdravstvene koristi povezane sa smanjenjem rizika od hroničnih bolesti koje nastaju kao posledica oksidativnog stresa (Puttaraju i sar., 2007; Kim i sar., 2008; Vaz i sar., 2011; Heleno i sar., 2015). U Tabeli 2.7. prikazane su izolovane fenolne kiseline u različitim vrstama gljiva u poslednjoj deceniji.

Tabela 2.7. Pregled fenolnih kiselina detektovanih u različitim vrstama gljiva

Fenolna kiselina	Vrsta gljive	Referenca
Galna kiselina	<i>Termitomyces heimii</i> , <i>Termitomyces mummiformis</i> , <i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Hydnum repandum</i> , <i>Lentinus squarulosus</i> , <i>Sparassis crispa</i> , <i>Morchella conica</i> , <i>Russula brevipes</i> , <i>Geastrum arenarius</i> , <i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Lactarius sanguifluus</i> , <b>Macrolepiota procera</b> , <i>Cantharellus clavatus</i> , <i>Auricularia polytricha</i> , <i>Pleurotus djamar</i> , <i>Lentinus sajor-caju</i> , <i>Termitomyces tylerance</i> , <i>Morchella angusticeps</i> , <i>Termitomyces microcarpus</i> , <i>Helvella crispa</i> , <i>Termitomyces shimperi</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Flammulina velutipes</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Lentinus edodes</i> , <i>Agaricus blazei</i> , <i>Phellinus linteus</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Inonotus obliquus</i> , <i>Coprinus comatus</i> . G. <i>applanatum</i> , <i>Fistulina hepatica</i> .	Puttaraju i sar., 2006; Kim i sar., 2008; Stojković i sar, 2013; Karaman, 2012
p-Hidroksibenzoeva kiselina	<i>Agaricus bisporus (beli)</i> , <i>Agaricus bisporus (smedji)</i> , <i>Lentinus edodes</i> , <i>Russula cyanoxantha</i> , <i>Tricholoma equestre</i> , <i>Amanita rubescens</i> , <i>Suillus granulatus</i> , <i>Agaricus arvensis</i> , <i>Agaricus silvicola</i> , <i>Agaricus romagnesii</i> , <i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Lepista nuda</i> , <i>Lycoperdon molle</i> , <i>Sarcodon imbricatus</i> , <i>Ramaria botrytis</i> , <i>Tricholoma acerbum</i> , <i>Sparassis crispa</i> , <i>Phellinus linteus</i> , <i>Inonotus obliquus</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Coprinopsis atramentaria</i> , <i>Lactarius bertillonii</i> , <i>Lactarius vellereus</i> , <i>Rhodotus palmatus</i> , <i>Xerocomus chrysenteron</i> , <i>Morchella esculenta</i> , <i>Amanita crocea</i> , <i>Amanita mairei</i> , <i>Boletus poliporus</i> , <i>Boletus regius</i> , <i>Helvella lacunosa</i> , <i>Russula aurea</i> , <i>Russula virescens</i> , <i>Calvatia excipuliformis</i> , <i>Clavulina cinerea</i> , <i>Clitocybe gibba</i> , <i>Coprinus micaceus</i> , <i>Craterellus cornucopiodes</i> , <i>Laccaria amethystina</i> .	Mattila i sar., 2001; Ribeiro i sar., 2006, a2007; Heleno i sar., 2012a, 2012b, 2013a, 2013b; Leal i sar., 2013; Nowacka i sar., 2014

Protokatehinska kiselina	<p><i>Agaricus bisporus (beli)</i>, <i>Agaricus bisporus (smeđi)</i>, <i>Lentinus edodes</i>, <i>Termitomyces mummiformis</i>, <i>Boletus edulis</i>, <i>Lactarius deliciosus</i>, <i>Pleurotus sajor-caju</i>, <i>Lentinus squarulosus</i>, <i>Hydnum repandum</i>, <i>Sparassis crispa</i>, <i>Morchella conica</i>, <i>Russula brevipes</i>, <i>Lentinus sajor-caju</i>, <i>Lactarius sanguifluus</i>, <i>Macrolepiota procera</i>, <i>Cantharellus clavatus</i>, <i>Auricularia polytricha</i>, <i>Pleurotus djamor</i>, <i>Termitomyces tylerance</i>, <i>Morchella angusticeps</i>, <i>Termitomyces microcarpus</i>, <i>Helvella crispa</i>, <i>Termitomyces shimperi</i>, <i>Termitomyces heimii</i>, <i>Lepista nuda</i>, <i>Ramaria botrytis</i>, <i>Pleurotus ostreatus</i>, <i>Flammulina velutipes</i>, <i>Pleurotus eryngii</i>, <i>Agaricus blazei</i>, <i>Inonotus obliquus</i>, <i>Phellinus linteus</i>, <i>Ganoderma lucidum</i>, <i>Lactarius bertillonii</i>, <i>Lactarius vellereus</i>, <i>Rhodatus palmatus</i>, <i>Xerocomus chryseron</i>, <i>Morchella esculenta</i>, <b><i>Armillaria mellea</i></b>, <i>Clavulina cinerea</i>, <i>Clitocybe gibba</i>, <i>Craterellus cornucopiodes</i>, <i>Leccinum scabrum</i>, <b><i>Macrolepiota procera</i></b>, <i>Pholiota mutabilis</i>, <i>Xerocomus badius</i>, <i>Fistulina hepatica</i>.</p>
Vanilinska kiselina	<p><i>Pleurotus sajor-caju</i>, <i>Hydnum repandum</i>, <i>Lentinus squarulosus</i>, <i>Morchella conica</i>, <i>Russula brevipes</i>, <i>Lactarius sanguifluus</i>, <b><i>Macrolepiota procera</i></b>, <i>Cantharellus clavatus</i>, <i>Auricularia polytricha</i>, <i>Pleurotus djamor</i>, <i>Helvella crispa</i>, <i>Termitomyces microcarpus</i>, <i>Termitomyces shimperi</i>, <i>Lentinus sajor-caju</i>, <i>Termitomyces heimii</i>, <i>Lycoperdon molle</i>, <i>Tricholoma acerbum</i>, <i>Craterellus cornucopiodes</i>, <i>Agrocybe aegerita</i>.</p>
Siriginska kiselina	<p><i>Termitomyces mummiformis</i>, <i>Hydnum repandum</i>, <i>Morchella conica</i>, <i>Russula brevipes</i>, <i>Lactarius sanguifluus</i>, <b><i>Macrolepiota procera</i></b>, <i>Cantharellus clavatus</i>, <i>Pleurotus djamor</i>, <i>Lentinus sajor-caju</i>, <i>Termitomyces tylerance</i>, <i>Morchella angusticeps</i>, <i>Termitomyces microcarpus</i>, <i>Agaricus blazei</i>, <i>Sparassis crispa</i></p>
Veratrinska kiselina	<p><i>Sparassis crispa</i></p>

Kim i sar., 2008.



Gentisinska kiselina	<i>Termitomyces heimii</i> , <i>Termitomyces mummiformis</i> , <i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Hydnum repandum</i> , <i>Lentinus squarulosus</i> , <i>Sparassis crispa</i> , <i>Morchella conica</i> , <i>Russula brevipes</i> , <i>Lactarius sanguifluus</i> , <b><i>Macrolepiota procera</i></b> , <i>Cantharellus clavatus</i> , <i>Auricularia polytricha</i> , <i>Pleurotus djamor</i> , <i>Lactarius sanguifluus</i> , <i>Termitomyces tylerance</i> , <i>Morchella angusticeps</i> , <i>Termitomyces microcarpus</i> , <i>Helvella crispa</i> , <i>Termitomyces shimperi</i> , <i>Agaricus blazei</i> .	Puttaraju i sar., 2006.; Kim i sar., 2008
Cimetna kiselina	<i>Agaricus bisporus</i> (beli), <i>Agaricus bisporus</i> (braon), <i>Termitomyces heimii</i> , <i>Termitomyces mummiformis</i> , <i>Termitomyces shimperi</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Hydnum repandum</i> , <i>Lentinus squarulosus</i> , <i>Sparassis crispa</i> , <i>Lactarius sanguifluus</i> , <i>Cantharellus clavatus</i> , <i>Pleurotus djamor</i> , <i>Agaricus arvensis</i> , <i>Agaricus silvicola</i> , <i>Agaricus romagnesii</i> , <i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Lycoperdon perlatum</i> , <b><i>Macrolepiota procera</i></b> , <i>Agaricus blazei</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Coprinopsis atramentaria</i> , <i>Lactarius bertillonii</i> , <i>Lactarius vellereus</i> , <i>Rhodotus palmatus</i> , <i>Xerocomus chrysenteron</i> , <i>Boletus regius</i> , <i>Russula aurea</i> , <i>Russula virescens</i> .	Puttaraju i sar., 2006; Kim i sar., 2008; Heleno i sar., 2012a, 2012b; Leal i sar., 2013
p-Kumarna kiselina	<i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Termitomyces heimii</i> , <i>Boletus edulis</i> , <i>Sparassis crispa</i> , <i>Geastrum arinarius</i> , <i>Lactarius sanguifluus</i> , <b><i>Macrolepiota procera</i></b> , <i>Pleurotus djamor</i> , <i>Lentinus sajor-caju</i> , <b><i>Fistulina hepatica</i></b> , <i>Agaricus arvensis</i> , <i>Agaricus silvicola</i> , <i>Lepista nuda</i> , <i>Sparassis crispa</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Coprinopsis atramentaria</i> , <i>Lactarius bertillonii</i> , <i>Lactarius vellereus</i> , <i>Xerocomus chrysenteron</i> , <i>Morchella esculenta</i> , <i>Calvatia excipuliformis</i> , <i>Craterellus cornucopioides</i> , <i>Leccinum scabrum</i> , <i>Pholiota mutabilis</i> , <i>Psilocybe capnoides</i> , <i>Ganoderma applanatum</i>	Valentao i sar., 2005; Puttaraju i sar., 2006; Ribeiro i sar., 2007; Kim i sar., 2008; Heleno i sar., 2012a, 2012b, 2013a, 2013b; Karaman, 2012; Nowacka i sar., 2014
o-Kumarna kiselina	<i>Inonotus obliquus</i>	Kim i sar., 2008
Ferulna kiselina	<i>Termitomyces heimii</i> , <i>Termitomyces microcarpus</i> , <i>Termitomyces shimperi</i> , <i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Lentinus squarulosus</i> , <i>Sparassis crispa</i> , <i>Morchella conica</i> , <i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Lactarius sanguifluus</i> , <b><i>Macrolepiota procera</i></b> , <i>Cantharellus clavatus</i> , <i>Pleurotus djamor</i> , <i>Flammulina velutipes</i> , <i>Inonotus obliquus</i> .	Puttaraju i sar., 2006; Kim i sar., 2008.

Kafena kiselina	<p><i>Termitomyces heimii</i>, <i>Termitomyces tylerance</i>, <i>Termitomyces microcarpus</i>, <i>Termitomyces shimperi</i>, <i>Boletus edulis</i>, <i>Lentinus squarulosus</i>, <i>Morchella conica</i>, <i>Russula brevipes</i>, <i>Cantharellus cibarius</i>, <i>Lactarius sanguifluus</i>, <b>Macrolepiota procera</b>, <i>Cantharellus clavatus</i>, <i>Pleurotus djamar</i>, <i>Lentinus sajor-caju</i>, <i>Morchella angusticeps</i>, <b><i>Fistulina hepatica</i></b>, <i>Flammulina velutipes</i>, <i>Sparassis crispa</i>, <i>Phellinus linteus</i>, <i>Pholiota mutabilis</i>.</p>	Puttaraju i sar., 2006; Ribeiro i sar., 2007; Kim i sar., 2008; Nowacka i sar., 2014.
5-Sulfosalicilna kiselina	<i>Flammulina velutipes</i> , <i>Sparassis crispa</i> , <i>Phellinus linteus</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> .	Kim i sar., 2008.
3,4 ili 5-Okafeoilhinska kiselina	<i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Flammulina velutipes</i> , <i>Phellinus linteus</i>	Valentao i sar., 2005; Kim i sar., 2008

## 2.6.2. Flavonoidi

Flavonoidi su najveća grupa fenolnih jedinjenja, sa zajedničkom  $C_6C_3C_6$  strukturom izvedenom od flavona (2-fenilhromen-4-ona, 2-fenil-1,4-benzopirona) ili flavana (2-fenilbenzopirana). Prema stepenu oksidacije i supstituciji na prstenu C, mogu se podeliti na flavone, flavonole, flavanone, dihidroflavonole (flavanonole), flavan-3,4-diole (leukoantocijanidine), flavan-3-ole (katehine), flavan-4-ole i antocijanidine. U ovu grupu još spadaju i auron, jedinjenja bez C prstena – halkoni, dihidrohalkoni i retrohalkoni, zatim izoflavonoidi (izoflavoni, kumestani, pterokarpani, rotenoidi...) i oligo- i polimeri flavanola (proantocijanidini) (Orčić, 2011).

Tabela 2.8. Pregled identifikovanih flavonoida u gljivama

Flavonoidi	Vrsta gljive	Referenca
Kercetin	<i>Suillus luteus</i> , <i>Suillus granulatus</i> , <i>Flammulina velutipes</i> , <i>Agaricus blazei</i> , <i>Sparassis crispa</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Inonotus obliquus</i> , <i>Lactarius sanguifluus</i> , <i>Lactarius semisanguifluus</i> , <i>Russula delica</i> , <i>Suillus bellinii</i> .	Ribeiro i sar., 2006; Kim i sar., 2008; Kalogeropoulos i sar., 2013
Rutin	<i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> .	Valentao i sar., 2005; Jayakumar i sar., 2011
Kaempferol	<i>Sparassis crispa</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Inonotus obliquus</i> , <i>Suillus bellinii</i> , <i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Lactarius sanguifluus</i> , <i>Lactarius semisanguifluus</i> .	Kim i sar., 2008; Kalogeropoulos i sar., 2013
Miricetin	<i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Agaricus blazei</i> , <i>Ganoderma lucidum</i>	Kim i sar., 2008
Krisin	<i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Lactarius sanguifluus</i> , <i>Lactarius semisanguifluus</i> , <i>Russula delica</i> , <i>Suillus bellinii</i>	Jayakumar i sar., 2011; Kalogeropoulos i sar., 2013
Katehin	<i>Lentinus edodes</i> , <i>Agaricus blazei</i> , <i>Ganoderma lucidum</i>	Kim i sar., 2008
Hesperetin	<i>Ganoderma lucidum</i>	Kim i sar., 2008
Naringenin	<i>Sparassis crispa</i>	Kim i sar., 2008
Naringin	<i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Inonotus obliquus</i>	Kim i sar., 2008
Formometin	<i>Ganoderma lucidum</i>	Kim i sar., 2008
Biohanin	<i>Ganoderma lucidum</i>	Kim i sar., 2008
Pirogalol	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Flammulina velutipes</i> , <i>Agaricus blazei</i> , <i>Sparassis crispa</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Phellinus linteus</i>	Kim i sar., 2008

Flavonoidi	Vrsta gljive	Referenca
Resveratrol	<i>Sparassis crispa</i> , <i>Inonotus obliquus</i> ,	Kim i sar., 2008
Genistein	<i>Lactarius sanguifluus</i> <i>Russula delica</i> , <i>Suillus bellinii</i>	Kalogeropoulos i sar., 2013

Flavonoidi već duže vreme privlače pažnju naučne javnosti zbog efekta unapređena zdravlja kroz različite mehanizme antioksidativnog, antiinflamatornog i antiproliferativnog delovanja. Ova jedinjenja pokazuju antioksidantnu aktivnost tipičnu za polifenolna jedinjenja, kroz mogućnost doniranja vodonika uz formiranje rezonantnog stabilizovanog radikala, kao i mogućnost helacije jona prelaznih metala. Flavonoidi poseduju uporedivu ili nekoliko puta bolju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala u vodenom rastvoru u odnosu na tokoferole i askorbinsku kiselinu. Utvrđeno je da flavoni (apigenin i luteolin inhibiraju proliferaciju niza ćelijskih linija kancera. (Boik, 2001). Pregled identifikovanih flavonoida u gljivama koji su identifikovani u toku poslednje dekade dat je u Tabeli 2.8.

### 2.6.3. Askorbinska kiselina

Vitamin C, askorbinska kiselina spada u grupu vitamina rastvorljivih u vodi i vitamina sa koenzimskim delovanjem. Po hemijskom sastavu je lakton-2-keto-L-glukonska kiselina. Pripada biohemijskim redoks sistemima. Reverzibilno može preći u dehidroaskorbinsku kiselinu koja ima isto vitaminsko dejstvo. Primati, ljudi i još nekoliko vrsta životinje nemaju mogućnost sinteze ovog vitamina u organizmu pa je neophodan unos putem hrane ili dodataka hrani. Smatra se da askorbinska kiselina vrši zaštitnu ulogu protiv bolesti izazvanih oksidativnim stresom, bolesti srca, moždani udar, kancer (Ferreira i sar., 2009). Vitamin C je najjednostavniji vitamin pronađen u nekoliko vrsta gljiva (Tabela 2.1.), efikasan je protiv superoksid anijona, hidroksil radikala, vodonik peroksida, peroksil radikala i singlet kiseonika (Sies i Stahl,1995).

### 2.6.4. Tokoferoli

Naziv vitamin E je zajedničko ime koje se koristi da označi porodicu osam hemijski srodnih jedinjenja iz grupe tokoferola:

- Tokoferoli (Toc) u koje spadaju  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ - tokoferol i
- Tokotrienoli (Toc-3) u koje spadaju  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ - tokotrienoli.

Tokoferoli pripadaju grupi liposolubilnih vitamina (rastvorljivih u mastima). Ulaze u sastav ćelijskih membrana, pa im je glavna antioksidativna uloga da zaštite masne kiseline i druge komponente ćelijske membrane, kao i lipoproteine od oksidacije. Zbog svoje zaštitne uloge hvatača slobodnih radikala, za vitamin E se smatra da štiti organizam od degenerativnih bolesti, kancera, kardiovaskularnih bolesti i starenja. Ova jedinjenja učestvuju u stvaranju reproduktivnih ćelija i

olakšavaju funkciju nervnog sistema. Poslednjih nekoliko godina brojne studije su istraživale sadržaj tokoferola u gljivama Tabela 2.1.

### 2.6.5. Karotenoidi

Karotenoidi su najrasprostranjeniji pigmenti u prirodi, skoro 600 karotenoida je identifikovano u povrću i voću.

Većina ovih jedinjenja se nalaze u malim količinama u niskim koncentracijama uz nisku nutritivnu vrednost. Značajnu pažnju imaju pre svega zbog provitaminske i antioksidativne uloge. Prema strukturi dele se na dve grupe: ksantofili i karoteni. Ksantofili sadrže karboksilnu ili hidroksilnu grupu kao supstituenta na kraju lanca, a predstavnici su: lutein, zeaksantin, kriptoksantin. Karoteni tkz. ugljovodonični karotenoidi, ne sadrže molekule kiseonika, predstavnici su:  $\alpha$  karoten,  $\beta$  karoten, i likopen. Osnovnu strukturu karotenoida čine kovalentno povezane izoprenske jedinice, a na kraju svakog lanca nalazi se ili prsten ili otvoreni lanac, po čemu se karotenoidi međusobno razlikuju. Karotenoidi se smatraju nenutritivnim egzogenim antioksidansima zbog osobina: "hvataju" slobodne radikale, inhibiraju inicijaciju lančane reakcije, zaustavljaju lančane reakcije, sprečavaju delovanje slobodnih radikala koji nastaju oksidacijom LDL-a. Ova jedinjenja pokazuju pozitivne osobine u prevenciji bolesti kod ljudi, uključujući kardiovaskularna oboljenja, kancer i druge hronične bolesti. U poslednjih nekoliko godina antioksidativna svojstva karotenoida su bila u fokusu istraživanja, kao i izvori ovih jedinjenja. Upravo zbog toga je detekcija i karakterizacija ovih jedinjenja u gljivama sve više prisutna u istraživačkim studijama (Tabela 2.1).

### 2.6.6. Terpenoidi

Terpeni čine široku klasu lipofilnih sekundarnih metabolita opšte hemijske strukture  $C_{10}H_{16}$ . U prirodi se javljaju u vidu *diterpena*, *triterpena* i *tetraterpena* (karotenoida) -  $C_{20}$ ,  $C_{30}$ ,  $C_{40}$ , kao i u obliku *hemiterpena* i *seskviterpena* -  $C_5$ ,  $C_{15}$ . Ukoliko sadrže dodatne elemente (najčešće kiseonik u sastavu hidroksilne i karbonilne grupe), nazivaju se terpenoidi (Cowan, 1999). Terpenoidi vode poreklo od prostih acikličnih jedinjenja, izoprena i mevalonske kiseline, a njihova struktura može biti aciklična, monociklična ili biciklična. Za sve animalne i fungalne ćelije karakterističan je mevalonski put sinteze izopentilpirofosfata (IPP-a), dok većina biljaka, bakterije, aktinomicete i protozoe imaju nemevalonski put sinteze, koji inače ne postoji ni kod ljudi (Karaman, 2009).

Kod gljiva podrazdela Basidiomycota najviše se sreću triterpenoidi, među kojima su triterpenoidi lanostanskog skeleta najzastupljeniji i najodgovorniji za različite biološke efekte (antiinfektivne, citotoksične, imunomodulativne), koje ispoljavaju predstavnici familija Polyporaceae i Ganodermataceae. To su ganoderenična, ganodermična i aplanoksidična kiselina, ganoderol, lucidon, ganodermanondiol i ganodermanontriol. Ova jedinjenja se dele u 10 grupa, zavisno od broja ugljenikovih atoma u njihovom prstenu i stepena oksidacije. Smatra se da se njihova biološka aktivnost ostvaruje sličnim mehanizmima kojima deluju i  $\beta$ -glukani. Ova jedinjenja aktiviraju NF-kB put i modulišu Ras/Erk, c-myc, CREB protein i mitogen aktivirajuću protein-kinazu, podstičući i

druge aktivnosti imunog sistema. Mehanizmi velikog broja triterpenoidnih struktura još nisu dovoljno poznati (Zaidman i sar., 2005).

### 2.6.7. Steroli

Ergosterol je osnovni sterol fungalne ćelijske membrane i za nju je čvrsto vezan (Weete i sar., 2010). Većina fungalnih sterola (npr. ergosterol) sadrže 28 ugljenikovih atoma (Matilla i sar., 2002). U gljivama su identifikovani različiti steroli; fungisterol, ergosta-5-7-dienol, 24-metil holesterol i metilen holesterol (Weete i Gandhi, 1997). Brojna naučna istraživanja pokazuju da ergosterol i njegovi produkti peroksidacije doprinose zdravlju, u smislu smanjenja bola koji je izazvan zapaljenskim procesima, učestalosti kardiovaskularnih bolesti, a poseduju antimikrobno i antitumorsko delovanje (Shao i sar., 2010). Antitumorsko delovanje ergosterola povezuje se sa direktnom inhibicijom angiogeneze indukovane tumorom. Ergosterol se apsorbira u digestivnom traktu, akumulira, i može biti metabolisan *in vivo* u nove bioaktivne produkte kao što je 17, 24-dihidroksiergosterol (Slominski i sar., 2005).

Ergosterol prisutan u gljivama (Tabela 2.9.) je prekursor vitamina D<sub>2</sub>, pošto se konvertuje u ovaj vitamin pomoću UV zračenja (Jasinghe i Perera, 2005). Vitamin D<sub>2</sub> ima značajnu ulogu u regulaciji nivoa kalcijuma i fosfora (Greer i Marshall, 1989). Klinička istraživanja ukazuju na uticaj između nivoa vitamina D i kardiovaskularnih bolesti. Nizak nivo vitamina D smatra se jednim od uzroka kongestivne bolesti srca (Pilz i sar., 2008). Istraživanjem je utvrđeno, da vitamin D ima protektivnu ulogu u prevenciji kolorektalnog kancera, kancera dojke, prostate i kancera jajnika (Rossi i sar., 2009).

Tabela 2.9. Sadržaj ergosterola u mg/100g

Ergosterol		Ergosterol		Ergosterol	
Vrsta gljive		Vrsta gljive		Vrsta gljive	
<i>Agrocybe egerita</i>	50,1	<i>Macrolepiota procera</i>	191,0	<i>Agaricus bisporus</i>	654*
<i>Amanita caesarea</i>	137,0	<i>Mycena rosea</i>	32,8	<i>A. bisporus</i>	
<i>Amanita muscaria</i>	78,6	<i>Lactarius controversus</i>	58,6	<i>/smeđi</i>	602*
<i>Agaricus sylvicola</i>	145,0	<i>Russula delica</i>	16,9	<i>Pleurotus ostreatus</i>	674*
<i>Amanita vaginata</i>	240,0	<i>Rhizopogon luteolus</i>	92,9	<i>Lentinus edodes</i>	674*
<i>Boletus edulis</i>	123,0	<i>Suillus bovinus</i>	123,0		

Vrsta gljive	Ergosterol	Vrsta gljive	Ergosterol	Vrsta gljive	Ergosterol
<i>Collybia butyracea</i>	81,8	<i>Sarcodon imbricatus</i>	160,0		
<i>Clitocybe dealbata</i>	95,8	<i>Tricholoma acerbum</i>	87,7		
<i>Hebeloma sinapizans</i>	107,0	<i>Tricholoma equestre</i>	22,1		
<i>Lactarius aurantiacus</i>	86,6	<i>Tricholoma portentosum</i>	125,0		
<i>Lycoperdon perlatum</i>	79,4				

**\*Sadržaj sterolnih jedinjenja u svežem uzorku**

## 2.6.8. Proteini

Proteini koji deluju inhibitorno na mikroorganizme vrlo se često nalaze u organizmima biljnih i životinjskih vrsta, dok je njihovo prisustvo u gljivama retko (Wang i Ng, 2006). Smatra se da su ovi proteini često pozitivno naelektrisani, a da se mehanizam njihovog dejstva ostvaruje formiranjem jonskih kanala na ćelijskim membranama mikroorganizama, kao i kompetitivnim vezivanjem za polisaharidne receptore ćelija domaćina (Cowan, 1999). Iz makrogljiva je do sada izolovano nekoliko proteina i peptida čije je dejstvo pretežno antiviralno, antimikrobno, imunomodulatorno i antikancerogeno. (Tabela 2.10.).

Tabela 2.10. Pregled bioaktivnih proteina i proteinskih ekstrakta sa potvrđenom biološkom aktivnošću

Supstanca/ ekstrakt	M.m. kDa	Vrsta gljive	Target	Referenca
Antifungalna aktivnost alveolarin	14	<i>Polyporus avleolaris</i>	<i>Mycosphaerella arachidicola</i> , <i>Physalospora piricola</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	Wang i sar., 2004
agrocibin	9	<i>Agrocybe cylindracea</i>	<i>M. arachidicola</i>	Ngai i sar., 2005
CMP	12	<i>Cordyceps militaris</i>	<i>F. oxysporum</i>	Park i sar., 2009
kordimin	10.9	<i>Cordyceps militaris</i>	<i>Bipolaris maydis</i> , <i>M. arachidicola</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Candida albicans</i>	Wong i sar., 2011
eringin	10	<i>Pleurotus eryngii</i>	<i>F. oxysporum</i> ,	Wong i sar.,

Supstanca/ ekstrakt	M.m. kDa	Vrsta gljive	Target	Referenca
			<i>M. arachidicola</i>	2004
ganodermin	15	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>B. cinerea</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>P. piricola</i>	Wong i sar., 2006
hipsin	20	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	<i>M. arachidicola</i> , <i>P.</i> <i>piricola</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>B. cinerea</i>	Lam i Ng, 2001
lentin	27.5	<i>Lentinus edodes</i>	<i>P. piricola</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>M. arachidicola</i>	Xu i sar., 2011
lioflin	20	<i>Lyophyllum shimeiji</i>	<i>P. piricola</i> , <i>M. arachidicola</i>	Lam i Ng, 2001
pleurostrin	7	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>F. oxysporum</i> , <i>M. arachidicola</i> , <i>P.</i> <i>piricola</i>	Chu i sar., 2005
RNase	12	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	<i>F. oxysporum</i> , <i>M. arachidicola</i>	Ngai i Ng, 2004
trihogin	27	<i>Tricholoma giganteum</i>	<i>F. oxysporum</i> , <i>M. arachidicola</i> , <i>P.</i> <i>piricola</i>	Guo i sar., 2005
HM-af	95	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	<i>Flammulina velutipes</i>	Suzuki i sar., 2011
lektin	15	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Fusarium oxysporium</i> , <i>Penicillium</i> <i>chrysogenum</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Colletotrichum musae</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Trichophyton tonsurans</i> , <i>Trichophyton</i> <i>interdigitale</i> , <i>Epidermophyton</i> <i>floccosum</i> <i>Microsporum canis</i>	Girjal i sar., 2011
Antibakterijska aktivnost C. sinopica	22	<i>Clitocybe sinopica</i>	<i>Agrobacterium</i> <i>rhizogenes</i> , <i>A. tumefaciens</i> , <i>A. vitis</i> , <i>Xanthomonas oryzae</i> , <i>X.</i> <i>malvacearum</i>	
RNase	12	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	<i>P. aeruginosa</i> ,	Ngai i Ng, 2004



Supstanca/ ekstrakt	M.m. kDa	Vrsta gljive	Target	Referenca
			<i>P. fluorescens</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	
Antiviral kordimin	10.9	<i>Cordyceps militaris</i>	HIV-1 reverzna transkriptaza	Wong i sar., 2011
GFAHP	29.5	<i>Grifola frondosa</i>	herpes simpleks virus-1	Gu i sar., 2007
Polisaharopeptid (PSP)	/	<i>Trametes versicolor</i>	HIV-1 reverzna transkriptaza, virusna glikozilacija	Collins i Ng, 1997
šizolizin		<i>Shizophyllum commune</i>	HIV-1 reverznatranscriptase	Han i sar., 2010
trihogin	27	<i>Tricholoma giganteum</i>	HIV-1 reverse kriptaza	Guo i sar., 2005
T. giganteum lakaze	43	<i>Tricholoma giganteum</i>	HIV-1 reverzna transkriptaza	Wang i Ng, 2004 b
velutin	13.8	<i>Flammulina velutipes</i>	HIV-1 reverzna transkriptaza	Wang i Ng, 2001
marmorin	9	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	HIV-1 reverzna transkriptaza	Wong i sar., 2008
lakaze	67	<i>Lentinus edodes</i>	HIV-1 reverzna transkriptaza	Sun i sar., 2011
lakaze	58	<i>Agrocybe cylindracea</i>	HIV-1 reverzna transkriptaza	Hu i sar., 2011
RNaze	20	<i>Schizophyllum commune</i>	HIV-1 reverzna transkriptaza	Zhao i sar., 2011
metaloproteaze	21	<i>Lepista nuda</i>	hepatom- Hep G2, leukemia L1210	Wu i Ng, 2011
kordisobin	31	<i>Cordyceps sobolifera</i>	HIV-1 reverzna transkriptaza	Wang i sar., 2012
Nematocidna aktivnost Lektini CGL2,	15-	<i>Coprinopsis cinerea,</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Ng i Wang, 2004
XCL, AAL, TAP1, SSA	30	<i>Xerocomus chrysenteron,</i> <i>Aleuria aurantia, Sordaria</i> <i>macrospora, Sclerotinia</i> <i>sclerotiorum</i>		
Lektin MOA	32	<i>Marasmius oreades</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Wohlschlager i sar., 2011
Antiparazitska aktivnost Lektini CGL2, CNL, AAL, TAP1, SSA		<i>Coprinopsis cinerea,</i> <i>Clitocybe nebularis,</i> <i>Aleuria aurantia,</i> <i>Sordaria macrospora,</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Acanthamoeba</i> <i>castellanii</i>	Ng i Wang, 2004

Supstanca/ ekstrakt	M.m. kDa	Vrsta gljive	Target	Referenca
Antiproliferativna i antikancerogena aktivnost				
kalvacin	16.9	<i>Calvatia gigantea</i>	Različiti kanceri i ćelijske linije	Byerrum i sar., 1957
CMP	12		Različiti kanceri i ćelijske linije	Park i sar., 2009
kordimin	10.9		Različiti kanceri i ćelijske linije	Wong i sar., 2011
lo, Flo-A FIII-1-a/b,	4	<i>Pleurotus citrinopileatus,</i>	Različiti kanceri i ćelijske linije	Zhang i sar., 1994
FIII-2-a/b, PCP-3Ai KS-2 glikoproteini	2	<i>Ganoderma tsugae,</i> <i>Lentinus edodes</i>	Različiti kanceri i ćelijske linije	
GI-PP	512.5	<i>Ganoderma lucidum</i>	Različiti kanceri i ćelijske linije	Cao i Lin, 2006
lektin	12-190	<i>Agaricus bisporus,</i> <i>Agrocybe aegerita,</i> <i>Amanita pantherina,</i> <i>Boletus satanas,</i> <i>Clitocybe geotropa,</i> <i>Coprinus cinereus,</i> <i>Ganoderma carpense,</i> <i>Ganoderma lucidum,</i> <i>Grifola frondosa,</i> <i>Flammulina velutipes,</i> <i>Hericium erinaceus,</i> <i>Inocybe umbrinella,</i> <i>Ischnoderma resinosum,</i> <i>Lactarius deterrimus,</i> <i>Tricholoma mongolicum,</i> <i>Pleurotus ostreatus,</i> <i>Pholiota adiposa,</i> <i>Agaricus arvensis</i>	Različiti kanceri i ćelijske linije  Različiti kanceri i ćelijske linije	Wang i Ng, 2001; Pohleven i sar., 2009; Zhao i sar., 2011
Polisaharid-peptid kompleks (PSPC)		<i>Tricholoma sp., Pleurotus abalonus</i>		Ng, 1998
Rnaze	P			Wong i sar., 2008; Ngai i Ng, 2004
ubihitin-sličan peptid	9	<i>Cantharellus cibarius</i>	Različiti kanceri i ćelijske linije kancera	Wang i sar., 2003
lakaze	58	<i>Agrocybe cylindracea</i>		Hu i sar., 2011

Supstanca/ ekstrakt	M.m. kDa	Vrsta gljive	Target	Referenca
metaloprote- aze	21	<i>Lepista nuda</i>		Wu i Ng, 2011
alkaline proteaze ekstrakt	15	<i>Amanita farinosa</i> <i>Calvatia lilacina</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Volvariella volvacea</i> , <i>Armillaria mellea</i> , <i>Grifola frondosa</i> , <i>Ganoderma frondosa</i> , <i>Codyceps militaris</i> , <i>Hericium erinaceus</i> , <i>Coriolus versicolor</i> , <i>Agaricus Blazei</i> , <i>Lycium chinense</i>	Različiti kanceri i ćelijske linije	Sun i sar., 2011 Wu i sar., 2010; Han i sar., 2008
Imunomodularna aktivnost ubihitin-sličan peptid MLP frakcija	95	<i>Agrocybe cylindracea</i> <i>Grifola frondosa</i>	Imuni sistem	Ngai i sar., 2003; Kodama i sar., 2003
proteinska frakcija LZ-8, FIP-fve, FIP-vvo, FIP-gts, FIP-gja, GMI, ACA	12-16	<i>Volvariella volvacea</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Flammulina velutipes</i> , <i>Volvariella volvacea</i> , <i>Ganoderma tsugae</i> , <i>Ganoderma japonicum</i> , <i>Ganoderma microsporum</i> , <i>Antrodia camphorata</i>		Jeurink i sar., 2008 Hsiao i sar., 2008; Sheu i sar., 2009
glikoprotein PCP-3A	45	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>		Chen i sar., 2009; Chen i sar., 2011
TVC ekstrakti	15	<i>Trametes versicolor</i> <i>Hypsizigus marmoreus</i>		Li i sar., 2011
<i>Ribozom inaktivirajući proteini</i> adustin	38	<i>Polyporus adustus</i>	ribozomi/procesi traslacije	Ng i Wang, 2004a

Supstanca/ ekstrakt	M.m. kDa	Vrsta gljive	Target	Referenca
Kalkalin (calcalin)	16	<i>Calvatia caelata</i>		Ng i sar., 2003
flamin		<i>Flammulina velutipes</i>		Ng i Wang, 2004 b
flamulin		<i>Flammulina velutipes</i>		Wang i Ng, 2000
hipsin		<i>Hypsizygus marmoreus</i>		Lam i Ng, 2001a
marmorin		<i>Hypsizygus marmoreus</i>		Wong i sar., 2008
liophilin		<i>Lyophyllum shimeji</i>		Lam i Ng, 2001b
pleuturegin	38	<i>Pleurotus tuber-regium</i>		Wang i Ng, 2001b
velin	19	<i>Flammulina velutipes</i>		Ng i Wang, 2004 b
velutin	13,8	<i>Flammulina velutipes</i>		Wang i Ng, 2001a

\*Molekulska masa

## 2.7. Ispitivane vrste gljiva

### 2.7.1. *Laetiporus sulphureus* (Fr.) Murr.



<b>Regnum:</b>	Fungi
<b>Phylum:</b>	Basidiomycota
<b>Classis:</b>	Agaricomycetes
<b>Ordo:</b>	Polyporales
<b>Familia:</b>	Polyporaceae
<b>Genus:</b>	<i>Laetiporus</i>
<b>Species:</b>	<i>L. sulphureus</i>

Slika.2.1. *Laetiporus sulphureus*

([www.mushroomexpert.com](http://www.mushroomexpert.com))

**Narodni nazivi:** šumsko pile (srpski)

**Ekologija:** Raste na živom ili mrtvom listopadnom drveću (*Prunus*, *Pyrus*, *Robinia*, *Populus*, *Salix*) i ponekad na četinarima (*Larix*). Plodna tela se formiraju od proleća do jeseni.

**Upotrebljivost:** Jestiva, preporučuju se mladi primerci gljive, sočnog, mekanog plodnog tela. Za ovu vrstu je karakteristična tekstura i aroma koja podseća na pileće meso, pa je upravo zbog ovih osobina Britanci nazivaju "Chicken of the woods", što bi u prevodu značilo šumsko pile. Ova gljiva je posebno cenjena u nekim zemljama (npr. SAD, Nemačka, Velika Britanija), gdje se mnogo konzumira i smatra delikatesom. Na osnovu dosadašnjih istraživanja ova vrsta se odlikuje mnoštvom bioaktivnih molekula kao što su, polifenolna jedinjenja, vitamini, nezasićene masne kiseline, šećeri, proteini, što govori u prilog da poseduje značajnu nutritivni i farmakološki potencijal te da se može koristiti kao lekovit sastojak hrane ili kao izvor bioaktivnih sastojaka u formi funkcionalne hrane i nutraceutika. Brojne studije potvrđuju antioksidativnu aktivnost različitih ekstrakata vrste *L. sulphureus* (Turkoglu i sar., 2007; Karaman, 2009; Hwang i Yun, 2010; Karaman i sar., 2010; Klaus i sar., 2013; Petrović i sar., 2014); antimikrobnu (Turkoglu i sar., 2007; Karaman, 2009; Ramesh i Pattar, 2010; Šiljegović i sar., 2011; Ozen i sar., 2011; Alves i sar., 2012; Petrović i sar., 2013; Stajic i sar., 2013) i antikancerogenu (Petrović i sar., 2014; He i sar., 2015).

### 2.7.2. *Meripilus giganteus* (Pers.:Pers.) Karst.



Slika 2.2. *Meripilus giganteus* (www.hlasek.com)

<b>Regnum:</b>	Fungi
<b>Phylum:</b>	Basidiomycota
<b>Classis:</b>	Basidiomycetes
<b>Ordo:</b>	Polyporales
<b>Familia:</b>	Meripilaceae
<b>Genus:</b>	<i>Meripilus</i>
<b>Species:</b>	<i>M. giganteus</i>

**Narodni naziv:** polypore géant (francuski), veliki žbun, jastrebača (srpski)

**Ekologija:** Najčešće parazitira na bukvi i hrastu, napadajući obično stara i obolela stabla i izazivajući belu trulež. Takođe živi kao saprotrof na panjevima i mrtvom korenju. Pojavljuje se od ranog leta do kasne jeseni.

**Upotrebljivost:** Jestiva, preporučuje se kada je mlada, tada je plodno telo debelo i sočno, krem boje. Kada se plodno telo raširi, postaje tanko žilavo i gotovo drvenasto. Ova vrsta je odlikuje prijatnom aromom svojstvenom za gljive. Dosadašnja istraživanja govore o sadržaju bioaktivnih molekula: polifenolnih jedinjenja, nezasićenih masnih kiselina, sterola kao i o antioksidantnoj, antimikrobnoj i citotoksičnoj aktivnosti (Narbe i sar., 1991; Karaman i sar., 2010; Tomasi i sar., 2004; Karaman i sar., 2009a, b, 2010, 2013; Alves i sar., 2012; Rai i sar., 2013; Khatua i sar., 2013).

### 2.7.3. *Auricularia auricula judae* (Bull.:Fr.)Wettstein



Slika 2.3. *Auricularia auricula judae*

([www.pinterest.com](http://www.pinterest.com))

<b>Regnum:</b>	Fungi
<b>Phylum:</b>	Basidiomycota
<b>Classis:</b>	Agaricomycetes
<b>Ordo:</b>	Auricularial
<b>Familia:</b>	Auriculariaceae
<b>Genus:</b>	<i>Auricularia</i>
<b>Species:</b>	<i>A. auricula-judae</i>

**Narodni naziv:** šumsko uvo, zovino uvo, Judino uvo (srpski), Jews ear (engleski), Kikurage (japanski), Mu Er (kineski)

**Ekologija:** Raste na mnogim vrstama drvenastih biljaka, najčešće na zovi i brestu, pre svega na ostarelim stablima, plodna tela se mogu naći tokom cele godine, ali ju je najlakše naći u kasnu jesen, tokom zime, i u proleće kada je vlažno.

**Upotrebljivost:** Jestiva, obožavaju je narodi Dalekog istoka zbog specifične teksture plodnog tela ali i medicinskih svojstva. Tradicionalna upotreba ove vrste na Dalekom Istoku još od drevnih vremena, zainteresovala je naučnu javnost u cilju definisanja pozitivnih efekata na zdravlje. Brojne su studije identifikovale i potvrdile biološku aktivnost ove vrste, uključujući antioksidativnu (Acharya i sar., 2004; Poucheret i sar., 2006; Kho i sar., 2009; Piljac-Zegarac i sar., 2011; Hua i sar., 2014;) redukciju hiperlipidemije, tipične hiperholesterolemije (Chen i sar., 2011; Zhao i sar., 2015), antitumorsku aktivnost (Zhang i sar., 2006; Reza i sar., 2011; Reza i sar., 2012). Bioaktivna jedinjenja polifenolnog tipa: p-hidroksibenzojeva kiselina, katehinska, galna kiselina i kafena kiselina, detektovana kod ove vrste doprinose njenoj bioaktivnosti (Oke i Aslim, 2011).

#### 2.7.4. *Fistulina hepatica* Schäff.:Fr.



Slika 2.4. *Fistulina hepatica*

([www.naturefg.com](http://www.naturefg.com))

**Narodni naziv:** Goveđi jezik, Jetrenka (srpski).

**Ekologija:** Raste u bazi stabala, kao i na panjevima širokolisnog drveća, najčešće na hrastu. Plodna tela obrazuje između jula i oktobra.

**Upotrebljivost:** Jestiva, dok je mlada, stariji primerci se ne preporučuju za jelo. Može da se koristi sveža i termički obrađena. Ovu vrstu karakteriše pikantan kiseo ukus, dok aroma nije izražena. Ekstrakti ove vrste pokazuju antioksidativnu, antibakterijsku aktivnost (Heleno i sar., 2010; Giri i sar., 2012). Giri i sar., 2012, su utvrdili aktivnost ekstrakata ove vrste protiv-Gram negativnih sojeva (*Proteus vulgaris* i *Escherichia coli*), dok su Alves i sar., 2012, utvrdili aktivnost metanolnih ekstrakata na Gram-pozitivne pri koncentraciji od 20 mg/ml i Gram-negativne kliničke sojeve koji pokazuju antibiotsku rezistenciju. Detektovane fenolne kiseline: kafena, p-kumarinska i elagična doprinose bioaktivnosti vrste *F. hepatica* (Ribeiro i sar., 2007; Alves i sar., 2012).

<b>Regnum:</b>	Fungi
<b>Phylum:</b>	Basidiomycota
<b>Classis:</b>	Agaricomycetes
<b>Ordo:</b>	Agaricales
<b>Familia:</b>	Fistulinaceae
<b>Genus:</b>	<i>Fistulina</i>
<b>Species:</b>	<i>F. hepatica</i>



### 2.7.5. *Lactarius contraversus* (Pers. ex Fr.)



Slika 2.5. *Lactarius contraversus*

([www.nahuby.sk](http://www.nahuby.sk))

**Narodni naziv:** Topolova mlečenica

**Ekologija:** Prema ekologiji pripada terikolnim vrstama. Raste u listopadnim šumama, česta je pod topolama u jesen.

**Upotrebljivost:** Uslovno jestiva, posle termičkog tretmana jestiva. U dostupnim publikacijama puno je podataka koji se odnose na tradicionalno jestive predstavnike genusa *Lactarius*, dok su podaci za ovu vrstu skromni. Prema istraživanjima Novaković i sar., 2015, vrsta poseduje značajnu antioksidantnu, antibakterijsku i citotoksičnu aktivnost.

<b>Regnum:</b>	Fungi
<b>Phylum:</b>	Basidiomycota
<b>Classis:</b>	Agaricomycetes
<b>Ordo:</b>	Russulales
<b>Familia:</b>	Russulaceae
<b>Genus:</b>	<i>Lactarius</i>
<b>Species:</b>	<i>L. contraversus</i>

### 2.7.6. *Armillaria mellea* (Vahl ex Fr.) P. Karst



Slika 2.6. *Armillaria mellea*

([www.pharmanatur.com](http://www.pharmanatur.com))

**Ekologija:** Spada u lignikolne gljive bele truleži. Parazitira na raznim stablima belogorice, a zatim nastavlja ko saprobiont na panjevima, najčešća je u hrastovim šumama. Javlja se sredinom jeseni.

**Upotrebljivost:** Uslovno je jestiva, posle termičkog tretmana jestiva, a za jelo se preporučuju klobuci. Gljiva se odlikuje aromom svojstvenom za gljive, sveža, ima gorak ukus. Brojne studije su pokazale prisustvo različitih grupa organskih jedinjenja, uključujući ugljene hidrate, sterole, sfingolipide, masne kiseline, seskviterpene, nehalucinogene indole, peptide, enzime, adenzin derivate itd. Većina ovih metabolita imaju potencijalno terapijske i nutritivne vrednosti (Li i sar., 2005; Muszynska i sar., 2011). Istraživači Kineske akademije nauka u Kunming otkrili su jedinjenje koje pripada sfingolipidima, *armilaramid* čija je struktura (2S,3S,4R)-2-heksadekanoil-amino-octadekan (hexadecanoyl-amino-octadecane)-1,3,4-triol. Ova grupa lipidnih jedinjenja podstiče veliko interesovanje naučne javnosti, zbog potencijalne biološke aktivnosti: antikancerogena, hepatoprotektivna i imunostimulativna aktivnost (Gao i sar., 2001; Muszynska i sar., 2011). Peptid prozomatostatin poseduje antikancerogena svojstva, sa dokazanom efikasnošću posebno protiv kancera pankreasa (Conlon i sar., 1987); armilarična kiselina inhibira Gram-negativne bakterije i kvasce (Obuchi i sar., 1990); AMG1 6-(5-hidroksi-2-piridil-metilamino)-9-β-ribofuranozilpurin-, derivat adenzina koji ima neuroprotektivne karakteristike (Watanabe i sar., 1990). *In vitro* i *in vivo* studije pokazale su terapijsko dejstvo *A. mellea* u ublažavanju simptoma bolesti kao što su epilepsija, glavobolje, nesanic i parapareza što je rezultat antikonvulzivne, sedativne, hipotenzivne i vazodilatorske aktivnosti koja je posledica poboljšanja cerebralne cirkulacije (Ojemann i sar., 2006; Muszynska i sar., 2011).

<b>Regnum:</b>	Fungi
<b>Phylum:</b>	Basidiomycota
<b>Classis:</b>	Agaricomycete
<b>Ordo:</b>	Agaricales
<b>Familia:</b>	Marasmiaceae
<b>Genus:</b>	<i>Armillaria</i>
<b>Species:</b>	<i>A. mellea</i>

### 2.7.7. *Lycoperdon perlatum* Pers. ex Pers.



Slika 2.7. *Lycoperdon perlatum*  
(www.naturefg.com)

<b>Regnum:</b>	Fungi
<b>Phylum:</b>	Basidiomycota
<b>Classis:</b>	Agaricomycetes
<b>Ordo:</b>	Agaricales
<b>Familia:</b>	Agaricaceae
<b>Genus:</b>	<i>Lycoperdon</i>
<b>Species:</b>	<i>L. perlatum</i>

**Ekologija:** Pripada terikolnim vrstama gljiva. Javlja se od ranog proleća do kasne jeseni tokom kišnog perioda na mestima koja duže zadržavaju vlagu. Izuzetno česta i rasprostanjena vrsta.

**Upotrebljivost:** Jestiva dok je mlada, dok je gleba sasvim bela. Iz ove vrste izolovano je nekoliko sterolnih derivata, (S)-23-hidroksilanol, ergosterol  $\alpha$ -endoperoksid, ergosterol 9,11-dehidroendoperoksid i (23E)-lanosta-8,23-dien-3 $\beta$ ,25-diol. Komponente 3-oktanon-, 1-okten-3-ol, i (Z)-3-okten-1-ol su dominantne komponente odgovorne za prijatan ukus i aromu ove puhare (Szumny i sar., 2010). Ekstrakti ove vrste sadrže antimikrobne komponente koje pokazuju značajnu antibakterijsku aktivnost protiv *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella enterica*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium smegmatis* i antifungalnu prema *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, i *Verticillium dahlia* (Ramesh i sar., 2010; Dulger, 2005). Studije su pokazale da ova vrsta sadrži cimetnu kiselinu i pigment melanin (Almendros i sar., 1987; Barros i sar., 2009).

### 2.7.8. *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer



Slika 2.8. *Macrolepiota procera*  
([www.naturefg.com](http://www.naturefg.com))

<b>Regnum:</b>	Fungi
<b>Phylum:</b>	Basidiomycota
<b>Classis:</b>	Agaricomycetes
<b>Ordo:</b>	Agaricales
<b>Familia:</b>	Agaricaceae
<b>Genus:</b>	<i>Macrolepiota</i>
<b>Species:</b>	<i>M. procera</i>

**Ekologija:** Po ekologiji spada u terikolne gljive. Naseljava sve tipove šuma, livade, pašnjake, od nizija do planina, tokom leta i jeseni.

**Upotrebljivost:** Jestiva gljiva odličnog kvaliteta, može se i uzgajati. Detekcija brojnih polifenolnih komponenti kao što su protokatehinska, galna, gentizinska, vanilična, siringinska, cimetna, p-kumarinska, kafena, ferulična, taninska kiselina (Puttaraju i sar., 2006; Barros i sar., 2009; Ferreira i sar., 2009) ukazuje na značajan potencijal kada su u pitanju molekule koje se dovede u vezu ili za koje je dokazana bioaktivnost. Arora i sar., 2013 su ustanovili citotoksični efekat etanolnog ekstrakta prema ćelijskim linijama kancera dojke, bubrega i debelog creva, dok su Nowacka i sar. 2014 ustanovili antibakterijsku aktivnost u odnosu na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterijske sojeve.

### 2.7.9. *Coprinellus disseminatus* (Pers.) Gray



<b>Regnum:</b>	Fungi
<b>Phylum:</b>	Basidiomycota
<b>Classis:</b>	Agaricomycetes
<b>Ordo:</b>	Agaricales
<b>Familia:</b>	Coprinaceae
<b>Genus:</b>	<i>Coprinus</i>
<b>Species:</b>	<i>C. disseminatus</i>

Slika 2.9. *Coprinellus disseminates*

([www.naturefg.com](http://www.naturefg.com))

**Ekologija:** Spada u terikolne gljive. Saprobnna, raste u grupama i do stotinu jedinki. Najčešće se nalazi na trulom drveću u blizini panjeva.

**Upotrebljivost:** Jestiva. Veoma je česta vrsta (Kuo, 2008) koja zbog nežnog i sitnog plodnog tela nije atraktivna ljubiteljima gljiva. Vrlo su oskudni podaci o ovoj vrsti, prema našim saznanjima postoje dve novije publikacije koje se odnose na citotoksično delovanje ekstrakata micelije u odnosu na ćelijsku liniju kancera dojke, izazivajući ćelijsku smrt apoptozom, antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost (Gu i Leonard, 2006; Al-Fatimi i sar., 2013).

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Potreba savremenog čoveka za iznalaženje novih supstanci prirodnog porekla sa biološkim i farmakološkim potencijalom, sve više je prisutna u svakodnevnom životu, kao i interesovanje ljudi za preparate sa lekovitim svojstvima baziranim na iskustvima tradicionalne medicine, koja se sve više koriste u terapiji i prevenciji različitih zdravstvenih poremećaja.

Polazeći od pretpostavke o mogućoj upotrebi autohtonih gljiva kao nutraceutika, tj. u prevenciji i lečenju različitih oboljenja koja se javljaju najčešće kao posledica oksidativnog stresa, ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije bili su sledeći:

- odabir jestivih vrsta gljiva koje su prisutne na terenu i za koje je iskustveno potvrđeno da se konzumiraju često u ishrani ljudi, tačnije predstavljaju cenjene divlje rastuće vrste;
- determinacija gljiva klasičnim postupkom uz pomoć ključeva za determinaciju;
- priprema ekstrakata liofiliziranih plodnih tela gljiva u vodi i etanolu;
- Hemijska identifikacija biomolekula prisutnih u ekstraktima odabranih vrsta gljiva:
  - spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenola i flavonoida biohemijskim testovima *in vitro*;
  - identifikacija i kvantifikacija odabranih fenolnih jedinjenja, HPLC-MS/MS (tačna hromatografija sa masenom spektrometrijom);
  - detekcija masnih kiselina, primenom GC (gasna hromatografija);
  - određivanja sadržaja mikro- i makro elemenata, primenom AAS (atomsom apsorpcionim spektrofotometrijom);
  - određivanje sadržaja ukupnih proteina;
  - karakterizacija proteinskih frakcija odabranih vrsta pomoću elektroforetskog razdvajanja automatskom Lab-on-a-Chip kapilarnom elektroforezom;
- Ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata odabranih vrsta gljiva:
  - određivanje antioksidantnog potencijala ekstrakata *in vitro* kao, "hvatača" slobodnih radikala: DPPH•, OH•, SOA• i NO• ("scavengera") i njihovog redukcionog kapaciteta (FRAP testom);
  - određivanje antimikrobne aktivnosti *in vitro* odabranih ekstrakata gljiva,
  - određivanje antiproliferativne aktivnosti ekstrakata i frakcija ekstrakata *in vitro* na ćelijsku liniju kancera dojke MCF-7;
- Korelacija sadržaja biomolekula i biološke aktivnosti

## 4. EKSPERIMENTALNI DEO

### 4.1. Sakupljanje gljiva i priprema uzoraka

Uzorci gljiva koji su korišćeni za istraživanje sakupljeni su na lokalitetu Sikole u blizini Negotina, Istočna Srbija, tokom jeseni 2012. godine. Uzorak vrste *C. disseminatus* sakupljen je u urbanoj zoni grada Novog Sada tokom jeseni 2012. godine.



Slika 4.1. Prikaz lokaliteta na mapi

Svež materijal je determinisan na Departmanu za biologiju i ekologiju PMF-a u Novom Sadu. Deponovanje primeraka jemstva (voucher specimens) obavljeno je u okviru mikološke zbirke herbarijuma na Departmana za biologiju i ekologiju (BUNS Herbarijum), Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.

Prikupljeni uzorci plodnih tela makrogljiva determinisani su i zamrznuti na temperaturi od  $-18^{\circ}\text{C}$  a potom osušeni procesom liofilizacije (za potrebe ove disertacije proces liofilizacije sproveden je u industrijskim uslovima u Kompaniji "Van Drunen Farms", Banatsko Karađorđevo). Osušeni uzorci čuvani su u plastičnim vrećama bez prisustva kiseonika na  $-20^{\circ}\text{C}$ , do trenutka ekstrakcije kada su samleveni na laboratorijskom mlinu do finog praha. Proces mlevenja izvršen je na laboratorijskom mlinu sa kontinualnim hlađenjem u cilju očuvanja uzorka (Knifetec TM 1095, Foss, Hogans, Sweden). U Tabeli 4.1. nalazi se pregled ispitivanih vrsta gljiva, pripremljenih ekstrakata, frakcija i analiza koje su obuhvatile identifikaciju i karakterizaciju jedinjenja u ispitivanim uzorcima.

Tabela 4.1. Pregled ispitivanih vrsta, pripremljenih ekstrakata, frakcija, i analiza koje su obuhvatile identifikaciju i karakterizaciju jedinjenja u ispitivanim uzorcima

Vrsta	Aq	EtOH	MeOH	MeOH 70%	HeOH	Frak.	HPLC - MS/ MS	MK GC	Prot.	LAB- ON- CHIP	AAS
<i>L. sulphureus</i>	*	*		*	*	*		*	*	*	*
<i>M. giganteus</i>	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*
<i>A. auricula-judae</i>	*	*	*		*		*	*	*	*	
<i>F. hepatica</i>	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*
<i>A. mellea</i>	*	*		*	*			*	*	*	*
<i>L. contraversus</i>	*	*	*	*	*		*	*	*		*
<i>M. procera</i>	*	*		*	*	*		*	*	*	*
<i>L. perlatum</i>	*	*			*			*		*	
<i>C. disseminatus</i>	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*

**Aq** - vodeni ekstrakt; **EtOH, MeOH, HEX** - etanolni, metanolni, heksanski ekstrakt; **Frak**- frakcije; **HPLC-MS/MS**; **MK GC**- detekcija masnih kiselina gasnom kromatografijom; **Prot**- Odrađivanje sadržaja proteina; **LAB-ON-CHIP**- elektroforeza; **AAS**-atomska apsorpciona spektrofotometrija.

## 4.2. Postupak priprema ekstrakata

### 4.2.1. Priprema etanolnog, metanolnog i heksanskog ekstrakta

Odmerena masa osušenih samlevenih plodnih tela maceriranja je u rastvaraču, 96% V/V etanolu za etanolne ekstrakte, metanolu za metanolne ekstrakte i heksanu za heksanske ekstrakte (10 ml EtOH, MeOH, HeOH po 1g uzorka), sa sonifikacijom u trajanju od 15 minuta i mućkanje u trajanju 24h u mraku na mešalici pri sobnoj temperaturi. Ekstrakti su profiltrirani, zatim upareni pod sniženim pritiskom na 40°C (u cilju izbegavanja degradacije termolabilnih jedinjenja). Suvi ostatak restituisan je u DMSO (Sigma, Aldrich) i tipično razblažen do koncentracije od 50 mg/ml uz proces uz sonifikaciju (Ultrazvučna kada SONIK 4GT) u trajanju od 15 minuta. Rastvori su do analize čuvani u staklenim vialama na +4°C.

### 4.2.2. Priprema vodenih ekstrakata

Odmerena masa osušenih plodnih tela macerirana je u vodi (10 ml vode po 1g uzorka) na sobnoj temperaturi sa sonifikacijom u trajanju od 15 minuta i mućkanjem u trajanju od 24 h u mraku. Ekstrakti su profiltrirani kroz filter papir, potom liofilizirani. Suvi ostatak restituisan je u DMSO i tipično razblažen do koncentracije od 50 mg/ml. Rastvori su do analize čuvani u staklenim vialama na 4°C.



### 4.2.3. Priprema frakcija

Heksanska, etilacetatna i vodena frakcija pripremljene su iz etanolnih i vodenih ekstrakata. Suvi ostatak etanolnog ekstrakta restituisan je u vodi, dok je vodeni ekstrakt korišćen direktno bez predhodne liofilizacije. U navedene ekstrakte dodat je heksan u odnosu 1 : 3 uz lagano mešanje, potom je odvojena gornja frakcija (heksanska frakcija) i koja je potom uparena do suvog ostatka.

Nakon odvajanja heksanske frakcije, dodat je etil acetat u odnosu 1: 3 uz lagano mešanje, potom je odvojena gornja frakcija (etil acetatna frakcija) koja je uparena do suvog ostatka. Posle odvajanja etil acetatne frakcije, preostala vodena frakcija je takođe uparena do suvog ostatka.

Suvi ostatak odvojenih frakcija je potom izmeren, restituisan u DMSO do koncentracije od 50 mg/ml. Ovako spremni rastvori su do analize čuvani u staklenim vialama na +4°C, i obeleženi sledećim oznakama za etanolne ekstrakte :

- EtOHHEX - za heksansku frakciju,
- EtOHETAC - za etil acetatnu
- EtOHAq - za vodenu.

i za vodene ekstrakte:

- AqHEX - za heksansku frakciju,
- AqETAC - za etil acetatnu frakciju,
- AqAq - za vodenu frakciju.

### 4.3. HPLC-MS/MS detekcija odabranih fenolnih jedinjenja

Odabrane fenolne komponente (fenolne kiseline, flavonoidi) u ispitivanim ekstraktima determinisane su primenom HPLC-MS/MS tehnike po metodi Orčić i sar. 2014. Korišćen je Agilent Technologies 1200 Series Rapid Resolution tečni hromatograf, kuplovan sa G6410A QqQ MS-MS detektorom sa elektrosprej jonskim izvorom (ESI), kontrolisan od strane MassHunter ver. B.03.01. softvera (Agilent Technologies). Za hromatografsko razdvajanje korišćena je Zorbax Eclipse XDB-C18 RR 4,6 mm x 50 mm x 1,8 µm (Agilent Technologies) reverzo-fazna kolona pri temperaturi od 45 °C. Binarna mobilna faza sastojala se od 0,05% mravlje kiseline (A) i metanola (B), a protok je iznosio 1 mL/min. Primenjen je gradijentni mod, koji je podrazumevao sledeći odnos faza: 0 min 30% B, 6 min 70% B, 9 min 100% B, 12 min 100% B, sa vremenom rekvilibracije od 3 min. Injektovana zapremina svih uzoraka bila je 5 µL. ESI parametri bili su: gas za sušenje (N<sub>2</sub>) temperature 350 °C, protok 9 L/min, pritisak gasa nebulajzera 40 psi, napon na kapilari 4 kV, negativan polaritet.

Jedinjenja su praćena u dinamičkom MRM (multiple reactions monitoring) modu. Ostali optimizovani parametri dati su u Prilogu 8.3. Kalibracioni standardi koncentracija 0,0015 µg/ml do 25,0 µg/ml pripremljeni su sekvencijalnim razblaživanjem (1:1) osnovnog miksa koncentracije 100 µg/ml smešom metanol-voda (3:7). Određivanje sadržaja standardnih fenolnih komponenata u ispitivanim ekstraktima, urađeno je na osnovu standardne kalibracione krive (funkcija logaritma površine pika u zavisnosti od logaritma koncentracije standarda,  $\log(A) = f \log(C)$ , snimljene iz serije razblaženja miksa standarda.

#### 4.4. Detekcija masnih kiselina gasnom hromatografijom

Priprema i detekcija metil-estra masnih kiselina izvršena je po metodi Milovanovic i sar. 2012. Kao rastvarač upotrebljen je n-heptan, a za inertizaciju i oslobađanje metil estara masnih kiselina od ostataka rastvarača primenivano je uparavanje u struji azota.

Pripremljeni uzorci analizirani su na gasnom hromatografu (GC) Agilent 7890A system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), sa plameno-jonizujućim detektorom (FID – Flame Ionization Detector) i autoinjektujućim sistemom za tečnosti, na kapilarnoj koloni od mešane silike (Supelco SP-2560 Capillary GC Column 100m x 0,25 mm d = 0,20  $\mu$ m). Kao gas nosač upotrebljen je helijum čistoće 99,9997 vol %, pri protoku od 1,5 ml/min i pritisku od 1,092 bara. Uzorci su ubrizgavani u kolonu u takozvanom split režimu, čiji je odnos iznosio 30:1. Primenjeni temperaturni režim prikazan je na Slici 4.2 Ukupno vreme jedne analize iznosilo je 41,311 minuta.

	Rate °C/min	Value °C	Hold Time min	Run Time min
► (Initial)		40	0.5	0.5
Ramp 1	25	195	5	11.7
Ramp 2	3	205	8.5	23.533
Ramp 3	9	230	15	41.311
*				

Slika 4.2. Temperaturni režim rada GC-FID pri analizi sastava masnih kiselina uzoraka

Pikovi metil estara masnih kiselina identifikovani su poređenjem retencionih vremena iz uzoraka sa retencionim vremenima iz standarda "Supelco 37 component fatty acid methyl ester mix" kao i sa internim podacima dobijenim u prethodnim ispitivanjima masnih kiselina na gasnom hromatografu sa masenim detektorom.

Dobijeni rezultati izražavani su kao masa pojedinačne masne kiseline, ili grupe masnih kiselina (g) u 100 grama masnih kiselina iz uzorka, tj. kao relativni maseni sadržaji ( $m_{u,i}$ ), određeni prema formuli:

$$m_{u,i} = \frac{A_{u,i} \times F'_i}{\sum A_{u,i} \times F'_i} \times 100$$

Gde je:  $F'_i$  - relativni korekcionni faktor date masne kiseline

$A_{u,i}$  - površina zahvaćena pikom metil estara masne kiseline  $i$  u uzorku

Pošto konstante metil-estara masnih kiselina nisu iste, usled odziva detektora koji nije isti za sve metil-estre masnih kiselina, površine zahvaćene pikovima ne odgovaraju masama masnih kiselina u standardu. Stoga se određuju korekcionni faktori  $F_i$ , a zatim i relativni korekcionni faktori,  $F'_i$ , svedeni na najzastupljeniju masnu kiselinu (u ovom slučaju  $\alpha$ -linolensku kiselinu), za svaku masnu kiselinu  $i$

analizu pojedinačno, nakon čega se izračunava srednja vrednost rezultata svih analiza. Izračunavanja se izvode po sledećim formulama (Marjanović, 2001):

$$F_i = \frac{m_{s,i}}{a_{s,i}}$$

gde je:  $F_i$  – korekcionni faktor

$m_{s,i}$  - maseni udeli komponenti u standardnoj smeši dati na priloženom sertifikatu proizvođača

$a_{s,i}$  – površinski udeo komponente u standardu

$$F'_i = \frac{F_i}{F_{18:3n3}}$$

gde je:  $F_{18:3n3}$  - korekcionni faktor za  $\alpha$ -linolensku kiselinu

## 4.5. Određivanje ukupnog sadržaja proteina

Sadržaj proteina u procentima određen je korišćenjem standardne Kjeldalove metode (AOA, 1995), pomoću koje se indirektno određuje sadržaj ukupnih proteina preko sadržaja organskog azota koji se množi sa korekcionnim faktorom ( $N \times 4.38$ ).

## 4.6. Karakterizacija proteina "LAB-ON-A-CHIP" kapilarnom elektroforezom

Karakterizacija proteina uzoraka gljiva izvedena je pomoću elektroforetskog razdvajanja automatskom "Lab-on-a-Chip" kapilarnom elektroforezom (Agilent Technologies).

Uzorci gljiva (15 mg) su rastvoreni u 100  $\mu$ l pufera (0,125 M Tris-HCl, 4% SDS, 2% glicerol, 5% b-merkaptoetanol, pH 6,8), i zagrevani na 100 °C, tokom 5 minuta, u cilju denaturacije prisutnih proteina. Razdvajanje na čipu je urađeno pomoću uređaja Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), koristeći Protein 80 Plus LabChip kit i odgovarajući softver (Protein 80 software assay on 2100 expert software). Čipovi su pripremljeni u skladu sa protokolom za Protein 80 Plus LabChip kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Rezultati analize čip elektroforeze su softverski predstavljeni na dva različita načina, kao kvantitativni profili i kao simulirane fotografije gela. Kvalitativna analiza proteina podrazumeva određivanje molekularnih masa razdvojenih frakcija proteina, a kvantitativna određivanje koncentracije svake od definisanih proteinskih frakcija. U cilju dobijanja apsolutnih koncentracija ispitivanih proteina upotrebljeni su rastvori poznatih koncentracija BSA (Bovine Serum Albumin). Svi uzorci su analizirani u dva ponavljanja.

## 4.7. Kvantitativno određivanje mikro- i makro-elemenata atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom - AAS

Određivanje mikro- i makro-elemenata rađeno je standardnom metodom AAS. Priprema uzoraka (liofiliziranih gljiva) urađena je digestijom potpomognutom mikrotalasima (eng. microwave assisted digestion), (Magnetron proizvođača Milestone D) u smeši koncentrovane azotne kiseline i vodonik peroksida. Sadržaj mikro i makro elemenata liofiliziranih plodnih tela gljiva određen je na atomskom apsorpcionom spektrofotometru proizvođača Varian, konfiguracije FSAAS240/GTA120/VGA77. Svi metali su određeni plamenom tehnikom u režimu apsorpcije, u modu integracije, u tri ponavljanja, sa vremenom čitanja od 10s po ponavljanju i vremenu odlaganja čitanja (eng. read delay time) od 10s sa brzinom aspiriranja uzorka u raspršivač (eng. nebulizer) između 5-10 ml/min.

## 4.8. Spektrofotometrijsko utvrđivanje antioksidantne aktivnosti *in vitro*

Uzorci gljiva pripremljeni su od svežih plodnih tela, prethodno zamrznutih na -20° C, a potom liofiliziranih i samlevenih do postizanja finog praha, čuvani na -20° C do postupka ekstrakcije. Tabela 4.2. predstavlja prikaz vrsta koje su testirane i testova antioksidativne aktivnosti.

Tabela 4.2. Prikaz vrsta i ekstrakata koji su testirani i testova antioksidativne aktivnosti.

Vrsta	UP		UF		DPPH		OH		NO		O <sub>2</sub>		FRAP	
	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E
Tip ekstrakta														
<i>L. sulphureus</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>M. giganteus</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>A. auricula-judae</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>F. hepatica</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>A. mellea</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. contraversus</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>M. procera</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. perlatum</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>C. disseminatus</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

A-Vodeni ekstrakti; E- etanolni ekstrakti

### 4.8.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola određen je po metodi Singleton-a i sar. 1999, koja se zasniva na reakciji fenola sa Folin-Ciocalteu-ovim reagensom (smeša Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, HCl, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> i LiSO<sub>4</sub>), pri čemu nastaje obojeni kompleks, čija se apsorbanca meri na 760 nm.

**Postupak:**

Za izradu kalibracione krive korišćena su razblaženja osnovnog rastvora galne kiseline u rasponu koncentracija od 0 do 1000  $\mu\text{mol/L}$ . Nakon 2 sata inkubacije na sobnoj temperaturi merena je apsorbancija na 760 nm (Multiskan Ascent, Thermo Electron Corporation). Pripremljene su probe na način koji je prikazan u Tabeli 4.3. i njihova apsorbancija je merena spektrofotometrijski nakon 2 sata na 760 nm. Sve radne probe rađene su u tri ponavljanja.

Tabela 4.3. Pripremljeni rastvori za određivanje sadržaja ukupnih fenola

RADNA PROBA	KOREKCIJA	SLEPA PROBA
25 $\mu\text{l}$ ekstrakta	25 $\mu\text{l}$ ekstrakta	25 $\mu\text{l}$ dH <sub>2</sub> O
125 $\mu\text{l}$ FC reagensa		125 $\mu\text{l}$ FC reagensa
100 $\mu\text{l}$ rastvora Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> *	225 $\mu\text{l}$ d.H <sub>2</sub> O	100 $\mu\text{l}$ rastvora Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> *

\*- rastvor je dodat 10 min nakon dodatka FC reagensa

Nakon 2 h inkubacije, izmerene su apsorbance na 760 nm. Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima na osnovu izmerenih apsorbanci za uzorke izražava se kao mg ekvivalenta galne kiseline/1 g ekstrakta tj. sa kalibracione krive očitana je koncentracija fenolnih jedinjenja u mg/dm<sup>3</sup>, a zatim se preračuna u mg ekvivalenta/1 g suve materije. Sve probe su rađene u tri ponavljanja.

Apsorbance (A) za svaki ispitani ekstrakt su računane iz razlike apsorbanci radne probe (Asr), korekcije (Akor) i slepe probe (Asp):

$$A = \text{Asr} - \text{Akor} - \text{Asp}$$

**Konstrukcija standardne krive:**

Sadržaj fenola je računat na osnovu kalibracione krive standardnog rastvora galne kiseline (Sigma, USA), a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri merenja  $\pm$  standardna devijacija (mg ekvivalenta galne kiseline/g suvog ekstrakta). Standardna kriva se konstruiše na osnovu rezultata dobijenih merenjem apsorbance serije različitih koncentracija rastvora galne kiseline.

#### 4.8.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Sadržaj flavonoida određen je po spektrofotometrijskoj metodi Chang i sar., 2002, prilagođenoj za mikrolejt-ploče sa 96 bunarčića (Spektar, Čačak, Srbija). Naime, flavonoidi i flavoglikozidi daju sa metalima odgovarajuće metalokomplekse. Naročito je značajan Al<sup>3+</sup>-kompleks, jer se Al<sup>3+</sup> vezuje za ukupne flavonoide pa se sumarni apsorpcioni maksimum jednostavno određuje.

**Postupak:**

Razblaženja kvercetina (Sigma, USA) za standardnu krivu su napravljena u rasponu koncentracije od 1,25 do 100  $\mu\text{g/ml}$ . Osnovni rastvor ekstrakta je razblažen u različitim koncentracijama u zavisnosti od gljive i rastvarača u kom je ekstrahovana. Priprema rastvora je prikazana u Tabeli 4.4., a njihova apsorbancija je merena spektrofotometrijski na 450 nm, nakon 30 min inkubacije. Sve radne probe su rađene u tri ponavljanja.

Tabela 4.4. Pripremljeni rastvori za određivanje sadržaja flavonoida

RADNA PROBA	KOREKCIJA	SLEPA PROBA
30l μ ekstrakta	30 μl ekstrakta	30 μl rastvarača (80 % MeOH)
90l μ MeOH	90 μl MeOH	90 μl MeOH
6 μl 0,75 mol/l AlCl <sub>3</sub>		6 μl 0,75 mol/l AlCl <sub>3</sub>
6 μl 1mol/l CH <sub>3</sub> COONa		6 μl 1mol/l CH <sub>3</sub> COONa
170 μl dH <sub>2</sub> O	182 μl dH <sub>2</sub> O	170 μl dH <sub>2</sub> O

Iz razlike apsorbance srednje vrednosti radnih proba (Asr), korekcije (Akor) i slepe probe (Asp) izračunate su apsorbance (A) za svaki ispitivani ekstrakt:

$$A = Asr - Akor - Asp$$

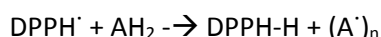
Sadržaj ukupnih flavonoida je izračunat na osnovu kalibracione krive (funkcija apsorbance u zavisnosti od koncentracije) standardnog rastvora kvercetina. Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri merenja ± standardna devijacija (mg-ekvivalenta kvercetina po gramu suvog ekstrakta).

#### **Konstrukcija kalibracione krive:**

Standardna kriva se konstruiše na osnovu rezultata dobijenih merenjem apsorbance serije različitih koncentracija rastvora kvercetina. Iz kalibracione krive izračunat je ukupan sadržaj flavonoida u ispitivanim ekstraktima glijiva i izražen kao mg ekvivalenta kvercetina / g suvog ekstrakta (Prilog.8.3).

### **4.8.3. Određivanje „skevendžer“ aktivnosti primenom DPPH-testa**

Kapacitet "hvatanja" slobodnih radikala ispitivanih ekstrakata DPPH testom, bazirano je na praćenju transformacije DPPH' radikala u prisustvu antioksidansa (davaoca H-atoma) i određuje se merenjem njihove sposobnosti da neutrališu 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikale (DPPH'). Metoda se zasniva na praćenju transformacije ljubičasto obojenog rastvora stabilnog azot-centriranog DPPH' radikala u redukovanu formu DPPH-H koja je žute boje (Espin i sar., 2000). Pojava žute boje rastvora objašnjava se sposobnošću pojedinih komponenata da deluju kao donori vodonika ili elektrona pri čemu DPPH' radikal prelazi u redukovani, neutralni oblik DPPH-H. Ova reakcija praćena je promenom apsorbance što se može uočiti promenom boje iz ljubičaste u žutu.



#### **Postupak:**

Spektrofotometrijsko određivanje „skevendžer“ aktivnosti ispitivanih ekstrakata vrši se merenjima na 540 nm, što je praćeno promenama apsorbance i merenjem na istoj talasnoj dužini posle inkubacije od 60 min u mraku na 25 °C. Sve reakcije rađene su u tri ponavljanja. Eksperiment je rađen u mikroplejt pločama (Spektar, Čačak, Srbija) do finalne zapremine od 250 μl (Tabela 4.5.).

Tabela 4.5. Pripremljeni rastvori za određivanje sadržaja DPPH' radikala

RADNA PROBA	KOREKCIJE	KONTROLA
60 µl 90 µM DPPH <sup>·</sup>		60 µl 90µM DPPH <sup>·</sup>
10 µl ekstrakta	10 µl ekstrakta	10 µl rastvarača
180 µl MeOH	240 µl MeOH	180 µl MeOH

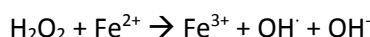
Kapacitet "gašenja" DPPH<sup>·</sup> radikala određen je iz razlike apsorbance kontrole (Ak) i testiranih uzoraka.

$$\% \text{RSC} = 100 - \text{Asr} \times 100 / \text{Ak}$$

Iz vrednosti dobijenih za RSC (engl. RSC radical scavenging capacity - kapacitet hvatača radikala) određene su i IC<sub>50</sub> vrednosti (koncentracije ispitivane supstance pri kojoj je neutralisano 50 % radikala) primenom regresione analize.

#### 4.8.4. Neutralizacija OH<sup>·</sup> radikala testom sa dezoksiribozom

U cilju određivanja kapaciteta hvatanja OH<sup>·</sup> radikala, primenjena je modifikovana metoda Cheeseman i sar. 1988. hidroksil radikali su generisani Fentonovom reakcijom :



Nastali reaktivni OH<sup>·</sup> u prisustvu 2-dezoksiriboze i kiseonika grade malonildialdehid (MDA), koji se zatim određuje TBA testom (sa tiobarbiturnom kiselinom). TBA test je zasnovan na spektrofotometrijskom određivanju ružičasto obojenog kompleksa koji nastaje nakon reakcije malonilaldehida (MDA) sa dva molekula TBA.

##### **Postupak :**

Pripremljeni rastvori su prikazani u Tabeli 4.6. epruvete su dopunjene fosfatnim puferom do zapremine od 3 ml. Probe (radne probe uzoraka, korekcija i slepa proba) su dalje inkubirani 60 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije dodato je 0,2 ml EDTA i 2 ml TBA-reagensa, a karakteristična ružičasta boja kompleksa (TBAMDA) se razvija nakon 10 minuta kuvanja na 100 °C. Nakon hlađenja merena je apsorbance na 532 nm. Sve reakcije su rađene u tri ponavljanja.

Tabela 4.6. Pripremljeni rastvori za određivanje kapaciteta hvatanja OH<sup>·</sup> radikala

RADNA PROBA	KOREKCIJA	KONTROLA
100 µl 2-dezoksi-D-riboza	3,0 ml pufera pH 7,4	100 µl 2-dezoksi-D-riboza
10 µl ekstrakta	10 µl ekstrakta	10 µl rastvarača
100 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		100 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
100 µl FeSO <sub>4</sub>		100 µl FeSO <sub>4</sub>
2,7 ml pufera pH 7,4		2,7 ml pufera pH 7,4
Inkubacija 60 minuta na 37 °C		
200 µl EDTA	200 µl EDTA	200 µl EDTA
2 ml TBA	2 ml TBA	2 ml TBA
Zagrevanje 10 minuta na 100 °C		

Iz razlike apsorbance radne probe (Asr) i korekcije (Akor) izračunate su apsorbance (A) za svaku koncentraciju ispitivanog ekstrakta:

$$A = A_{sr} - A_{kor}$$

Kapacitet hvatanja OH<sup>•</sup> radikala (RSC<sub>OH<sup>•</sup></sub>) ispitanih ekstrakata različitih koncentracija računat je na osnovu sledeće jednačine, gde je Ak apsorbanca kontrolne probe:

$$RSC_{OH^{\bullet}} (\%) = (1 - A/A_k) \times 100\%$$

Na osnovu RSC<sub>OH<sup>•</sup></sub> vrednosti određene su IC<sub>50</sub> vrednosti (koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% radikala), očitavanjem sa odgovarajućeg grafikona (funkcija RSC<sub>OH<sup>•</sup></sub> (%) u zavisnosti od koncentracije), a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri određene IC<sub>50</sub> vrednosti ± standardna devijacija (µg/ml).

#### 4.8.5. Određivanje kapaciteta "hvatanja" NO<sup>•</sup> radikala

Određivanje kapaciteta "hvatanja" NO<sup>•</sup> radikala etanolnih i vodenih ekstrakata odabranih vrsta gljiva, zasniva se na spektrofotometrijskom merenju neutralizacije generisanih nitritnih jona. U ovu svrhu korišćen je vodeni rastvor natrijum-nitroprusida (SNP) koji predstavlja izvor NO<sup>•</sup> radikala pri fiziološkom pH. Nastali NO<sup>•</sup> radikal reaguje sa kiseonikom dajući nitritne jone, čija koncentracija se određuje po metodi Green-a i sar. (1982), a koja se zasniva na spektrofotometrijskom određivanju purpurno-ružičastog diazo kompleksa koji nastaje nakon reakcije NO<sub>2</sub><sup>-</sup> i Griess-ovog reagensa na sobnoj temperaturi.

##### **Postupak:**

Pripremljene su odgovarajuće probe (Tabela 4.7.), a njihova apsorbanca je merena na 546 nm nakon 90 min. Sve probe i kontrole rađene su u tri ponavljanja.

Tabela 4.7. Pripremljeni rastvori za određivanje kapaciteta "hvatanja" NO<sup>•</sup> radikala

RADNA PROBA	KOREKCIJA	KONTROLA
0,5 ml 10 mmol/l SNP	1,0 ml pufer pH 7,4	0,5 ml 10 mmol/l SNP
30 µl ekstrakt	30 µl ekstrakt	30 µl rastvarač
0,5 ml pufer pH 7,4		0,5 ml pufer pH 7,4
<b>INKUBACIJA 90 min na 25 °C (konstantno svetlo)</b>		
1 ml Griess-ov reagens	1 ml Griess-ov reagens	1 ml Griess-ov reagens

\*napomena: svi reagensi su dodati u mraku

Iz razlike apsorbance radne probe (Asr) i korekcije (Akor) izračunate su apsorbance (A) za svaku koncentraciju ispitivanog ekstrakta:

$$A = A_{sr} - A_{kor}$$

Kapacitet "hvatanja" NO<sup>•</sup> radikala (RSC<sub>NO<sup>•</sup></sub>) ispitanih ekstrakata različitih koncentracija računat je na osnovu sledeće jednačine gde je Ak apsorbanca kontrolne probe:

$$RSC_{NO^{\bullet}} (\%) = (1 - A/A_k) \times 100\%$$

Na osnovu RSC<sub>NO<sup>•</sup></sub> vrednosti određene su IC<sub>50</sub> vrednosti (koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% radikala) očitavanjem sa odgovarajućeg grafikona (funkcija RSC<sub>NO<sup>•</sup></sub> (%) u zavisnosti od radne koncentracije), a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri određene IC<sub>50</sub> vrednosti (mg/ml) ± standardna devijacija.



#### 4.8.6. Određivanje kapaciteta "hvatanja" $O_2^{\cdot-}$ radikala

Kapacitet "hvatanja" superoksid anjon radikala ispitivanih ekstrakata gljiva određen je merenjem njihove sposobnosti da neutrališu  $O_2^{\cdot-}$  radikal nastalog tokom aerobne redukcije nitroblu-tetrazolijum nitro-plavog NBT pomoću NADH u prisustvu fenazinmetilsulfata - PMS (Nishikimi i sar., 1972).

Stepen redukcije NBT sa NADH u aerobnim uslovima je zanemarljiv (5 %) i linearno raste sa količinom dodatog PMS reagensa, koji služi kao prenosilac elektrona i utiče na mehanizam redukcije. S obzirom da je strukturno sličan flavinu, PMS u reakciji sa NADH prelazi u redukovan oblik, PMSH. Tokom njegove reoksidacije kiseonikom iz vazduha dolazi do generisanja  $O_2^{\cdot-}$  koji u velikoj meri (95 %) redukuje NBT u formazan.

NBT je u oksidovanom obliku bezbojan, a redukcijom prelazi u NBTH koji je plave boje. Dodatkom ekstrakata koji sadrže fenolna jedinjenja, dolazi do neutralizacije  $O_2^{\cdot-}$  i smanjenja redukcije NBT reagensa. Količina neutralisanih radikala prati se spektrofotometrijski i proporcionalna je smanjenju intenziteta obojenja.

##### **Postupak:**

Analizirano je po pet razblaženja svakog ekstrakta. Pripremljeni su odgovarajući rastvori Tabela 4.8., a njihova apsorbanca je merena na 560 nm nakon 5 min. Sve reakcije rađene su u tri ponavljanja.

Tabela 4.8. Rastvori pripremljeni za određivanje kapaciteta hvatanja  $O_2^{\cdot-}$  radikala

RADNA PROBA	KOREKCIJA	KONTROLA
200 $\mu$ l 144 $\mu$ mol/l NBT	1,5 ml pufer pH 8,3	200 $\mu$ l 144 $\mu$ mol/l NBT
10 $\mu$ l ekstrakta	10 $\mu$ l ekstrakta	10 $\mu$ l 80% MeOH
100 $\mu$ l 677 $\mu$ mol/l NADH*		100 $\mu$ l 677 $\mu$ mol/l NADH*
100 $\mu$ l 60 $\mu$ mol/l PMS*		100 $\mu$ l 60 $\mu$ mol/l PMS*
1,1 ml pufer pH 8,3		1,1 ml pufer pH 8,3

\*rastvori dodati neposredno jedan za drugim

Iz razlike apsorbanca radne probe ( $A_{sr}$ ) i korekcije ( $A_{kor}$ ) izračunate su apsorbanca (A) za svaku koncentraciju ispitivanog ekstrakta:

$$A = A_{sr} - A_{kor}$$

Kapacitet "hvatanja" superoksid anjon radikala ( $RSC_{O_2^{\cdot-}}$ ) ispitivanih ekstrakata različitih koncentracija računat je na osnovu sledeće jednačine, gde je  $A_k$  apsorbanca kontrolne probe:

$$RSC_{O_2^{\cdot-}} (\%) = (1 - A / A_k) 100\%$$

Na osnovu dobijenih  $RSC_{O_2^{\cdot-}}$  vrednosti određene su  $IC_{50}$  vrednosti (koncentracija pri kojoj je neutralisano 50 % radikala) očitavanjem sa odgovarajućeg grafikona (funkcija  $RSC_{O_2^{\cdot-}} (\%)$  u zavisnosti od radne koncentracije), a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri određene  $IC_{50}$  vrednosti ( $\mu$ g/ml)  $\pm$  standardna devijacija.

#### 4.8.7. Određivanje redukcionog potencijala primenom FRAP-testa

Redukcioni potencijal je određen modifikovanom metodom po Benzie i Strain, 1999. Na niskoj pH vrednosti može doći do redukcije gvožđe(II)-2,4,5-tripiridil-s-triazin kompleksa, čija se apsorbanca može meriti spektrofotometrijski na 593 nm (595 nm)

##### **Postupak:**

Razblaženja askorbinske kiseline su napravljena u rasponu koncentracija od 0 do 1000 µg/mL. Pripremljeni rastvori su prikazani u Tabela 4.9., a njihova apsorbanca je merena spektrofotometrijski 593 nm nakon 6 minuta. Sve radne probe rađene su u tri ponavljanja, a korekcije jednom.

Tabela 4.9. Pripremljeni rastvori za FRAP test.

RADNA PROBA	KOREKCIJA	SLEPA PROBA
225 µl FRAP reagensa		225 µl FRAP reagensa
10 µl ekstrakta (askorbinske kiseline)	10 µl ekstrakta	10 µl rastvarača
22,5 µl dH <sub>2</sub> O	247,5 µl.dH <sub>2</sub> O	22,5 µl d.H <sub>2</sub> O

Nakon 6 minuta inkubacije, izmerene su apsorbance na 593 nm (595 nm). Standardna kriva se konstruiše na osnovu rezultata dobijenih merenjem apsorbanca standardnog rastvora askorbinske kiseline sledećih koncentracija: 1000, 800, 600, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 i 0 µmol/L.

Iz razlike apsorbanca radne probe ( $A_{sr}$ ), korekcije ( $A_{kor}$ ) izračunate su apsorbanca ( $A$ ) za svaki ispitani ekstrakt:

$$A = A_{sr} - A_{kor}$$

Redukcioni potencijal je izračunat na osnovu kalibracione krive (funkcija apsorbanca u zavisnosti od koncentracije) standardnog rastvora askorbinske kiseline. Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri merenja (mg ekvivalenata askorbinske kiseline/g suvog ekstrakta).

### 4.9. Određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata gljiva

#### 4.9.1. Priprema 70% metanolnog ekstrakta

Odmerena masa osušenih samlevenih plodnih tela macerirana je u 70% V/V metanolu (10 ml MeOH, po 1g uzorka) na sobnoj temperaturi u trajanju 72h u mraku na mehaničkoj mešalici (100 obrtaja/min) tokom 72 h. Ekstrakti su potom profiltrirani (Whatman No.4), filtrati su uparavani do postizanja suve mase (na temperaturi do 50 °C) korišćenjem rotacionog vakuum uparivača (Büchi, R-210, Švajcarska). Suvi ostatak je rastvoren u 5% DMSO od kojih su pripremljene osnovne koncentracije uzoraka gljiva (20%, w/w) a zatim čuvani na +4°C do dalje upotrebe. U Tabeli 4.10. prikazane su vrste i ekstrakti koji u ispitivani u okviru određivanja antimikrobne aktivnosti.

Tabele 4.10. Vrste i ekstrakti koji su ispitivani u okviru određivanja antimikrobne aktivnosti

VRSTA	MEOH70%	HEX
<i>L. sulphureus</i>	*	*
<i>M. giganteus</i>		*
<i>A. auricula-judae</i>		*
<i>F. hepatica</i>	*	*
<i>A. mellea</i>	*	*
<i>L. contraversus</i>	*	*
<i>M. procera</i>	*	*
<i>L. perlatum</i>		*
<i>C. disseminatus</i>		*

#### 4.9.2. Kulture mikroorganizama

*In vitro* antimikrobni test, obuhvatio je četiri bakterijska referentna ATCC soja kolekcije kultura Katedre za mikrobiologiju (Departmana za biologiju i ekologiju, Univerzitet Novi Sad, Srbija), dve Gram-negativne: *Esheria coli* (ATCC 11229) i *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) i dve Gram-pozitivne *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), i *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433).

Utvrđivanje antifungalne aktivnosti ekstrakata gljiva obavljeno je na dva izolata kvasnica *C. albicans*: laboratorijski i humani patološki (h) poreklom iz vaginalnog brisa dobijenog iz Medicinske Laboratorije „Biotest“ (Novi Sad, Srbija).

#### 4.9.3. Priprema suspenzije mikroorganizama i standardizacija inokuluma

Suspenzije mikroorganizama dobijene su dodavanjem ćelija jednodnevnih bakterijskih/fungalnih kultura izraslih na kosom hranljivom agaru u sterilan fiziološki rastvor (0,1% NaCl).

Standardizacija inokuluma po McFarland-u (0,5 McFarland), što odgovara zamućenju koje nastaje u reakciji između 99,5 ml 0,1 M rastvora sumporne kiseline ( $H_2SO_4$ ) i 5 ml rastvora 0,2 M barijum hlorid dihidrata ( $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ ). Zamućenje je podešavano fotoelektričnim fotometrom uz korišćenje crvenog filtera (KOLORIMETER MA 9504, Metrix).

Metoda je zasnovana na merenju intenziteta propuštene svetlosti, odnosno apsorbance (A) ili transmisije (T), uz prethodno eksperimentalno definisanu funkcionalnu vezu ovih veličina sa koncentracijom (Krstić i Marijanović, 1998). Na ovaj način dobijena suspenzija omogućava semikonfluentan rast mikroorganizama (rast ćelija u formi tepiha u petri posudi) i broj ćelija u koloniji koji aproksimativno iznosi  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml za bakterijske kulture i  $1,5 \times 10^6$  CFU/ml za kulture *C. albicans*.

#### 4.9.4. Utvrđivanje MIC i MBC/MFC vrednosti

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) predstavlja najnižu koncentraciju antimikrobnog agensa, koja je potrebna da se vidno inhibira rast mikroorganizama (bakterija/gljivica) u tečnoj podlozi, nakon 24h inkubacije (odsustvo zamućenja ili precipitacije u tečnom medijumu).

MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) je utvrđena primenom mikrodilucione metode duplih razređenja korišćenjem mikrotitar ploča sa 96 bunarčića (Spektar, Čačak, Srbija) prema standardnoj proceduri (CLSI, 2008). Analizirana su dupla razređenja ekstrakata (650 do 10000 µg/ml). Nakon inkubacije od 18-24h za bakterijske sojeve i 48h za *C. albicans*, vršena je procena vrednosti MIC/MFC upoređivanjem rasta mikroorganizama sa rastom u kontrolnim bunarčićima (bez ekstrakta). U svaki vel aplicirano je po 50 µl bujona, 50µl ekstrakta određene koncentracije i 0,5 µl bakterijske/fungalne suspenzije. U bunarčiće koji su predstavljali pozitivnu kontrolu (kontrolu rasta) aplicirano je 100 µl bujona i 1 µl suspenzije mikroorganizama. MIC predstavlja prvu koncentraciju ekstrakta u čijem prisustvu nema rasta mikroorganizama.

Minimalna baktericidna (MBC) odnosno fungicidna (MFC) koncentracija predstavlja najmanju koncentraciju antimikrobnog agensa koja sprečava rast 99,9% test organizama, nakon 24h inkubacije, što predstavlja smanjenje od 99,9 % finalne brojnosti bakterija u bujonu ( $1,5 \times 10^6$ ) odnosno  $1,5 \times 10^4$  brojnosti ćelija kvasnice *C. albicans*.

Stoga je za određivanje MBC/MFC vrednosti, po 100 µl iz bunarčića u kojima nije bilo vidljivog rasta zasejano na Petri ploče (Mueller Hinton agar, HIMEDIA, ili Sladni agar, Torlak, Srbija) i inkubirano 24h/48h na 37 °C za bakterijske i na 25 °C za gljivične kulture. Nakon toga vršeno je prebrojavanje izraslih bakterijskih/fungalnih kolonija (CFU).

Za utvrđivanje inhibicije bakterijskog rasta korišćen je 2,3,5-trifeniltetrazolium hlorid (TTC) koji se u prisustvu metabolički aktivnih ćelija redukuje u formazan i daje crvenu boju. U svaki vel, dodato je po 10 µl TTC-a i inkubirano 2h na 37 °C. Količina formazana (crvene boje) je proporcionalna prisustvu vijabilnih ćelija.

#### 4.9.5. Antibiotiska osetljivost bakterijskih kultura

Test osetljivosti bakterijskih kultura na antibiotike urađen je po standardnoj disk difuzionoj metodi po Kirbi Baueru prema standardnoj proceduri (CLSI; 2008).

Osetljivost bakterijskih sojeva je testirana korišćenjem osam različitih antibiotskih diskova (HIMEDIA): eritromicin - E (15 µg), levofloksacin - LEV (5 µg), klindamicin DA (2 µg), cefoksitin KF (20 µg), ciprofloksacin - CIP (5 µg), ceftriakson - CN (10 µg), orfloksacin - OFX (5 µg) i hloramfenikol C (30 µg). Nakon inkubacije od 18-24h izmeren je dijametar inhibitornih zona (mm) i svaka vrsta je gradirana kao osetljiva (S), intermedijarna (I) i rezistentna (R) prema šemi proizvođača (Himedia).

## 4.10. Određivanje citotoksičnog efekta

### 4.10.1. Čelijska kultura

U eksperimentima za određivanje citotoksičnog efekta ekstrakata gljiva korišćena je kontinualna čelijska linija. Humana čelijska linija tumora dojke - MCF7, koja je za potrebe istraživanja u okviru disertacije dobijena ljubaznošću prof. Dr Gordane Bogdanović (Institut za onkologiju, Sremska Kamenica, Srbija). MCF7 ćelije izolovane su iz pleuralne tečnosti, a po morfologiji su epitelne tj. po tipu predstavljaju ćelije adenokarcinoma dojke koje ekspiriraju citoplazmatski estrogini receptor (ER+)(Kaišarević,2011).

U cilju sprečavanja kontaminacije čelijskih kultura, gajenje i kompletna eksperimentalna procedura obavljena je u sterilnim uslovima (Safety bench HPH 12 Heraguard – Kendro) korišćenjem sterilnog pribora laboratorijskog posuđa i rastvora. Sve čelijske linije gajene su u CO<sub>2</sub> inkubatoru (Revco Ultima RMI 3000-S-7-VBA CO<sub>2</sub> Incubator, Kendro Laboratory Product) u strogo kontrolisanim uslovima: temperatura - 37°C, atmosfera - 95 % O<sub>2</sub> i 5 % CO<sub>2</sub> uz obezbeđenu vlagu. Kontinualne čelijske linije gajene su u flaskovima za čelijske kulture, površine 75 cm<sup>2</sup>. Pre svakog eksperimenta, ćelije su posmatrane pod invertnim mikroskopom (IX 51, Olympus, Germany), radi provere njihovog konfluentnog rasta i same morfologije ćelija. Za eksperimente su korišćene samo morfološki zdrave ćelije, sa konfuentnošću od ~80-90%, što je procenjeno na osnovu mikroskopskog pregleda.

Ćelije su uzgajane u Dulbeccos Modified Eagles Medium (Sigma-Aldrich, Germany) sa sadržajem glukoze (4,5g/L), sa dodatkom sterilnog fetalnog telećeg seruma FCS (10%) (PAA Laboratories, Austria). Ćelije su u kulturi održavane u optimalnim uslovima, uz pasažiranje svaka 3-4 dana i zamenu medijuma po potrebi. Za eksperiment su korišćene ćelije pasažirane manje od 15 puta.

### 4.10.2. Pasažiranje kontinualnih čelijskih linija

U cilju održavanja čelijske kulture, sve kontinualne čelijske linije su redovno pasažirane po dostizanju 80~90% konfuentnosti, prema ranije opisanoj proceduri (Kašarević, 2011). Pasažiranje je vršeno pomoću 0,1% rastvora tripsina (270m M NaCl, 10mM KCl, 10mM D-glukoza, 14m M NaHCO<sub>3</sub>, 0,1% tripsina, 0,04%EDTA rastvorenog u destilovanoj vodi; pH7,2).

### 4.10.3. Priprema ćelija

Ćelije su gajene u DMEM medijumu sa dodatih 100 IJ/ml penicilina i 100 g/ml streptomocina, (ICN Galenika, Beograd, Srbija) na 37°C u atmosferi sa 95% vlage i 5% CO<sub>2</sub>. Ćelije su presađenje po postizanju konfuentnosti od 80% - 90%. Disocijacija (odvajanje) monosloja vršena je dodavanjem 0,5% rastvora tripsina, nakon čega su ćelije inkubirane 5 minuta na 37 °C. Enzimska reakcija je zaustavljena dodavanjem medijuma koji sadži 10% FCS, pri čemu komponente seruma vrše inaktivaciju tripsina.

Broj ćelija i njihova vijabilnost određeni su TBE testom (Trypan Blue Exclusion), sa 0,4% tripan plavim (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) (boja koja ulazi u ćeliju sa narušenim integritetom plazma membrane i boji ćeliju u plavo). Čelijska suspenzija razblažena je sa rastvorom

tripan plavog nakon čega su ćelije brojane u Neubauer-ovoj komori. Vijabilnost ćelija korišćenih u eksperimentu bila je veća od 90%. Nakon određivanja broja ćelija u suspenziji, pripravljena je potrebna količina nove suspenzije, tako da koncentracija živih ćelija bude 50.000/ml, a potom su iz ovako pripremljene suspenzije ćelije sađene u mikrotitar ploče sa 96 bunarčića, sa ravnim dnom (Hrubik i sar., 2012).

#### 4.10.4. Sađenje ćelija

Ćelije se sade u sterilne mikrotitar ploče sa poklopcem, sa 96 radnih udubljenja (well). Sađenje se vrši iz finalne suspenzije od 50.000 ćelija/ml. U svaki vel se dodaje 100  $\mu$ l, odnosno 5.000 ćelija. Ćelije se sade samo u unutrašnje velove ploče, dok se u spoljašnje dodaje 100  $\mu$ l odgovarajućeg medijuma. Ovako zasađene ćelije inkubiraju se 24 h na 37°C u atmosferi sa 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub> uz obezbeđenu vlažnost. Tokom navedenog perioda žive ćelije se pričvrste za podlogu vela (adheriraju) kako bi uspostavile normalnu metaboličku aktivnost.

#### 4.10.5. Tretman ćelija

Nakon perioda oporavka ćelija od 24 h iz svih velova se uklanja medijum. U velove koji su predviđeni za tretman dodaje se 100  $\mu$ l svežeg medijuma sa 10% FCS, koji sadrži odgovarajuću koncentraciju ispitivanog ekstrakta (33,3  $\mu$ g/ml-900  $\mu$ g/ml). Uzorci za tretman su pripremljeni sukcesivnim razblaženjem osnovnog rastvora uzorka u medijumu. Kao rastvarač za osnovni uzorak koristi se DMSO, dok je serija razblaženja pripremana u odgovarajućem medijumu sa 10% FCS tako da sadržaj DMSO ne prelazi 1% u finalnoj koncentraciji. Prethodni eksperimenti su pokazali da 1% DMSO nije citotoksičan i ne narušava ćelijsku proliferaciju. Inkubacija je trajala 24h i 72h čime su ispitani subakutni i hronični efekti uzoraka (Xia i sar., 2008). Tretman ćelija izvršen je sa serijom razblaženja od 33,3  $\mu$ l/ml, 100  $\mu$ l/ml, 300  $\mu$ l/ml, 900  $\mu$ l/ml. U velove koji su predviđeni za slepu probu dodato je 100  $\mu$ l svežeg medijuma. Po završenom tretmanu ploče su bile vraćene u inkubator 24 h i 72 h na 37°C u atmosferi sa 95 O<sub>2</sub> % i 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4.10.6. Merenje citotoksičnosti ekstrakta gljiva

Merenje citotoksičnosti ekstrakta gljiva vršeno je pomoću dva antiproliferativna testa, MTT i SRB testa ( tabela 4.11.).

Tabela 4.11. Prikaz vrsta i ekstrakata sa kojima su sprovedeni testovi citotoksičnosti

TESTOVI	MTT		SRB		MTT
	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Frak.
Vrsta	*	*	*	*	*
<i>L. sulphureus</i>	*	*	*	*	*
<i>M. giganteus</i>	*	*	*	*	*
<i>A. auricula-judae</i>	*	*	*	*	
<i>F. hepatica</i>	*	*	*	*	
<i>A. mellea</i>	*	*			
<i>L. contraversus</i>	*	*	*	*	
<i>M. procera</i>	*	*	*	*	*
<i>L. perlatum</i>	*	*	*	*	
<i>C. disseminatus</i>	*	*	*	*	*

#### 4.10.7. MTT test

MTT test je kolorimetrijski esej, koji se zasniva na merenju konverzije žutog tiazolil plavo tetrazolijum bromida – MTT (Sigma Aldrich) u ljubičasto plave kristale formazana, pod dejstvom mitohondrijalne dehidrogenaze metabolički aktivnih vijabilnih ćelija. Prisustvo većeg broja živih ćelija rezultira formiranjem veće količine formazana, što se može izmeriti fotometrijski. Esej je rađen prema prethodno opisanoj proceduri (Kaišarević i sar.,2007).

Po isteku vremena inkubacije (24 i 72h), medijum je uklonjen iz velova i dodat je rastvor MTT-a u koncentraciji od 0,5 mg/ml, koji se priprema u medijumu neposredno pre dodavanja. U svaki vel je dodato po 100 µl rastvora, tako da je finalna koncentracija u velu iznosila 0,05mg/vel. Nakon tretmana ćelije su inkubirane 3 h na 37°C, pri čemu je aktivnošću mitohondrijalne dehidrogenaze u vijabilnim ćelijama, MTT preveden u ljubičasto-plave kristale formazana koji se akumuliraju. Nakon inkubacije, medijum je odliven, reakcija je zaustavljena dodatkom 100 µl 0,04 M HCl u izopropanolu, čime su kristali formazana rastvoreni. Posle 10 minuta na sobnoj temperaturi, ploče su promućkane na šejkeru zatim je izmerena apsorbance na dve talasne dužine: A1=540 nm i A2=690nm pomoću fotometra.

Finalna apsorbance se izračunava na osnovu jednačine  $A=A_1-A_2$ , a na osnovu dobijenih rezultata, procenat citotoksičnosti (CI – ćelijska inhibicija) se izračunava prema formuli:

$$CI (\%) = (1-A_s/A_k) \cdot 100,$$

$A_s$  apsorbance vela sa tretmanom,

$A_k$  apsorbance vela sa kontrolom (ćelije sa medijumom bez tretmana).

#### 4.10.8. SRB test

SRB test je kolorimetrijski esej, koji se zasniva na merenju ukupnog nivoa proteina u eksperimentalnim velovima, srazmerno ukupnom broju ćelija (Voigt, 2005). Test se bazira na usvajanju negativno naelektrisanog aminokiseline roze boje, sulforodamina B (SRB) od strane određenih aminokiselina ćelijskih proteina. Prisustvo većeg broja živih ćelija rezultira usvajanjem

veće količine boje, što se može izmeriti fotometrijski. Esej je rađen prema proceduri Houghton i sar., (2007).

Nakon isteka inkubacionog perioda tretmana, ćelije su fiksirane dodavanjem 25  $\mu$ l hladnog 50%w/v rastvora trihlorsirćetne kiseline (TCA) u destilovanj vodi, 1h na 4°C. Fiksirane ćelije su potom isprane 5 puta sa destilovanom vodom (200  $\mu$ l /velu) i osušene na vazduhu pri sobnoj temperaturi. Bojenje ćelija izvršeno je dodavanjem 50  $\mu$ l 0,4%w/v rastvora SRB-a (Sigma, Aldrich) u 1%w/v sirćetnoj kiselinu uz inkubaciju od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Po isteku vremena boja je odlivena, a ostaci nevezane boje uklonjeni su brzim ispiranjem sa 1% w/v sirćetnom kiselinom (200  $\mu$ l/ velu, 5 puta). Inkorporirana boja u ćelijama rastvorena je dodavanjem 100  $\mu$ l 10mM Tris-base pufera (pH 10,5). Nakon 5 minuta, ploče su promućkane na šejkeru zatim je izmerena apsorbancna na 492nm i referentnoj 690nm talasnoj dužini.

Citotoksičnost/proliferativni efekat, procenat vijabilnih (preživelih) ćelija u odnosu na kontrolu izračunat je na isti način kao kod MTT testa.

#### 4.11. Statistička analiza

Za statističku analizu korišćen je programski paket STATISTICA (StatSoft, Inc. (2013), version 12.0 ([www.statsoft.com](http://www.statsoft.com))). Sva merenja su urađena u triplikatima, a dobijene vrednosti su izražene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. Eksperimentalni podaci su podvrgnuti Student's t-test da bi se utvrdila značajnost razlika na nivou  $p < 0,05$  između različitih ekstrakata i testova. Pearson korelacije su izračunate između sadržaja ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i  $IC_{50}$  na različitim antioksidantnim i antiproliferativnim testovima u programu Statistika. Za određivanje varijabilnosti uzoraka korišćene su aglomerativne politetičke klaster analize a rezultati su prikazani su horizontalnim klasterom i analize osnovnih komponente PCA.



## 5. REZULTATI I DISKUSIJA

### 5.1. Hemijski sastav ekstrakata gljiva

U okviru preliminarnog ispitivanja hemijskog sastava ekstrakata plodnih tela autohtonih vrsta gljiva pripadnika razdela Basidiomycota primenjene su sledeće tehnike:

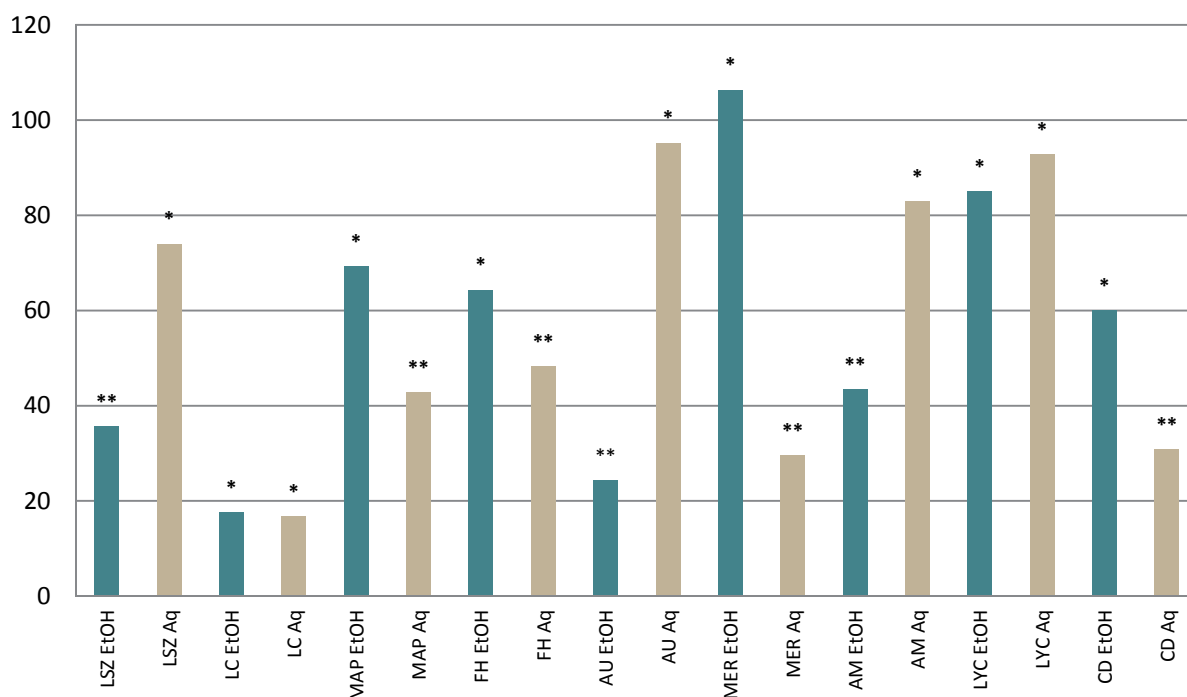
- spektrofotometrijska tehnika - određivanja sadržaja fenola i flavonoida;
- HPLC-MS/MS tehnika - dokazivanje prisustva fenolnih komponenti / hemijsko profilisanje fenolnih komponenti;
- GC/FID tehnika - ispitivanje sadržaja metil estara masnih kiselina;
- elektroforezom na mikročipu ("LAB-ON-A-CHIP" kapilarnom elektroforezom) izvršena je karakterizacija proteinskih frakcija u odabranim vrstama gljiva;
- AAS atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom - kvantitativno je određen sadržaj mikro i makro elemenata (K, Mg, Ca, Cu, Zn, Mn, Fe)

#### 5.1.1. Ispitivanje prisustva fenolnih jedinjenja u ekstraktima

U ispitivanim etanolnim i vodenim ekstraktima poreklom iz devet vrsta gljiva (MER - *M. giganteus*, LSZ - *L. sulphureus* AU - *A. auricula-judae*, FH - *F. hepatica*, AM - *A. mellea*, CD - *C. disseminatus*, LC - *L. controversus*, LYC - *L. perlatum*, MAP - *M. procera*) određen je sadržaj ukupnih fenola i flavonoida (Slika 5.1. i 5.2. Prilog 8.2.).

Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim etanolnim i vodenim ekstraktima (EtOH i Aq) kretao se u vrednostima od 16,68 mgGK/g do 106,33 mgGK/g. Najveći sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim EtOH ekstraktima utvrđen je kod vrste *M. giganteus* (106,33 mgGK/g), dok je među analiziranim Aq ekstraktima najveći sadržaj fenolnih jedinjenja zabeležen kod vrste *A. auricula-judae* (95,16 mgGV/g). Nešto niže koncentracije zabeležene su u EtOH i Aq ekstraktima kod vrste *L. perlatum* (85,03 mgGK/g, 92,73 mgGK/g). Najmanju količinu ukupnih fenola sadržali su EtOH i Aq ekstrakti vrste *L. controversus*, (17,55 mgGK/g i 16,68 mgGK/g).

Značajna razlika u odnosu na sadržaj ukupnih fenola uočena je u odnosu na vrstu gljive i na tip ekstragensa. Kod sedam ispitanih vrsta postoji statistički značajna razlika u sadržaju fenola između ispitanih EtOH i Aq ekstrakata. Kod četiri vrste (*M. procera*, *F. hepatica*, *M. giganteus* i *C. disseminatus*) etanolni ekstrakti pokazuju statistički značajno ( $p < 0,05$ ) veći sadržaj ukupnih fenola u odnosu na vodene ekstrakte. Vodeni ekstrakti vrsta (*A. auricula-judae*, *L. sulphureus* i *A. mellea*) pokazuju značajno veći sadržaj ukupnih fenola u odnosu na EtOH ekstrakte istih vrsta. Ispitivani EtOH i Aq ekstrakti vrsta *L. perlatum* i *L. controversus* ne pokazuju statistički značajnu razliku u sadržaju ukupnih fenola.



Slika 5.1. Poređenje sadržaja ukupnih fenola u EtOH i Aq ekstraktima (mg GK/g) \*Stubići na histogramu sa različitim brojem zvezdica statistički se značajno razlikuju,  $p < 0,05$ .

Značajan antioksidativni potencijal prirodnih proizvoda pripisuje se polifenolnim jedinjenjima (Velioglu i sar., 1998; Puttaraju i sar., 2006) što je kod gljiva potvrđeno velikim brojem naučnih radova u mnogim zemljama i regionima sveta, uključujući i Srbiju (Karaman i sar., 2009; Ferreira i sar., 2009; Vaz i sar., 2011b; Kalogeropoulos i sar., 2013; Stojković i sar., 2013; Stajić i sar., 2013; Heleno i sar. 2013b; Karaman i sar., 2014). Pri tome se ključna uloga ovih jedinjenja pripisuje upravo njihovom potencijalu u hvatanju slobodnih radikala (Komali i sar., 1999; Moller i sar., 1999).

Stoga je u okviru ovog rada sprovedena detaljna kvalitativna i kvantitativna hemijska analiza sadržaja fenolnih jedinjenja nakon spektrofotometrijskog utvrđivanja njihovog ukupnog sadržaja. Dobijeni rezultati o sadržaju ukupnih fenola ukazuju na veći sadržaj ovih jedinjenja u ispitivanim uzorcima u odnosu na do sada objavljene rezultate za sledeće vrste: *L. perlatum* 34,56 mgGK/g, *A. mellea* 26,89 mgGV/g i *M. procera* 13,78 mgGK/g (Vidović, 2011).

Etanolni ekstrakt vrste *M. giganteus* pokazao je devet puta veći sadržaj ukupnih fenola u odnosu na ranije objavljene rezultate za ovu vrstu poreklom sa Fruške gore, gde je zabeležen sadržaj ukupnih fenola iznosio 11,15 mgGV/g u metanolnom ekstraktu, a u vodenom 10,78 mgGV/g (Karaman i sar., 2009). Rezultati dobijeni za vodene ekstrakte vrsta *M. procera*, *A. auricula-judae* jesu u saglasnosti sa do sada objavljenim rezultatima (Puttaraju i sar., 2006; Oke i Aslim, 2011).

Brojne su studije, koje govore o biološkoj aktivnosti polifenolnih jedinjenja kao antioksidanata, (Karaman i sar. 2009a, 2014; Ferreira i sar., 2009; Carcho i Ferreira, 2013,) antikancerogenih jedinjenja (Carcho i Ferreira, 2013; Heleno i sar., 2014a) i antimikrobnih jedinjenja (Karaman i sar. 2009a, b, Alves i sar., 2013). Rice–Eva i sar. (1996) su u ranijim studijama objavili

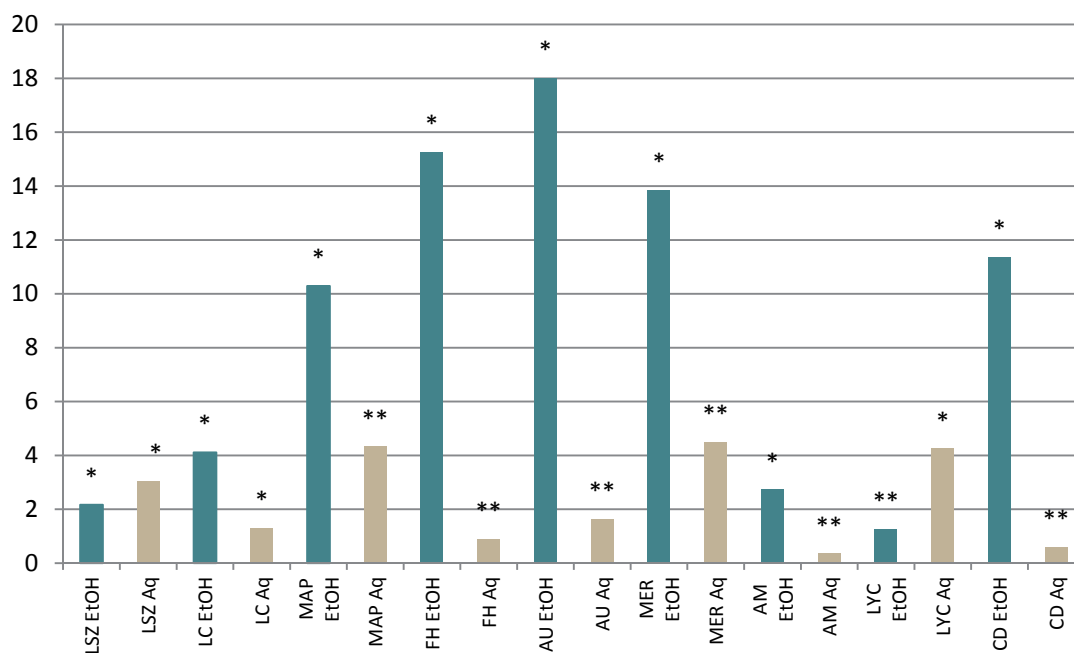
antiradikalisku aktivnost p-OH –benzoeve kiseline, antimikrobnu aktivnost u odnosu na patogene bakterije i plesni (Heleno i sar., 2013), antimutagenu aktivnost (Puga i sar., 2005).

### 5.1.2. Ispitivanje prisustva flavonoida u ekstraktima

Antioksidativna svojstva prirodnih supstanci najčešće se pripisuju fenolnim supstancama kao što su polifenoli, kojima pripadaju i flavonoidi. Flavonoidi su snažni “hvatači” reaktivnih oblika kiseonika ( $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{O}_2\cdot^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), pri čemu njihova antioksidantna aktivnost raste sa uvođenjem dodatnih *orto*-hidroksilnih grupa u B prstenu (Orčić, 2010). Takođe je dokazano da flavonoidi pokazuju širok spektar biološke tj. farmakološke aktivnosti, kao što su antimikrobna, antimutagena i antikancerogena aktivnost (Cook i Samman, 1996; Kandaswami i Middleton, 1997, Ren i sar., 2003).

Sadržaj ukupnih flavonoida za ispitivane EtOH i Aq ekstrakte kretao se u rasponu od 18,0 mgKV/g do 0,34 mgKV/g (Slika 5.2. i Prilog 8.2.). Najveći sadržaj flavonoida kod etanolnih ekstrakta zabeležen je kod vrste *A. auricula-judae* (18,0 mgKV/g), vodeni ekstrakt sa najvećim sadržajem flavonoida je *M. giganteus* (4,47 mgKV/g). Najniža koncentracija ove klase jedinjenja zabeležena je u EtOH ekstrakta kod vrste *L. perlatum* (1,30 mgKV/g) i Aq ekstraktima kod vrste *A. mellea* (0,27 mgKV/g).

Poređenjem vrednosti ukupnih flavonoida za EtOH i Aq ekstrakte zapaža se da EtOH ekstrakti ostvaruju značajno veće ( $p < 0,05$ ) vrednosti od Aq ekstrakata, osim u slučaju vrste *L. perlatum*, dok kod vrsta *L. controversus* i *L. sulphureus* ne postoji statistički značajna razlika u sadržaju ukupnih flavonoida između dva ispitana ekstrakta (Slika 5.2.)



Slika 5.2. Poređenje sadržaja ukupnih flavonoida u EtOH i Aq ekstraktima (mgKV/g). \*Stubići na histogramu sa različitim brojem zvezdica statistički se značajno razlikuju,  $p < 0,05$ .

Rezultati naših istraživanja ukazuju na veći sadržaj ukupnih flavonoida u odnosu na ranije objavljene rezultate za ekstrakte vrste *M. giganteus* (Karaman i sar., 2009), *M. procera* (Vidović, 2011). Vrste poreklom iz Portugala, Turske i Kine (Barros i sar., 2008 d; Gursoy i sar., 2009; Liu i sar., 2012) takođe imaju manji sadržaj ukupnih fenola u odnosu na vrste ispitivane u ovoj studiji. Vrednosti sadržaja ukupnih flavonoida za vrstu *A. mellea* manje su od rezultata Vidović, 2011.

### 5.1.3. Ispitivanje ekstrakata primenom HPLC-MS/MS tehnike

Primenom **HPLC-MS/MS** tehnike putem kvantifikacije standarda za četrdeset pet fenolnih komponenti u ispitivanim metanolnim ekstraktima gljiva (Prilog 8.3.), dokazano je prisustvo samo deset (p-OH-benzoeva kiselina, protokatehinska kiselina, p-kumarinska kiselina, kafena kiselina, hinska kiselina, krizoeriol, hlorogenska kiselina, Api-7-O-Glc, Lut-7-O-Glc, amentoflavon).

Kod ispitivanih ekstrakata najveća koncentracija detektovanih polifenolnih jedinjenja zabeležena je kod vrste *M. giganteus* (26,66 µg/g), koja je sadržala i najveću koncentraciju p-OH benzoeve kiseline (23,9 µg/g), (Tabela 5.1). Nešto niža koncentracije polifenolnih jedinjenja zabeležena je kod vrste *C. disseminatus* (20,16 µg/g) sa detektovanim kiselinama: p-OH benzoeva (9,46 µg/g), protokatehinska (0,7 µg/g), p-kumarinska (7,8 µg/g) i hlorogenska kiselina (0,7 µg/g).

Tabela 5.1. Rezultati kvantitativne HPLC-MS/MS analize fenolnih komponenti µg/g.

Jedinjenja	MER	AU	FH	LSZ	CD	LC
<b>fenolne kiseline</b>						
<b>p-OH-benzoeva k.</b>	23,9	↓gd	↓gd	↓gd	9,46	↓gd
<b>protokatehinska k.</b>	1,26	↓gd	1,50	↓gd	0,7	↓gd
<b>p-kumarinska k.</b>	0,2	↓gd	12,8	0,3	7,8	↓gd
<b>kafena k.</b>	1,3	↓gd	4,8	↓gd	↓gd	↓gd
<b>hinska k.</b>	↓gd	↓gd	↓gd	↓gd	↓gd	8,9
<b>flavonoidi</b>						
<b>krizoeriol</b>	↓gd	↓gd	↓gd	↓gd	0,3	↓gd
<b>hlorogenska k.</b>	↓gd	↓gd	↓gd	↓gd	0,7	↓gd
<b>Api-7-O-Glc</b>	↓gd	↓gd	↓gd	↓gd	0,6	↓gd
<b>Lut-7-O-Glc</b>	↓gd	↓gd	↓gd	↓gd	0,2	↓gd
<b>amentoflavon</b>	↓gd	↓gd	↓gd	↓gd	0,4	↓gd
<b>ukupno</b>	26,66		19,1	0,3	20,16	8,9

\*↓gd – ispod nivoa detekcije

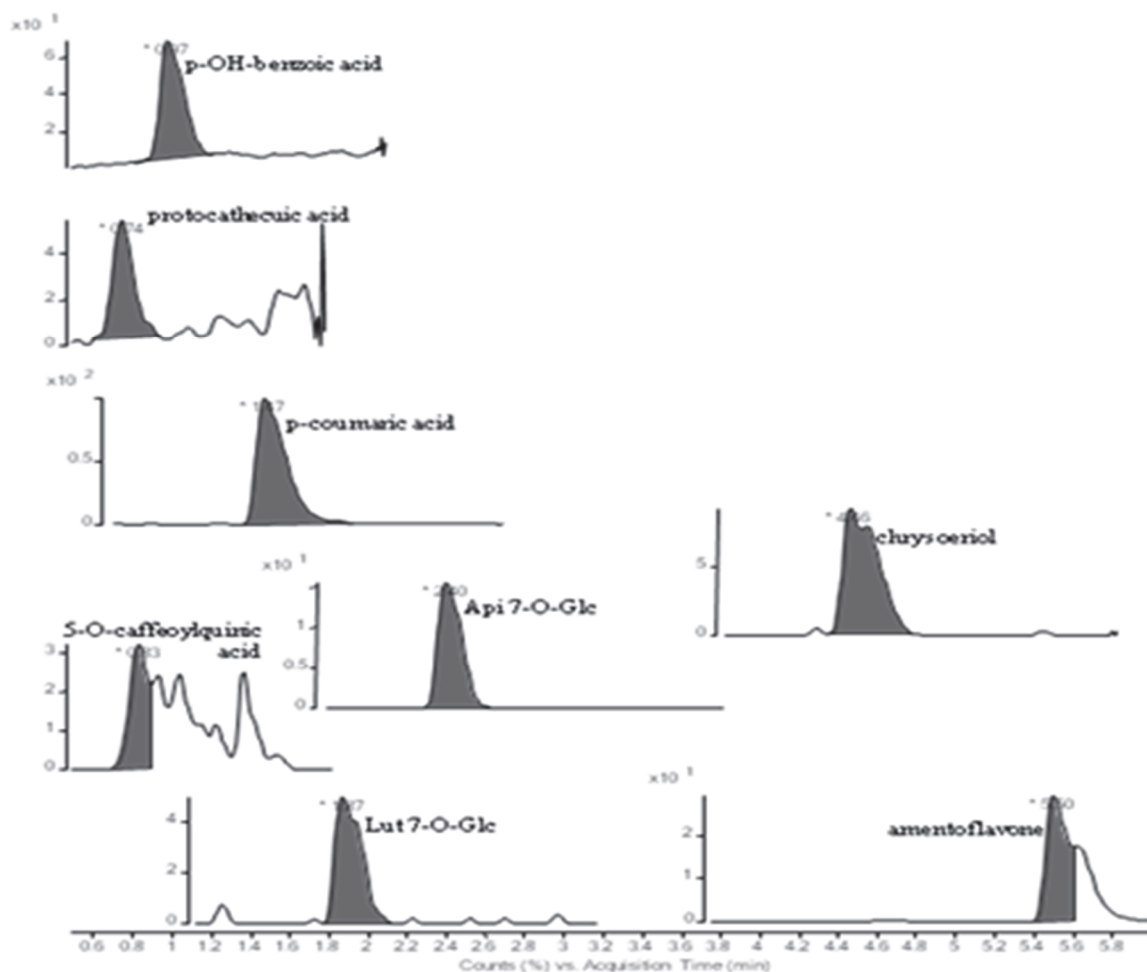
Pored fenolnih kiselina detektovane su i druge klase polifenolnih jedinjenja, flavonoidi: krizoeriol, Api-7-O-Glc, Lut-7-O-Glc, i amentoflavon, koji u ranijim istraživanjima nije detektovan u gljivama.

U pogledu raznovrsnosti fenolnih jedinjenja među ispitivanim vrstama ističe se vrsta *C. disseminatus* (Slika 5.3.). Sličan profil (prisustvo p-OH-benzoeva, p-kumarinska kiseline) ranije je

ustanovljen kod divlje rastuće vrste *Coprinus comatus* poreklom iz Portugala (Vaz i sar., 2011) i vrste *C. comatus* iz Srbije (Stojković i sar., 2013).

U uzorku *L. contraversus* dokazana je prisustvo samo jedne komponente hinske kiseline koja je ranije detektovana kod, *A. bisporus*, *A. comtulus*, *A. mellea*, *Boletus fragrans*, *L. nuda* (Barros i sar., 2013).

Kod vrste *L. sulphureus* detektovana je jedna fenolna kiselina p-kumarinska, predhodnih rezultati za ovu vrstu poreklom iz Srbije navode sadržaj p-OH-benzoeva i cimetine kiseline (Petrović i sar., 2014). Rezultati Olennikov i sar. (2011) za vrstu poreklom iz Rusije navode sadržaj više fenolnih kiselina (katehinsaka, galna hlorogenska, kafena i p-kumarinska) i flavonoida (kvercetin i kempferol).



Slika 5.3. MRM (Multiple Reactions Monitoring) detektovanih jedinjenja u metanolnom ekstraktu *C. disseminatus*, dobijenih HPLC-MS/MS.

Od 45 analiziranih komponenti u metanolnom ekstraktu vrste *A. auricula-judae* sve analizirane komponente su bile ispod nivoa detekcije, što je u suprotnosti sa ranijim podacima Oke i Aslim (2011) za vrstu poreklom iz Turske kod koje je detektovano 8 fenolnih kiselina od kojih su dominantne bile: galna - 636  $\mu\text{g/g}$ , p-OH-benzoeva - 488  $\mu\text{g/g}$ , kafena - 76  $\mu\text{g/g}$ , p-kumarinska kiselina - 12  $\mu\text{g/g}$  i cimetna kiselina - 8  $\mu\text{g/g}$ .

Dobijeni rezultati za ispitivanu vrstu *M. giganteus* ukazuju na razlike u pogledu detektovanih fenolnih kiselina, p-kumarinske i kafene kiseline u odnosu na publikovane rezultate Karaman (2009) iz uzorka poreklom sa Fruške gore u kome navedene fenolne kiseline nisu detektovane, ali je zabeleženo prisustvo galne kiseline (675mg/g) i protokatehinske kiseline (279mg/g).

Sadržaj fenolnih kiselina u uzorku *F. hepatica* poreklom iz Portugala, protokatehinska – 67,62 µg/g, p-OH-benzoeva – 41,92 µg/g i cimetna kiselina - 8 µg/g (Vaz i sar., 2012 b), je znatno viši u odnosu na uzorke analizirane u ovom eksperimentu, kao i odsustvo p-kumarinske kiseline koja na osnovu rezultata ove studije predstavljala vodeću fenolnu kiselinu (12.8 µg/g). Odsustvo p-kumarinske kiseline i kafene kiseline navedeno je i kod vrste sa Fruške gore (Karaman 2009).

Za razliku od ovih rezultata druga istraživačka grupa (Ribeiro i sar., 2007) je analizirala profil fenolnih jedinjenja kod iste vrste *F. hepatica* takođe iz Portugala i detektovala fenolne kiseline: kafenu i p-kumarinsku kiselinu, što je u saglasnosti sa rezultatima ove studije.

Analizirajući do sada publikovane podatke za ispitivane vrste (Ribeiro i sar., 2007; Karaman i sar., 2010; Oke i Aslim, 2011; Petrović i sar., 2014) došli smo da zaključka da je teško upoređivati sadržaj ovih jedinjenja imajući u vidu njihovu veliku varijabilnost. Pored navedenog, detekcija polifenolnih jedinjenja nije uvek obuhvatala ista jedinjenja (nema uniformnosti rezultata).

Razlike u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu u odnosu na jedinjenja koja su uočena poređenjem naših i prethodnih istraživanja mogu biti posledica promena koje nastaju tokom i nakon vremena prikupljanja uzoraka, uzimajući u obzir enzimske i oksidativne procese, kao i nestabilnost polifenolnih jedinjenja. Ova činjenica u kombinaciji sa različitim sredinskim faktorima i faktorima stresa kojima su gljive izložene, kao i različitim pristupima kada je metodologija ekstrakcije u pitanju, pored moguće genetske varijabilnosti, mogla bi objasniti uočene razlike između rezultata, kada je upitanju sadržaj polifenolnih jedinjenja (Ribeiro i sar., 2007; Vaz i sar., 2011).

Odsustvo detekcije polifenolnih jedinjenja može biti posledica primenjene ekstrakcije, koja je podrazumevala pripremu ekstrakata gljiva bez tople ekstrakcije, tj. primena toplote je izbegnuta upravo zbog činjenice da su ova jedinjenja nestabilna i da lako gube antioksidativna svojstva (Vaz i sar., 2011). Međutim, rezultati Choi i sar. (2006) podržavaju stav da topla ekstrakcija signifikantno ( $p < 0,05$ ) povećava sadržaj slobodnih fenolnih i flavonoida jedinjenja u odnosu na sirovi ekstrakt.

#### 5.1.4. Ispitivanje prisustva masnih kiselina

U cilju definisanja sastava masnih kiselina pripremljeni uzorci analizirani su na gasnom hromatografu (GC). Od 36 metil-estara masnih kiselina u ispitivanim vrstama identifikovano je ukupno 30 (Tabela 5.2).

Tabela 5.2. Rezultati GC analize metil-estera masnih kiselina (%).

	MK	LYC	CD	MAP	LC	AM	LSZ	MER	AU	FH
1	<b>C6:00</b>	4,46	2,60	2,32	<b>0,53</b>	0,69	1,24	0,56	0,00	0,50
2	<b>C8:00</b>	0,00	0,00	0,39	<b>0,37</b>	0,00	0,60	0,00	0,00	0,00
3	<b>C10:00</b>	0,00	0,00	1,00	<b>1,09</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	<b>C12:00</b>	0,56	0,00	0,61	<b>0,22</b>	1,26	0,00	0,00	0,00	0,00
7	<b>C14:00</b>	0,78	1,14	1,25	<b>0,47</b>	0,56	1,03	0,09	0,00	0,00
9	<b>C15:00</b>	2,01	0,51	0,63	<b>1,15</b>	0,51	1,58	0,20	0,00	0,56
11	<b>C16:00</b>	<b>16,56</b>	<b>13,86</b>	<b>16,61</b>	<b>12,34</b>	<b>13,28</b>	<b>9,68</b>	<b>13,10</b>	<b>16,47</b>	<b>16,25</b>
12	<b>C16:01</b>	0,28	1,85	1,54	0,78	6,69	0,00	0,57	1,35	0,00
13	<b>C17:00</b>	0,44	0,00	0,99	0,21	0,00	0,68	0,00	0,00	0,00
14	<b>C17:01</b>	0,43	0,63	0,00	0,77	0,00	0,31	0,00	0,00	0,00
15	<b>C18:00</b>	1,98	3,56	1,74	5,80	4,17	1,61	1,17	4,84	5,33
16	<b>C18:1n9t</b>	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	<b>C18:1n9c</b>	<b>2,15</b>	<b>12,04</b>	<b>5,90</b>	<b>31,52</b>	<b>36,04</b>	<b>11,01</b>	<b>32,48</b>	<b>35,15</b>	<b>17,33</b>
18	<b>C18:2n6t</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19	<b>C18:2n6c</b>	<b>63,41</b>	<b>56,61</b>	<b>65,40</b>	<b>43,04</b>	<b>34,30</b>	<b>68,82</b>	<b>48,52</b>	<b>32,83</b>	<b>44,56</b>
20	<b>C20:00</b>	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21	<b>C18:3n6</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,57	0,83	0,00	0,00	0,00
22	<b>C20:01</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	0,00	0,41	0,00	0,00
23	<b>C18:3n3</b>	0,00	0,49	0,20	0,00	0,00	0,00	0,10	7,88	0,56
24	<b>C21:00</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	14,42
25	<b>C20:02</b>	0,00	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
26	<b>C22:00</b>	0,96	0,00	0,00	0,00	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00
27	<b>C20:3n6</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
28	<b>C22:1n9</b>	1,80	2,96	0,57	0,44	0,49	1,31	0,32	1,48	0,44
29	<b>C20:3n3</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,44	0,00	0,00	0,00
30	<b>C20:4n6</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,45	0,08	0,00	0,00
31	<b>C23:00</b>	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00	0,42	0,00	0,00	0,00
32	<b>C22:02</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	0,00	0,00
33	<b>C24:00:00</b>	0,00	0,73	0,70	0,72	0,83	0,00	0,62	0,00	0,00
34	<b>C20:5n3</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,92	0,00	0,00
35	<b>C24:01:00</b>	0,00	0,40	0,14	0,00	0,00	0,00	0,52	0,00	0,00
36	<b>C22:6n3</b>	4,17	1,96	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

1. Metil ester kapronske kiseline (C6:0); 2. Metil ester kaprilne kiselina (C8:0); 3. Metil ester kaprinske kiseline (C10:0); 4. Laurinska (C12:0); 5. Metil ester miristinske kiseline (C14:0); 6. Pentadekaenska kiselina metil ester (C15:0); 7. Metil ester palmitinske kiseline (C16:0); 8. Metil ester palmitoleinske kiseline (C16:1); 9. Metil ester Heptadekaenske kiselina (C17:0); 10. Metil ester cis-10-Heptadecenske kiseline (C17:1); 11. Metil ester stearinske kiseline (C18:0); 12. Metil ester oleinske kiseline (C18:1n9c); 13. Metil ester elaidinske kiselina (C18:1n9t); 14. Metil ester linolne kiseline (C18:2n6c); 15. Metil ester linoleilaidinske kiseline (C18:2n6t); 16. Metil ester  $\gamma$ -linolenske kiseline (C18:3n6); 17. Metil ester  $\alpha$ -linolenske kiseline (C18:3n3); 18. Metil ester arahidonske kiseline (C20:0); 19. Metil ester cis-11-eikosenske kiseline (C20:1n9); 20. Metil ester cis-11,14-eikosadienske kiseline (C20:2); 21. Metil ester cis-8,11,14-eikosatrienoinska kiselina metil ester (C20:3n6); 22. Metil ester cis-11,14,17-eikosatrienske kiseline (C20:3n3); 23. Metil ester arahidonske kiseline (C20:4n6); 24. Metil ester cis-5,8,11,14,17-eikosapentaenske kiseline (C20:5n3); 25. Metil ester heneicoesaenska kiselina (C21:0); 26. Metil ester behenske kiseline (C22:0); 27. Metil ester eruke kiseline (C22:1n9); 28. Metil ester cis-13,16-dokosaheksaenske kiseline (C22:2); 29. Metil ester cis-4,7,10,13,16,19-Dokosaheksaenska kiselina (C22:6n3); 30. Metil ester trikosaonske kiseline (C23:0); 31. Metil ester lignocerinske kiseline (C24:0); 36. Metil ester nervonske kiseline (C24:1n9).

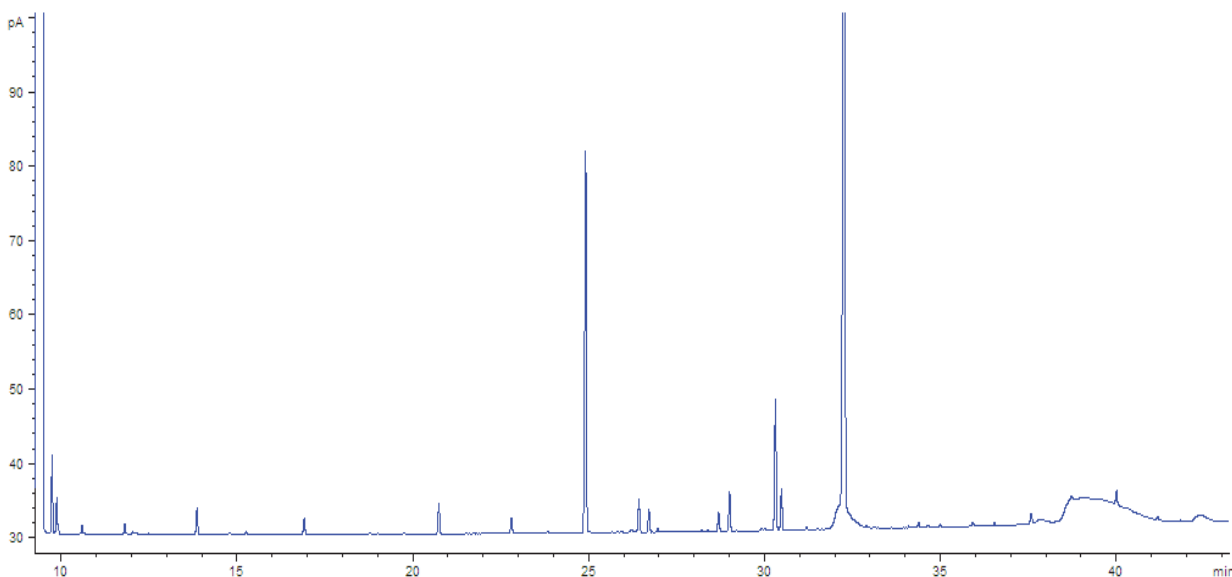
Analiza dobijenih profila pokazala je da su linolna, oleinska, palmitinska i stearinska kiselina dominantno prisutne masne kiseline u analiziranim vrstama gljiva, što je u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima za samonikle vrste (Miles i Chang, 2004; Ribeiro i sar., 2009).

Na osnovu rezultata kod svih ispitivanih vrsta dominantna masna kiselina je linolna (C18:2n6c) sa najvećim udelom od 68,82% kod vrste *L. sulphureus* i najmanjim udelom od 32,83% kod vrste *A. auricula-judae*. Sadržaj ove kiseline veći je od sadržaja koji su kod *L. sulphureus* (63,27%) iz Srbije detektovali Petrović i sar. (2014). Za vrstu *A. mellea* iz Turske (Yilmaz i sar., 2006) detektovan je veći sadržaj linoleinske kiseline (49,6%) u odnosu na uzorke ispitivane u ovoj studiji (34,30 %).

Ribeiro i sar., (2009) su utvrdili da je linolna kiselina dominantna masna kiselina za vrstu *F. hepatica* iz Portugala što je u saglasnosti sa našim rezultatima.

Udeo oleinske kiseline u ispitivanim uzorcima se kretao od 36,04% kod vrste *A. mellea* do 2,5% kod vrste *L. perlatum*, dok su prethodni rezultati (Yilmaz i sar., 2006; Petrović i sar., 2014) pokazali značajno manji sadržaj ove kiseline kod vrste *A. mellea* (4,55%) i *L. sulphureus* (14,52%) u odnosu na analizirani uzorak.

Palmitinska kiselina detektovana je u svim ispitanim uzorcima sa učešćem od 9,68% kod vrste *L. sulphureus* do 16,61% kod *M. procera* (Slika 5.4.). Dostupni podaci o sastavu masnih kiselina kod vrste *M. procera* poreklom iz Istre potvrđuju prisustvo ove kiseline sa nešto većim udelom (23,81%) za ekstrakt dobijen primenom superkritične ekstrakcije (Vidović, 2011).



Slika 5.4. GC-hromatogram pikova metil estara masnih kiselina vrste *M. procera*

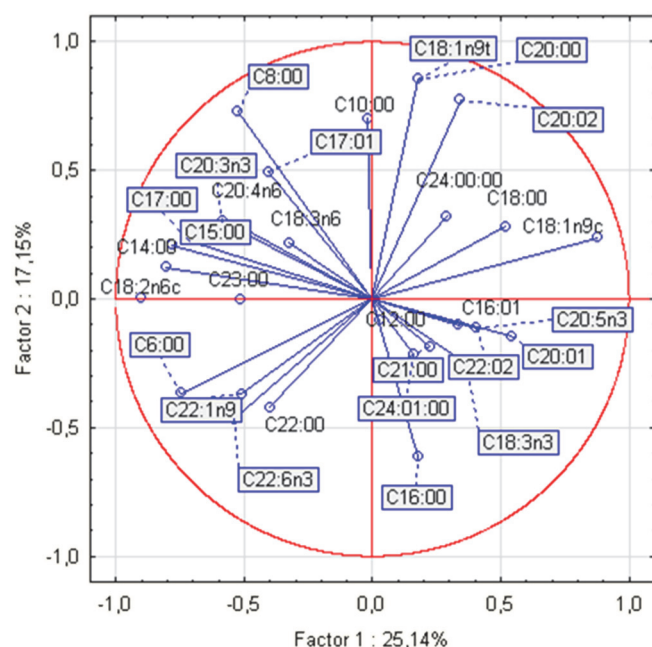
Ista studija pokazala je prisustvo palmitinske kiseline u uzorku vrste *A. mellea* sa udelom od 13,23%, što je u saglasnosti sa rezultatima ove studije, ali sa znatno većim udelom u odnosu na vrstu poreklom iz Turske kod koje je detektovano samo 1,04 % (Yilmaz i sar.,2006). Stearinska kiselina detektovana je u opsegu od 1,17 % kod vrste *M. giganteus* do 5,80% kod *L. controversus*. Prisustvo ostalih detektovanih kiselina je znatno manje i u velikoj meri je varirao od vrste do vrste, a



interesantno je pomenuti da je jedino kod vrste *F. hepatica* detektovana heneikosanoična (C21:O) kiselina sa 14,42%.

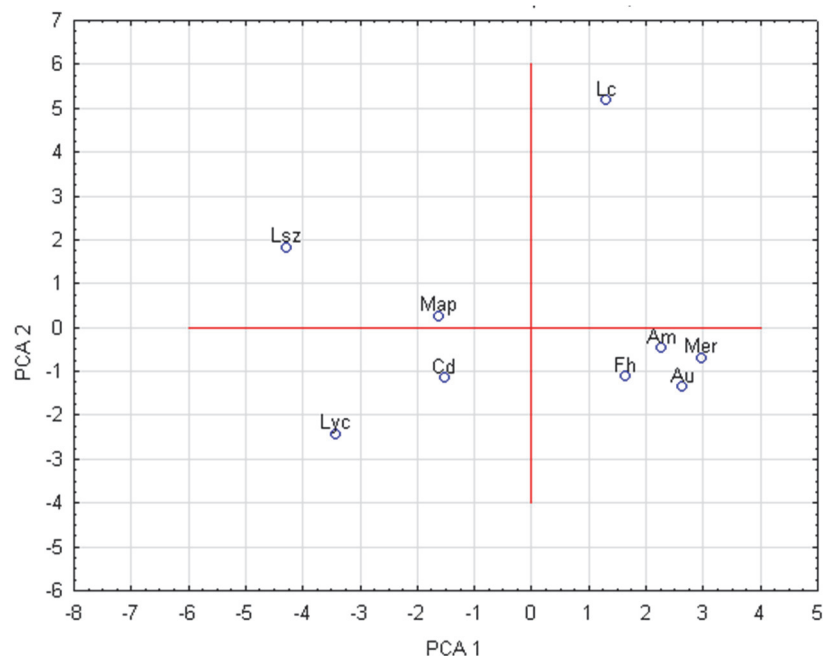
Kod vrsta *L. perlatum* i *C. disseminatus* detektovana je dokosaheksaenska kiselina (DHA) sa učešćem od 4,17 i 1,96%.

Dobijene vrednosti sadržaja masnih kiselina pokazale su veliku varijabilnost. Obim i tip varijabilnosti podataka ukazivao je na određene pravilnosti, te su dobijeni rezultati podvrgnuti multivarijantnoj statističkoj obradi kroz analizu osnovnih komponenti (PCA), kako bi se приметne pravilnosti u varijabilnosti potvrdile. Rezultati sprovedene analize prikazani su "scatter" dijagramom u prostoru prve dve glavne ose pri čemu je prvo razdvajanje (horizontalnom-X osom) bilo jače (25,14%) u odnosu na drugo (17,15%) razdvajanje (vertikalnom-Y osom). Najveći doprinos varijabilnosti ispitivanih uzoraka daju sledeće masne kiseline: C18:2n6c, C8:00, C18:1n9t, C20:02, C18:1n9c, C6:00 (Slika 5.5).



Slika 5.5: Razdvojenost metil estara masnih kiselina prema PCA analizi.

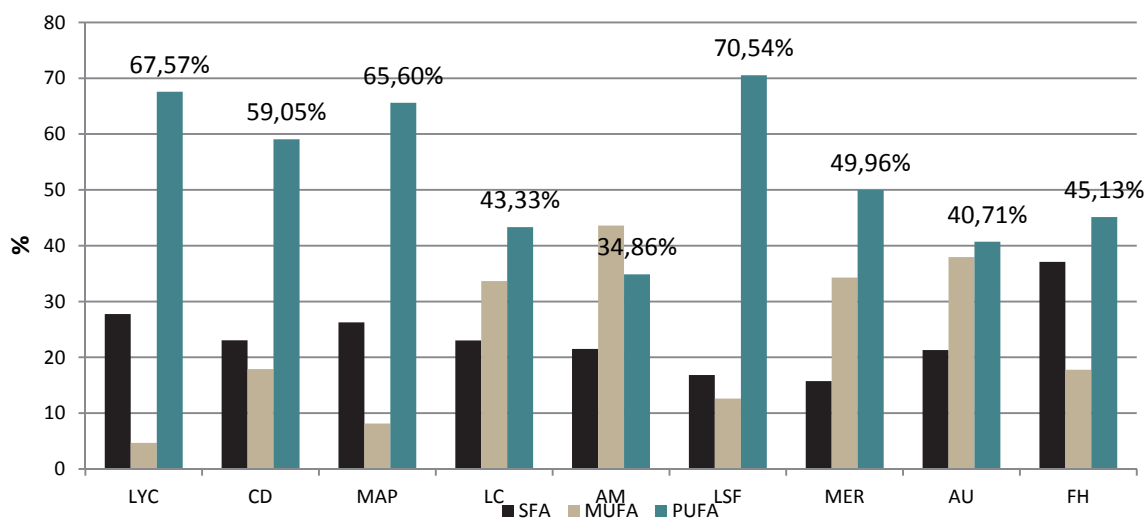
Na osnovu varijabilnosti vrednosti ispitivanih vrsta, mogu se definisati dve grupe gljiva sa sličnim modelom varijabilnosti: *A. mellea*, *M. giganteus*, *A. auricula-judae*, *F. hepatica* - jedna grupa, dok drugu grupu čine vrste *M. procera* i *C. disseminatus*. Kao zaseban oblik variranja izdvajaju se vrste *L. controversus* čije variranje karakteriše prisustvo C20:02, C18:1n9t i C20:00 masnih kiselina i vrsta *L. sulphureus* čije variranje karakteriše: C20:3n3 i najveći sadržaj C18:2n6c (linolna) i vrsta *L. perlatum* čije variranje karakteriše prisustvo C22:6n3.



Slika 5.6. Pozicije analiziranih uzoraka u prostoru 1. i 2. ose glavnih komponenti

Karakterizacija zasićenih (SFA), mononezasićenih (MUFA) i polinezasićenih (PUFA) profila masnih kiselina prikazana je na (Slici 5.7.)

Slika 5.7. Poređenje sadržaja zasićenih, (SFA) mononezasićenih (MUFA) i polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) u ispitivanim vrstama gljiva (%).



Procentualni sadržaj SFA je varirao od 15,79% do 37,08%, dok je sadržaj MUFA varirao od 4,66% do 43,61%, a sadržaj PUFA varirao je od 34,86% do 70,54%. Jasno je da je sadržaj nezasićenih masnih kiselina veći i od sadržaja SFA, što je u saglasnosti sa (Miles i Chang, 2004). Najveći sadržaj SFA zabeležen je kod vrste *F. hepatica* (37,08%), a najmanji kod vrste *M. giganteus* (15,73%), dok je najveći sadržaj PUFA zabeležen je kod *L. sulphureus* (70,54%), a najmanji kod *A. mellea* (34,86%), kod ove vrste zabeležen je najveći sadržaj MUFA (43,61%), a najmanji kod vrste *L. perlatum* (4,66%). Prikazani rezultati su u skladu sa ranijim publikacijama gde se navodi dominacija nezasićenih masnih kiselina u odnosu na sadržaj ukupnih masti u gljivama (Yilmaz i sar., 2006; Barros i sar., 2008; Kavishree i sar., 2008).

Zamena zasićenih masnih kiselina u ljudskoj ishrani nezasićenim masnim kiselinama je veoma važna jer dovodi do porasta HDL holesterola i smanjenja LDL holesterola i triglicerida u krvi (Isanga i Zhang, 2007). Sa druge strane, dokazano je da je ishrana bogata zasićenim mastima u korelaciji sa povećanjem faktora arterioskleroze i koronarnih bolesti srca (Wang i sar., 2003). Prethodne studije su pokazale veću efikasnost hemioterapije u sistemu lečenja kancera uz suplemente ili dijetu sa učešćem nezasićenih masnih kiselina (Hardman, 2004).

Prikazani rezultati jasno ukazuju na to da analizirane vrste gljiva predstavljaju izvor esencijalnih hranljivih supstanci, tj. nezasićenih masnih kiselina. Shodno dobijenim vrednostima sadržaja masnih kiselina u uzorcima gljiva, ispitane vrste se mogu preporučiti u niskokalorijskim dijetama, a zbog raznolikog sadržaja nezasićenih masnih kiselina, što je od velikog značaja za metabolizam i ljudsko zdravlje, one se mogu koristiti uz preporuku u redovnoj ishrani ili kao nutraceutici.

### 5.1.5. Ispitivanje sadržaja proteina

Gljive proizvode veliki broj proteina i peptida sa značajnim bioaktivnim svojstvima, kao što su: antibakterijska, antifungalna, antiviralna, antiparazitska, antiproliferativna, antikancerogena i imunomodularna svojstva. Tu pripadaju lektini (ugljenohidrat vezujući protein), imunomodulatorni proteini, ribozom deaktivirajući proteini, antimikrobni proteini, ribonukleaze itd. (Xu i sar., 2011). Bioaktivni proteini predstavljaju važan deo funkcionalnih makromolekula u gljivama, na koje se sve više obraća pažnja zbog njihovog farmakološkog potencijala i mogućnosti dalje primene u medicini (Wong i sar., 2010).

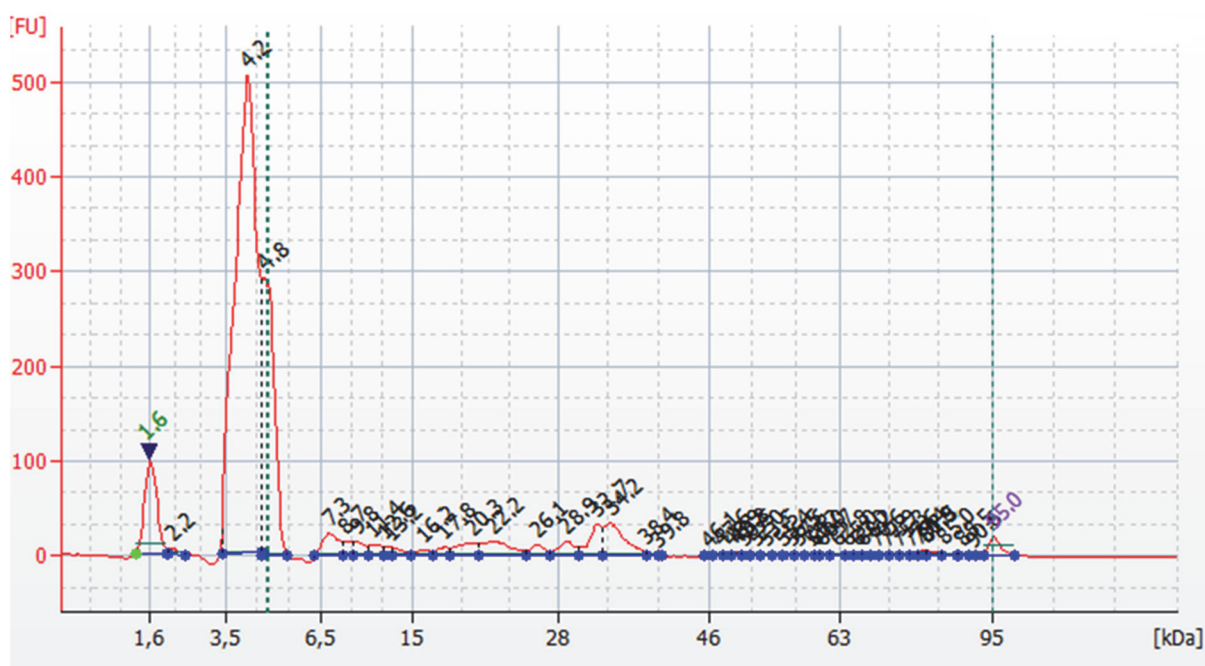
Sadržaj proteina u odabranim vrstama određen je standardnom metodom (AOA, 1995) (Tabela 5.3.). Identifikacija proteinskih frakcija u vodenim ekstraktima gljiva izvršena je elektroforezom na mikročipu.

Tabela 5.3. Pregled sadržaja proteina u ispitivanim vrstama. (%)

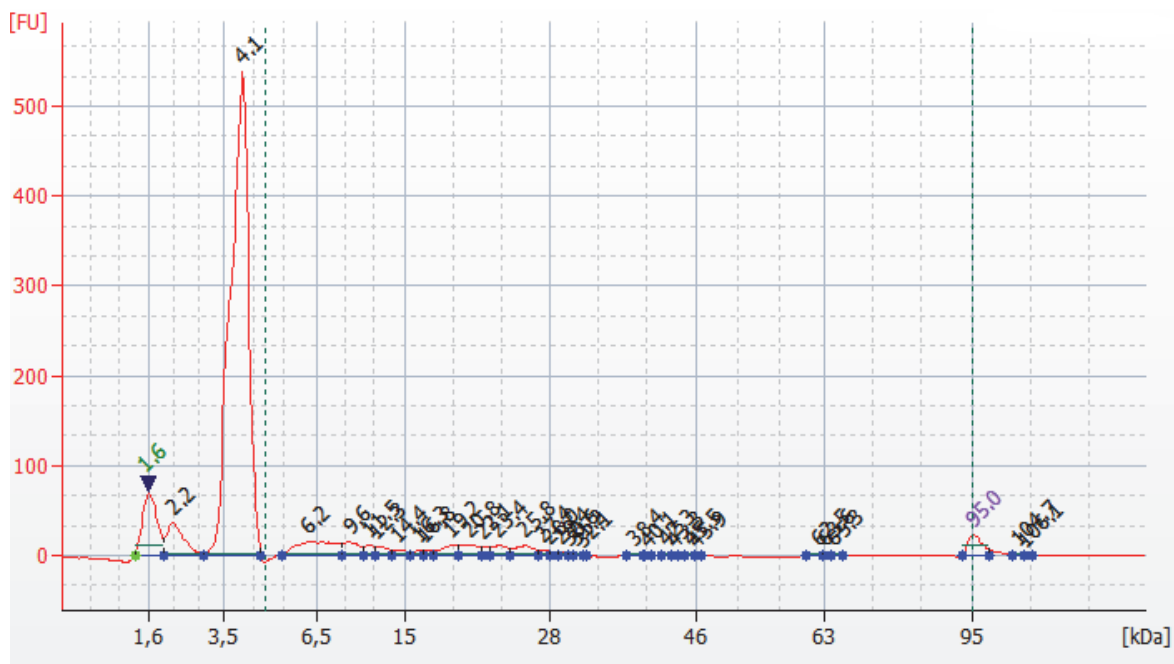
Proteina	LSZ	CD	AM	MER	FH	AU	LC	MAP
%	14,54	9,72	12,39	17,69	11,34	10,77	11,56	31,62
	±0,40	±0,03	±0,15	±0,00	±0,08	±0,15	±0,12	±0,13

Sadržaj proteina u odabranim vrstama gljiva kretao se od 9,72% do 31,62%. Najveći procenat proteina zabeležen je kod vrste *M. procera*, koja predstavlja gljivu visoko cenjenu po svojoj aromi i kvalitetu (Fernandes i sar., 2013), a najmanji kod vrste *C. disseminatus*. Ovi rezultati su u saglasnosti sa ranijim publikacijama koje ističu gljive kao nutritivno vredan resurs (Miles i Chang, 2004; Kalač, 2013). Nešto manji sadržaj proteina je zabeležen kod vrstu *M. procera* u odnosu na istu vrstu iz Makedonije (Petrovska, 2001) i znatno manji sadržaj proteina u odnosu na vrste *A. mellea* i *M. giganteus* (76,94% i 75,56%) iz Anatolije (Kalyoncu i sar., 2010). Navedeni rezultati govore u prilog tome da iste vrste koje potiču sa različitih geografskih područja i koje su izložene različitim uslovima životne sredine pokazuju razlike u sadržaju proteina (Petrovska, 2001; Kalač, 2013).

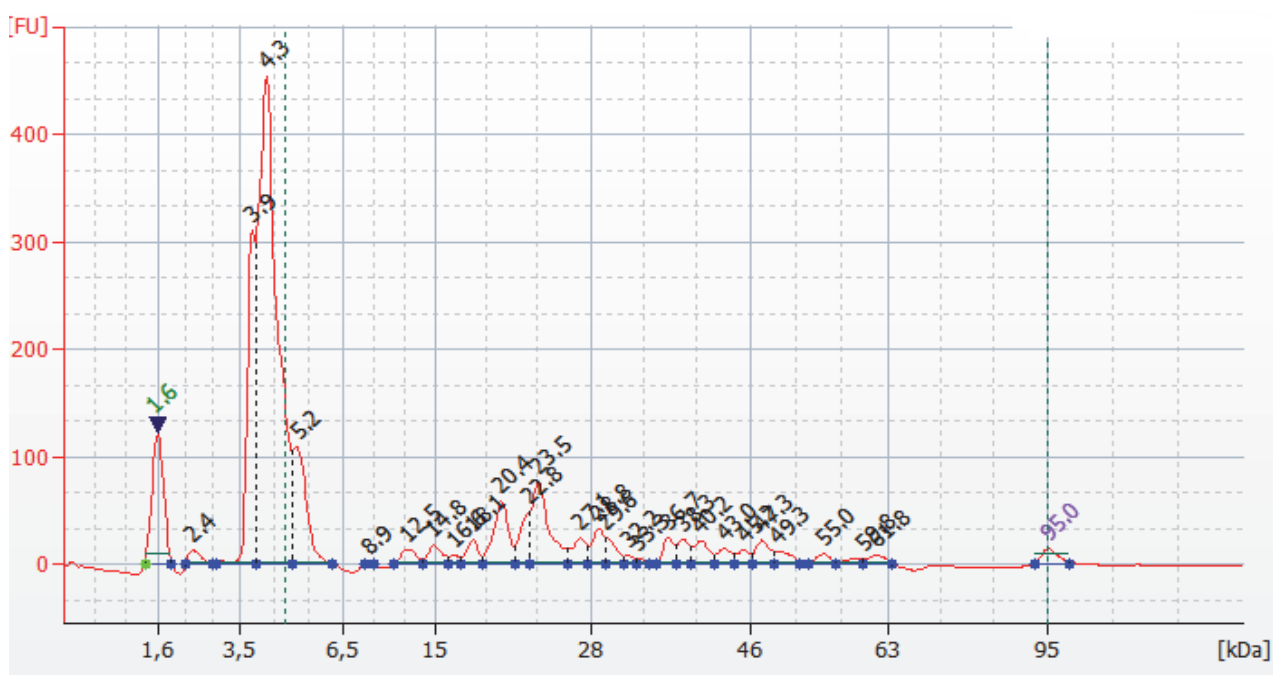
Elektroforetskom metodom ustanovili smo prisustvo proteinskih frakcija koje su se kretale u opsegu od 5,2 do 91,0 kDa. Rezultati ukazuju na veliku varijabilnost prisutnih proteinskih frakcija na osnovu detektovanih molekularskih masa (Slika 5.8 -5.15, Prilog 8.4.). Najveći broj detektovanih frakcija imala je vrsta *F. hepatica* (ukupno 46 frakcija), koje su se kretale u rasponu od 7,3 kDa do 90,9 kDa, sa najvećim udelom frakcije od 34,2 kDa od 14,3%.



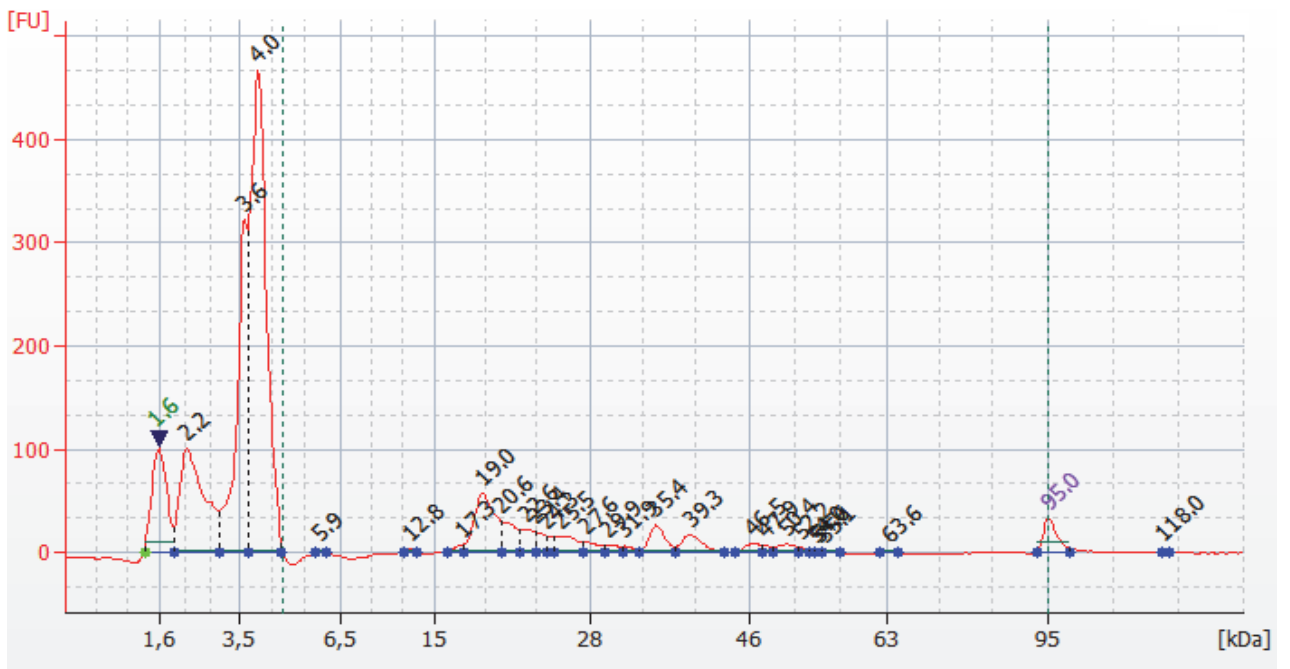
Slika 5.8. Elektroforegram vrste *F. hepatica*



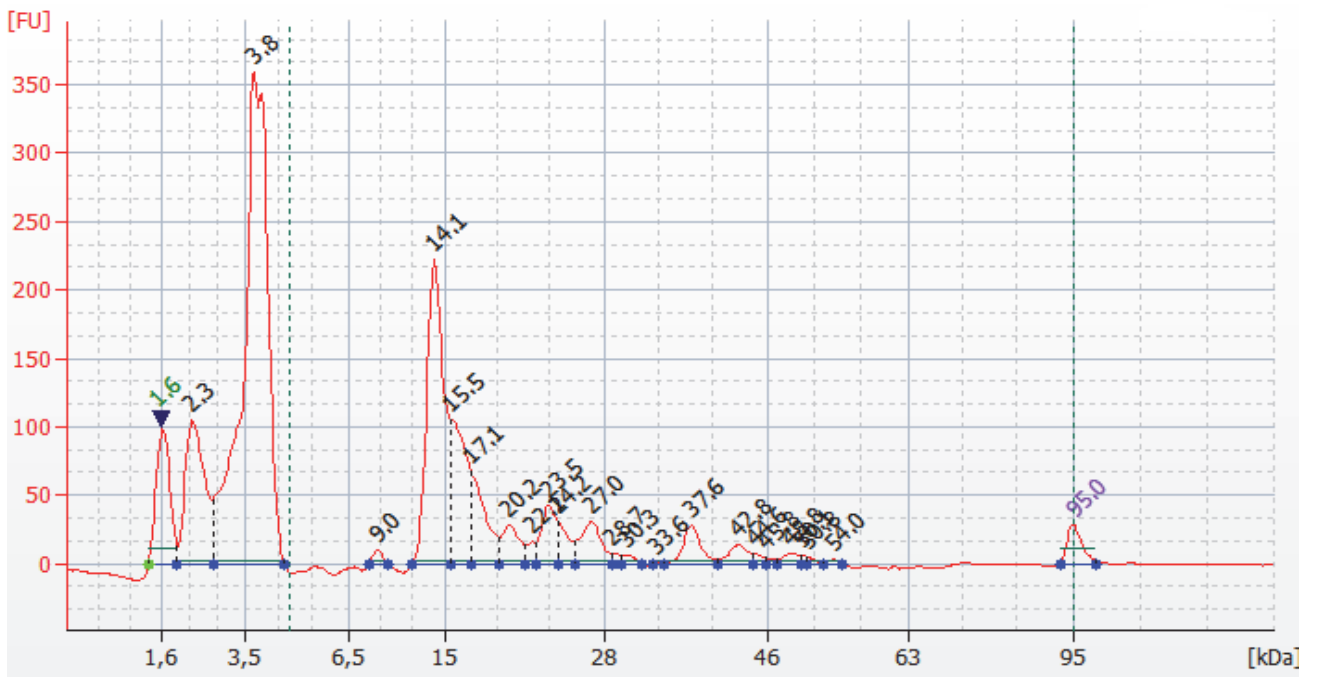
Slika 5.9. Elektroforegram vrste *C. disseminatus*



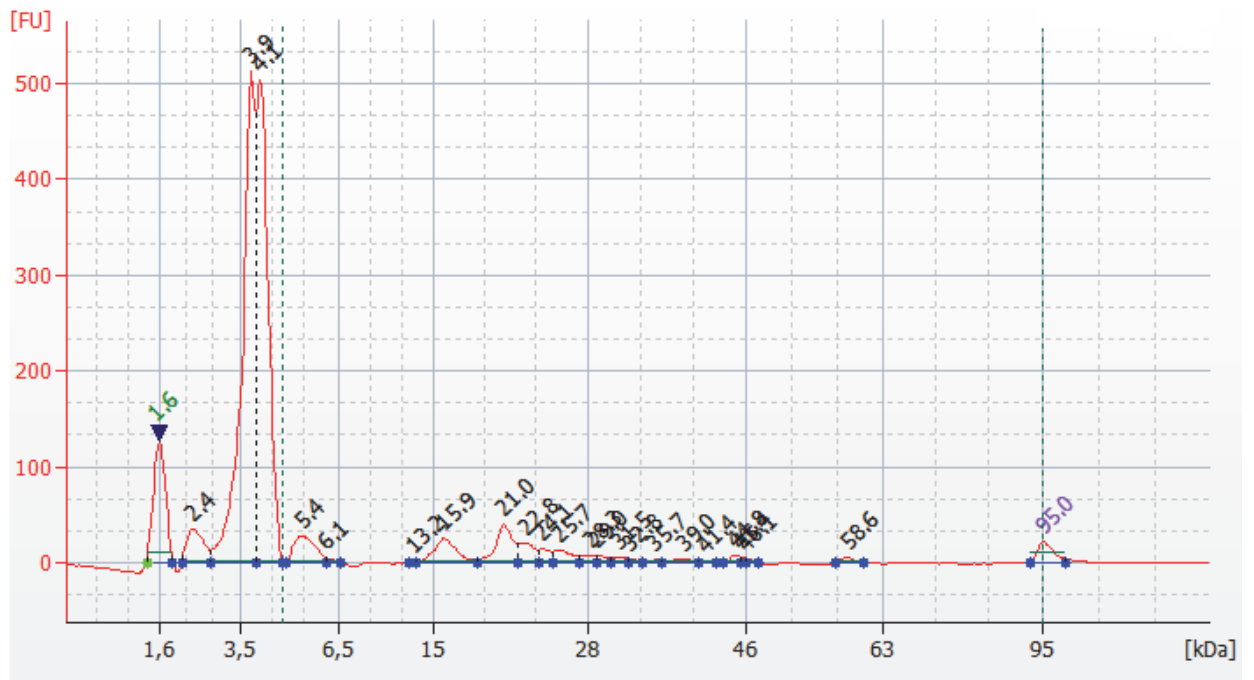
Slika 5.10. Elektroforegram vrste *M. procera*



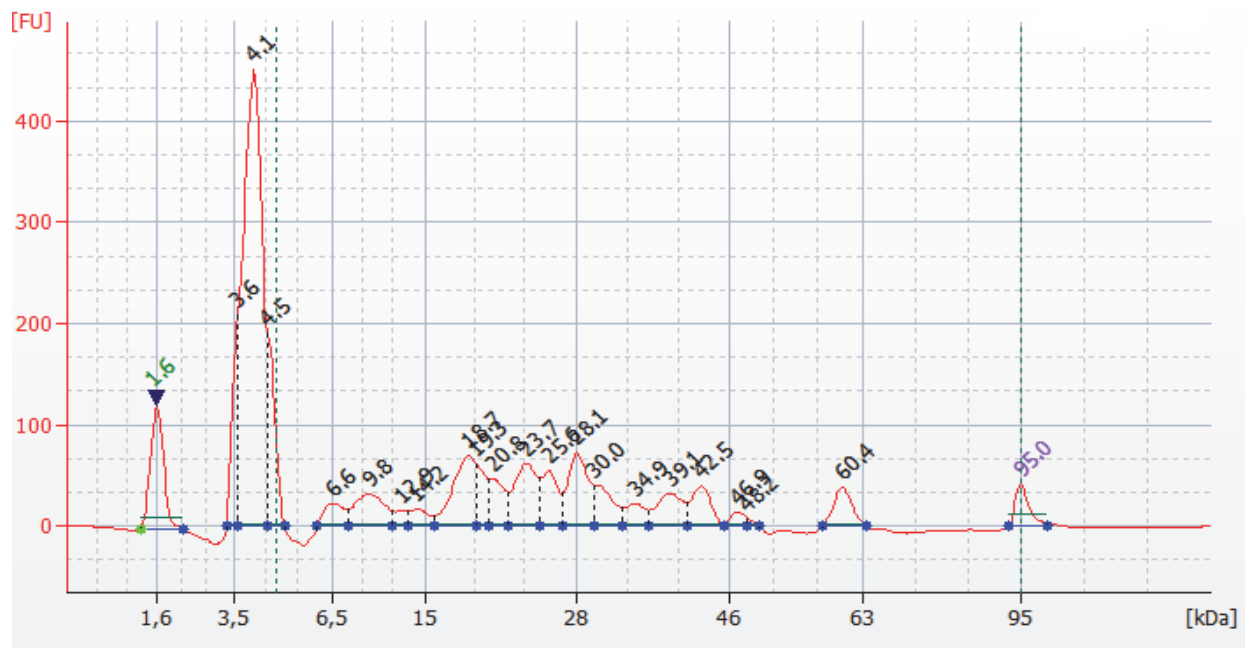
Slika 5.11. Elektroforegram vrste *A. mellea*



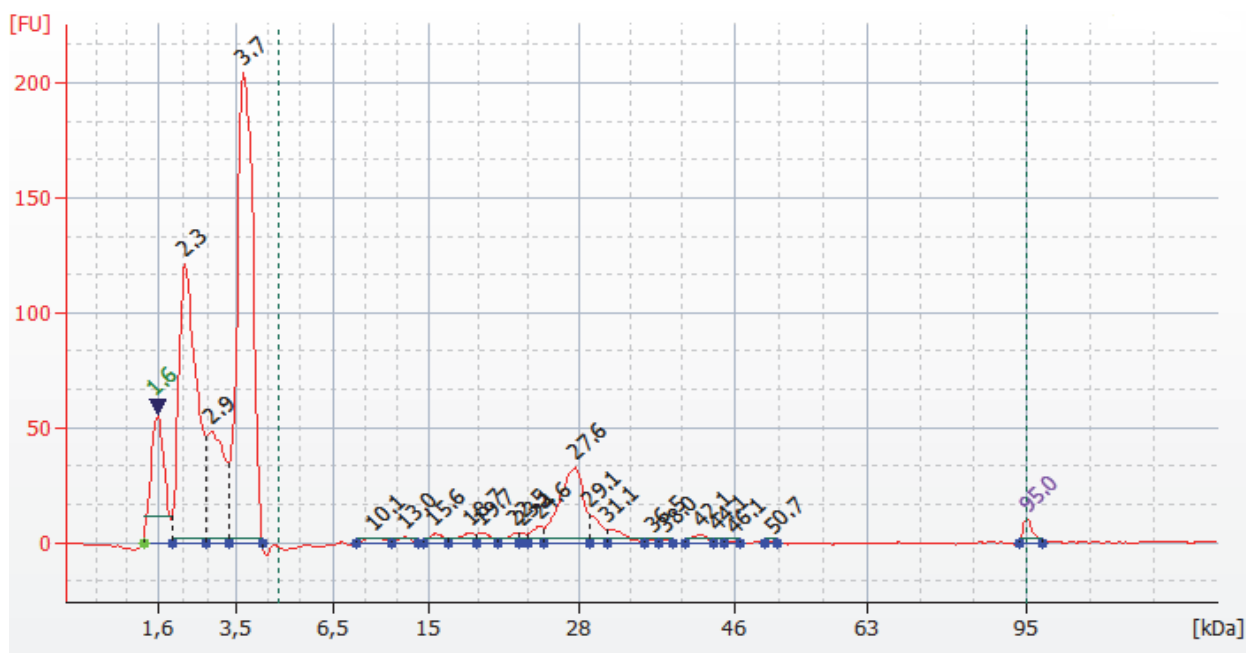
Slika 5.12. Elektroforegram vrste *L. perlatum*



Slika 5.13. Elektroforegram vrste *M. giganteus*



Slika 5.14. Elektroforegram vrste *L. sulphureus*



Slika 5.15. Elektroforegram vrste *A.auricula-judae*

Analizom dobijenih frakcija svih analiziranih uzoraka ustanovili smo prisustvo dve frakcije koje imaju identične molekulske mase sa do sada poznatim bioaktivnim jedinjenjima, šizolizin 29,0 kDa i lakaza 67,0 kDa.

Han i sar. 2010 izolovali su hemolizin molekulske mase od 29 kDa iz vrste *Schizophyllum commune*, detektovali N-terminalnu sekvencu koja se znatno razlikuje od ranije poznatog hemolizina poreklom iz gljiva i bakterija, za koji je dokazano da inhibira HIV-1 reverzne transkriptaze sa  $IC_{50}$  od 1,8  $\mu$ M.

*Lakaze* molekulske mase 67,00 kDa izolovane iz sveže gljive *Lentinus edodes* poseduju inhibitornu aktivnost prema HIV-1 reverznim transkriptazama,  $IC_{50} = 7,5$  M (Sun i sar., 2011).

Kod vrste *C. disseminatus* utvrđene su 32 proteinske frakcije, frakcija sa molekulskom masom od 27 kDa je od ranije poznatog biopotencijala. *Lentin* (27,5 kDa) izolovan iz vrste *Lentinus edodes* koji poseduje antifungalnu aktivnost, inhibira aktivnost reverzne transkriptaze HIV- 1 i inhibira proliferaciju ćelija leukemije (Ngai i Ng, 2003).

*L. sulphureus* u ispitivanom opsegu ima 25 proteinskih frakcija od kojih frakcije sa molekulskom masom od 10,9 i 13,8 kDa prema ranije objavljenim rezultatima poseduju bioaktivnost, *kordimin* (10,9 kDa) izolovan iz *Cordyceps militaris* i *velutin* (13,8 kDa) iz vrste *Flammulina velutipes* inhibira aktivnost reverzne transkriptaze HIV- 1 (Wong i sar., 2011; Wang i Ng, 2001).

Wang i Ng, 2004 su izolovali *lakazu* male molekulske mase 43 kDa iz sveže gljive *Tricholoma giganteum* koja poseduje inhibitornu aktivnost prema HIV-1 reverznim transkriptazama i znatno bolju inhibitornu aktivnost prema retroviralnim reverznim transkriptazama u odnosu na ostale aktivne proteine iz gljiva i drugih prirodnih proizvoda.

Prema našim rezultatima vrsta *M. procera* u ispitivanom opsegu ima 24 proteinske frakcije a među karakterisanim je i frakcija molekulske mase od 43 kDa sa udelom od 2,1%.



Vrsta *A. mellea* ima 24 frakcije sa najvećim udelom od 30,19 % frakcije molekulske mase 19,00 kDa.

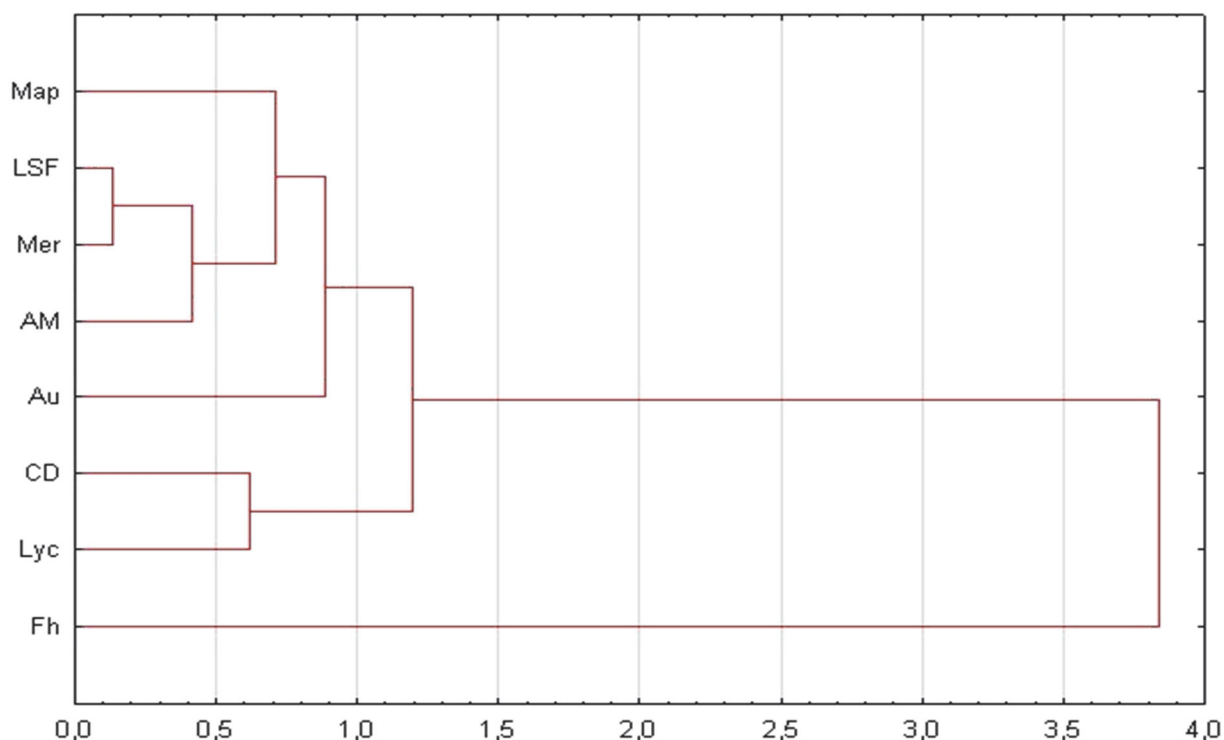
*L. perlatum* u ispitivanom opsegu ima 21 frakciju, a frakcija od 14,1 kDa ima najveći udeo od 42,17%. Wong i sar. 2008 su analizirali ribozom inaktivirajući protein *marmorin* izolovan iz sveže gljive *Hypsizygus marmoreus* molekulske mase 9 kDa koji ispoljava antiproliferativnu aktivnost u odnosu na MCF7 i HepG2 ćelije kancera.

Naši rezultati pokazuju da vrsta *M. giganteus* u ispitivanom opsegu ima 22 frakcije i da je najveći udeo (24,34%) frakcije sa najmanjom molekulskom masom 5,4 kDa.

Prema našim rezultatima vrsta sa najmanjim brojem frakcija u ispitivanom opsegu je *A. auricula-judae* sa 17 proteinskih frakcija u rasponu molekulskih masa od 10,2 do 50,5 kDa, i sa najmanjim procentom sadržaja proteina u odnosu na vrste ispitivane u ovoj studiji.

Iako je veliki broj studija koje su istraživale bioaktivne proteine u gljivama, ipak je malo dostupnih podataka o vrstama koje su istraživane u ovoj studiji.

Naši rezultati govore u prilog tome da su analizirane vrste gljiva bogate različitim proteinskim frakcijama za koje možemo samo da pretpostavimo da su kompatibilni sa već izolovanim aktivnim proteinima iz drugih vrsta gljiva, jer nismo bili u mogućnosti da determinišemo N-terminalne sekvence kao ni izolaciju frakcija za koje pretpostavljamo da imaju određenu biološku aktivnost.



Slika 5.16. Klaster ispitivanih vrsta prema zastupljenosti proteinskih frakcija (%).

Procentualna zastupljenost dobijenih vrednosti molekulskih masa proteinskih frakcija podvrgnute su diskriminantnoj analizi sa *a priori* definisanim grupama u cilju prikazivanja njihove

povezanosti ili sličnosti u njihovim procentualnim vrednostima. S obzirom da su dobijene vrednosti izuzetno varirale podvrgnute su logaritmovanju te su kao takve procesuirane sa diskriminantnim vektorima. Izračunate vrednosti Mahalanobiusovih distanci korištene su u aglomerativnoj politetičkoj klasterškoj analizi i prikazane horizontalnim klasterom, Slika 5.16.

U odnosu na procentualnu zastupljenost molekularskih masa proteinskih frakcija, apsolutnu diferenciranost pokazuju proteinske frakcije vrste *F. hepatica*, dok su ostale vrste znatno bliže u vrednostima i formiraju dve, odnosno četiri zasebne grupe. Izuzetno bliske vrednosti proteinskih frakcija pokazuju vrste *M. giganteus* i *L. sulphureus* kojima se pridružuje vrsta *A. mellea* čineći jednu od četiri grupe. Vrsta sa najbližim vrednostima je *M. procera* koja je jedinstvena, te zajedno sa takođe naglašenom izolovanom vrednosti vrste *A. auricula-judae*, i pomenutim vrstama prve grupe čine jednu od dve veće celine. Drugačiji model proteinskih frakcija pokazuju vrste *C. disseminatus* i *L. perlatum*, bliske u njihovim vrednostima gradeći preostalu grupu analiziranih taksona.

### 5.1.6. Ispitivanje prisustva makro- i mikro-elemenata

Rezultati sadržaja makro- i mikro-elemenata u ispitivanim uzorcima gljiva prikazani su u Tabeli 5.4.

Tabela 5.4. Pregled sadržaja makro- i mikro-elemenata u ispitivanim vrstama (mg/g sm)

Vrste	K	Mg	Ca	Cu	Zn	Mn	Fe
gljiva	mg/g	mg/g	mg/g	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/g
AM	32,068	1,240	1,064	6,817	16,667	14,85	0,386
CD	24,887	6,728	23,901	18,3	193,333	188,167	5,985
LC	30,491	1,253	1,968	17,917	74,167	23,867	0,582
FH	34,042	1,259	1,143	16,517	34,167	24,633	0,517
MAP	33,649	1,304	1,090	104,75	97,500	4,983	0,143
LS2	21,521	0,848	0,624	7,000	58,333	2,117	0,094
MER	17,760	1,711	1,043	44,033	58,333	7,217	0,235

\*MER - *M. giganteus*, LS2 - *L. sulphureus*, FH - *F. hepatica*, AM - *A. mellea*, CD - *C. disseminatus*, LC - *L. controversus*, MAP - *M. procera*

U svim analiziranim gljivama od makro-elemenata najviše je prisutan kalijum (K) koji se kretao u koncentracijama od 17,8 mg/g kod vrste *M. giganteus* do 34,0 mg/g kod vrste *F. hepatica*.

Sadržaj kalcijuma (Ca) se kretao u vrednostima od 0,84 mg/g kod *L. sulphureus* do 23,9 mg/g kod vrste *C. disseminatus*. Posebno je interesantna činjenica da je sadržaj kalcijuma višestruko (dvadeset puta) veći kod vrste *C. disseminatus* nego kod ostalih ispitivanih vrsta gljiva.

Sadržaj magnezijuma (Mg) se kretao u opsegu od 0,8 mg/g kod vrste *L. sulphureus* do 6,7 mg/g kod vrste *C. disseminatus*. Očigledno je trend sadržaja Ca i Mg isti kod većine vrsta gljiva.

Na osnovu rezultata ispitivanja sadržaja mikro-elemenata najviše je prisutan cink (Zn) koji se kretao u koncentracijama od 34,2 mg/kg kod vrste *F. hepatica* do 193,3 mg/kg kod vrste *C. disseminatus*.

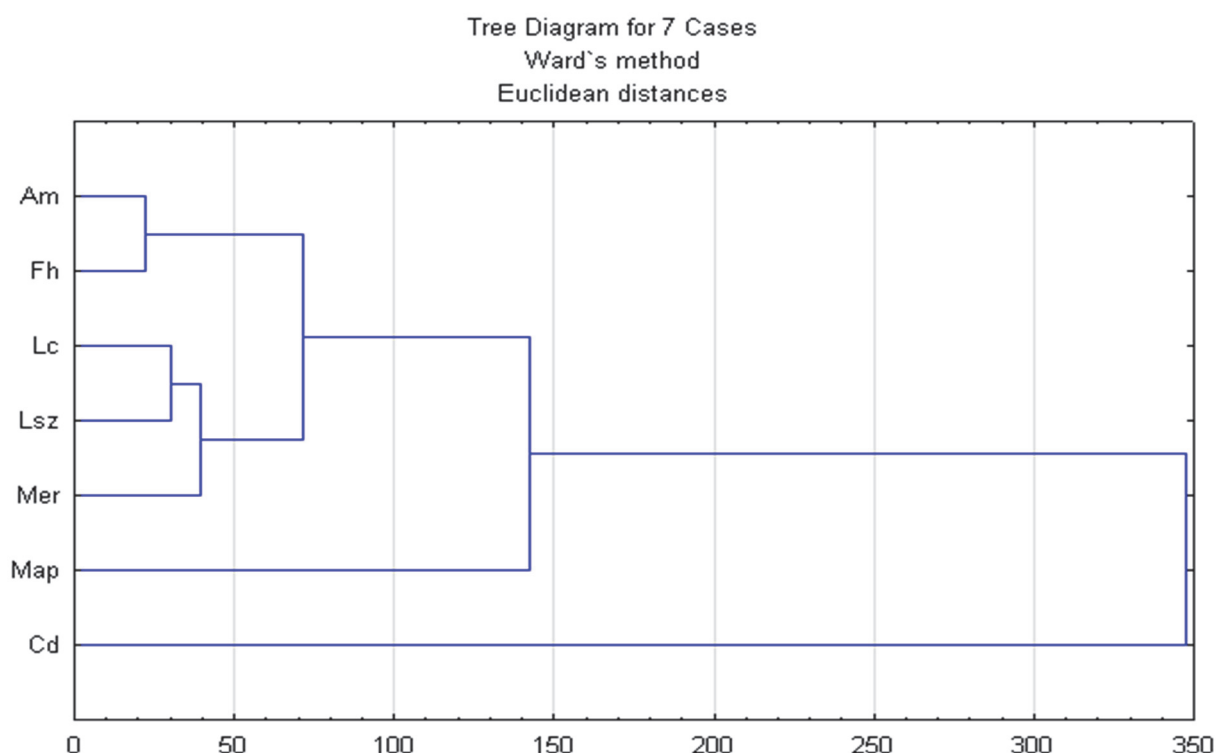
Najveći sadržaj mangana (Mn) i gvožđa zabeležen je takođe kod vrste *C. disseminatus* 188,2 mg/kg i 5,9 mg/g dok je najmanji bio kod vrste *L. sulphureus* 2,1 mg/kg i 0,09 mg/g.

Koncentracija bakra (Cu) u ispitivanim uzorcima kretala se od 104,7 mg/kg kod *M. procera* do 6,8 mg/kg kod *A. mellea*.

Prethodna istraživanja ukazuju da se sadržaj gvožđa (Fe) u jestivim divlje rastućim gljivama kreće u rasponu od 30-150 µg/g (Kalac i Svoboda, 2000), 568-3904 µg/g (Turkecul i sar., 2004) do 56.1-7162 µg/g (Isiloglu i sar., 2001)

Kod vrste *M. procera* i *A. mellea* poreklom iz Turske sadržaj mangana (Mn) je znatno veći (101 µg/g i 49,1 mg/kg) kao i kod vrste *A. mellea* iz Grčke (55,59 µg/g), dok je kod vrste *F. hepatica* iz Grčke zabeležena manja vrednost (7,19 µg/g) u odnosu na rezultate naših ispitivanja (Tuzen i sar., 2007; Sesli i sar., 2008; Ouzouni i sar., 2009).

Koncentracija bakra (Cu) u gljivama se kreće od 100 do 300 mg/kg sm što se ne smatra zdravstvenim rizikom (Kalac i Svoboda, 2000). Sadržaj bakra u gljivama je znatno veći u odnosu na povrće, ali je bioraspoloživost ovog elementa niska zbog ograničene apsorpcije na nivou tankog creva (Schellmann i sar., 1980).



Slika 5.17. Klaster ispitivanih vrsta prema sadržaju makro- i mikro-elemenata.

Koncentracije cinka u gljivama se prema literaturnim podacima kreću u opsegu od 29,3 do 188 µg/g (Tuzen i sar., 2007), dok su kod vrste *A. mellea* poreklom iz Grčke (Ouzouni i sar., 2009)

zabeležen čak tri puta veći sadržaj ovog mikro-elementa (54,12 µg/g) u odnosu na vrednosti dobijene za vrstu poreklom iz Srbije analiziranu u ovom radu. Takođe rezultati ove studije pokazuju veće vrednosti za vrstu *M. procera* u odnosu na vrstu poreklom iz Turske, a kompatibilni su za vrstu *F. hepatica* poreklom iz Grčke (Tuzen i sar., 2007; Ouzouni i sar., 2009).

Vrednosti sadržaja makro- i mikro-elemenata u ispitivanim vrstama podvrgnute su diskriminantnoj analizi sa *a priori* definisanim grupama u cilju prikazivanja njihove povezanosti ili sličnosti u odnosu na sadržaj makro- i mikro-elemenata. Apsolutnu diferenciranost pokazuje vrsta *C. disseminatus*, a najveći doprinos ovoj disociranosti daju sadržaj Mg, Fe, Ca, koja formira posebnu grupu na klasteru, dok su ostale vrste znatno bliže u vrednostima i formiraju dve grupe. Izuzetno bliske vrednosti mikro- i makro-elementa pokazuju vrste *A. mellea*, *F. hepatica* i vrste *L. controversus*, *L. sulphureus* kojima se pridružuje vrsta *M. giganteus*, zaseban oblik disociranosti pokazuje vrsta *M. procera* čemu doprinosi visokog sadržaja Cu.

Vrsta *C. disseminatus* je prema sadržaju makro- i mikro-elemenata pokazala uglavnom najviše vrednosti i značajnu disociranost u poređenju sa ostalim ispitivanim vrstama (Tabela 5.4.). Ova razlika se može tumačiti i poreklom koje je sasvim drugačije geografsko područje u odnosu na sve ostale ispitane vrste, ali i činjenicom da je ovaj uzorak iz urbanog okruženja (gradska sredina) za razliku od ostalih vrsta koje su poreklom iz područja gde nije u tolikoj meri prisutan antropogeni faktor (ruralna sredina).

Hemijski sastav različitih vrsta gljiva dominantno zavisi od dostupnih elemenata u supstratu na kojima one rastu i razvijaju se upravo zbog njihove sposobnosti apsorpcije koja se ostvaruje njihovim načinom ishrane. One akumuliraju specifične makro- ili mikro-elemente (superakumulatori, akumulatori i bioindikator) različitim mehanizmima, koje su stvorile tokom evolucije kao odbrambeni mehanizam tj. adaptaciju na stres pomoću koga se brane od nepovoljnih uticaja samog okruženja, amortizujući time uticaj sredine na sopstveni metabolizam (Karaman i Matavulj, 2005).

## 5.2 Biološka aktivnost ekstrakata

Brojna su istraživanja koja ukazuju da u razvoju degenerativnih i inflamatornih oboljenja značajan uticaj ima oksidativni stres, a naročito reaktivne kiseonične vrste (engl. reactive oxygen species, ROS) i reaktivne azotne vrste (engl. reactive nitrogen species, RNS).

Dodatni značaj supstanci sa antioksidantnim svojstvima potiče od njihove sposobnosti da štite druge biomolekule od štetnog dejstva kiseonika. Imajući u vidu da ova jedinjenja mogu delovati putem različitih mehanizama, inhibicije oksidativnih enzima, reakcije sa oksidansima pre nego što mogu da oštete biomolekule, vezivanja jona prelaznih metala itd, nemoguće je definisati jedinstveno merilo antioksidativne aktivnosti. Upravo zbog toga postoji veliki broj testova za merenje antioksidativne aktivnosti i kapaciteta prirodnih i drugih supstanci, zasnovanih uglavnom na transferu elektrona ili atoma vodonika (Sanchez, 2002). Ove metode suštinski mere sledeće sposobnosti:

- hvatanja slobodnih radikala (ROS i RNS-  $O_2\bullet$ ,  $H_2O_2$ ,  $ROO\bullet$ ,  $OH\bullet$ ,  $ONOO-$ ),
- potrošnju  $O_2$ ,

- inhibiciju lipidne peroksidacije,
- transfer atoma vodonika (ORAC i slični testovi),
- transfer elektrona (FRAP, DPPH•, DMPD i sl).

Treba imati u vidu da se reaktivnost uzorka prema različitim oksidansima i pri različitim eksperimentalnim uslovima (pH, polarnost sredine) razlikuje i nijedan test ne odražava u potpunosti kompleksnost dejstva i interakcija antioksidanasa *in vivo*, zbog čega je potrebno primeniti više različitih metoda (MacDonald-Wicks i sar., 2006).

U ovom radu je antiradikalska aktivnost EtOH i Aq ekstrakata ispitivanih vrsta ocenjena merenjem njihove sposobnosti da neutrališu sledeće radikale: DPPH•, OH•, SOA•, NO• kao i sposobnost da redukuju [Fe-TPTZ]<sup>3+</sup>, primenom FRAP testa.

### 5.2.1. Određivanje „skevendžer“ aktivnosti primenom DPPH-testa

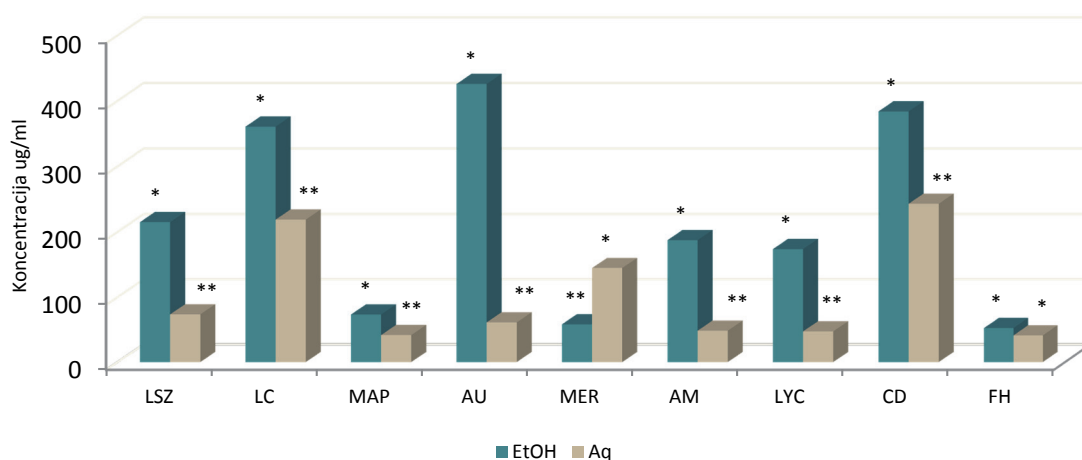
Pojedinačni rezultati za „skevendžer“ aktivnosti EtOH i Aq ekstrakata gljiva primenom DPPH testa dati su u Prilogu.8.5., a uporedni grafički prikaz dobijenih rezultata na osnovu IC<sub>50</sub> vrednosti dati su na Slici 5.18.

Na osnovu prikazanih IC<sub>50</sub> vrednosti očigledno je da su svi ispitivani ekstrakti ispoljili antiradikalsku aktivnost u opsegu od 17,19 do 98,96 %. Kod svih ekstrakata uočena je koncentracijska zavisnost u odnosu na ispoljenu aktivnost.

Najsnažnija aktivnost zabeležena je kod vodenog i etanolnog ekstrakta vrste *F. hepatica* (IC<sub>50</sub>=41,2 µg/ml, IC<sub>50</sub>= 49,4 µg/ml). Nasuprot tome, najslabiju aktivnost ispoljili su vodeni ekstrakt *C. disseminatus* (IC<sub>50</sub>=243,078 µg/ml) i etanolni ekstrakt vrste *A. auricula-judae* (IC<sub>50</sub>=425,9 µg/ml). Poređenjem etanolnih i vodenih ekstrakata, može se uočiti da su vodeni ekstrakti ispoljili bolju aktivnost, koja je statistički značajna u odnosu na etanolne ekstrakte (p<0,05) osim u slučaju vrste *F. hepatica* gde ne postoji statistički značajna razlika u aktivnosti ova dva ekstrakta i u slučaju vrste *M. gigantues* gde je etanolni ekstrakt pokazao bolju antiradikalsku aktivnost.

Rezultati naših istraživanja ukazuju na znatno jaču (nekoliko desetina puta) antiradikalsku aktivnost na DPPH-radikalu gljiva analiziranih u ovom istraživanju u odnosu na ranije publikovane rezultate za vrste *A. auricula-judae* iz Turske i Malezije (Oke i Aslim 2011, Kho i sar., 2009), kao i vrste *A. mellea* iz Portugala (Vaz i sar., 2011), *C. disseminatus* iz Jemena (Al-Fatimi i sar., 2013).

Snažno antiradikalsko delovanje ekstrakata gljiva utvrđenih DPPH testom prema literaturnim podacima prvenstveno se vezuje za prisustvo različitih klasa fenolnih jedinjenja (Barros i sar., 2008; Karaman i sar., 2009; Helenoi sar., 2015), kao što su fenolne kiseline ili u manjoj meri flavonoidi.



Slika 5.18. Poređenje anti-DPPH radikalnog kapaciteta EtOH i Aq ekstrakata ispitivanih vrsta. \*Stubići na histogramu sa različitim brojem zvezdica statistički se značajno razlikuju,  $p < 0,05$ .

Radi provere uticaja fenolnih jedinjenja na ispoljenu antiradikalnu aktivnost utvrđena je korelacija njihovog ukupnog sadržaja sa dobijenim aktivnostima (izraženih kao recipročna vrednost  $IC_{50}$ ) (Tabela 5.4).

Tabela 5.4. Korelacija rezultata DPPH testa i sadržaja fenola i flavonoida

	LSZ		AU		Mer		FH		AM		Map		Lyc		LC		CD	
	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq
UP	0,01	0,09	0,99	0,66	0,5	0,46	0,27	0,99	0,02	0,78	0,79	0,07	0,92	0,92	0,88	0,89	0	0,25
UF	0,17	0,25	0,85	0,1	0,1	0,51	0,99	1	0,53	0,85	0,85	0,68	0,83	0,94	0,99	0,82	0	0,67

Na osnovu vrednosti korelacija između ukupnog sadržaja fenola i DPPH testa veoma visoka korelacija se uočava kod EtOH ekstrakta vrste *A. auricula-judae* ( $r^2=0,99$   $p < 0,05$ ), *L. perlatum* ( $r^2=0,92$ ) i Aq ekstrakta *F. hepatica* ( $r^2=0,99$ ) i *L. perlatum* ( $r^2=0,92$ ). Visoka korelacija se uočava između sadržaja fenola i DPPH testa i kod EtOH i Aq ekstrakata *L. controversus* ( $r^2 = 0,88, 0,89$ ), EtOH *M. procera* ( $r^2=0,79$ ) i Aq *A. mellea* ( $r^2=0,78$ ). Sadržaj ukupnih flavonoida pokazuje veoma visoku korelaciju sa DPPH testom kod EtOH i Aq ekstrakta vrste *F. hepatica* ( $r^2=0,99, 1$ ,  $p < 0,05$ ), EtOH *L. controversus* ( $r^2=0,99$ ) i Aq *L. perlatum* ( $r^2=0,94$ ). Visoku korelaciju u odnosu na DPPH test pokazuje

sadržaj flavonoida kod sledećih ekstrakata: Aq - *M. procera*; Aq - *A. mellea*; EtOH - *A. auricula-judae*; EtOH i Aq - *L. perlatum* ( $r^2=0,85-0,83$ ) Dobijene veoma visoke (preko 0,9) i visoke (visoke 0,7-0,9) korelacije ukazuju da fenolna jedinjenja i flavonoidi imaju ključnu ulogu u antiradikalnoj aktivnosti analiziranih vrsta gljiva.

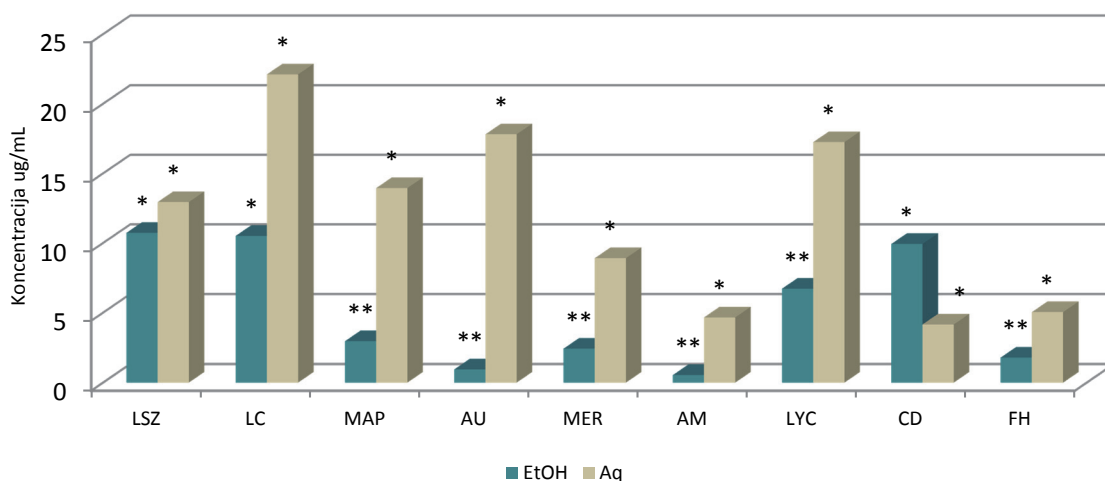
Hipoteza o dobijenoj aktivnosti kao posledice prisustva fenolnih jedinjenja, odnosno flavonoidnih jedinjenja (Reis i sar., 2011) je na osnovu korelacionih koeficijenata i potvrđena.

### 5.2.2. Određivanje kapaciteta "hvatanja" OH<sup>•</sup> radikala

Antiradikalno delovanje ispitivanih ekstrakata na nivou neutralizacije OH<sup>•</sup> radikala određeno je merenjem stepena delovanja inhibicije degradacije 2-deoksi-D-riboze, pod uticajem OH<sup>•</sup> generisanog u Fentonovoj reakciji, i TBA- reaktivne supstance (pre svih MDA) u prisustvu ekstrakata.

Iz dobijenih rezultata neutralizacije OH<sup>•</sup> radikala Prilog 8.5., Slika 5.19. a na osnovu izračunatih IC<sub>50</sub> vrednosti može se zaključiti da je najsnažnije "skevindžer" delovanje ispoljio EtOH ekstrakt vrste *A. mellea* (IC<sub>50</sub>=0,54 µg/ml) i vodeni ekstrakt *C. disseminatus* (IC<sub>50</sub>=4,16 µg/ml).

Ostali ekstrakti ispoljili su nešto slabiju aktivnost, ali i dalje veoma izraženu u odnosu na sintetički antioksidans terc-butil hidroksitoluen (BHT) (IC<sub>50</sub>=30 µg/ml) (Karaman, 2009). Najslabiju aktivnost ispoljio je vodeni ekstrakt vrste *L. controversus* (IC<sub>50</sub>=116 µg/ml).



Slika 5.19. Poređenje antiradikalnog kapaciteta EtOH i Aq ekstrakata ispitivanih vrsta, određenog OH<sup>•</sup> testom. \*Stubići na histogramu sa različitim brojem zvezdica statistički se značajno razlikuju,  $p < 0,05$ .

Poređenjem rezultata koje su pokazali etanolni i vodeni ekstrakt, može se uočiti da su etanolni ekstrakti ispoljili bolju aktivnost koja je statistički značajna ( $p < 0,05$ ) u odnosu na vodene ekstrakte, osim u slučaju vrste *L. perlatum*. Ekstrakti vrste *L. sulphureus*, *L. controversus* i *C. disseminatus* ne pokazuju statistički značajnu razliku kada je u pitanju neutralizacija OH<sup>•</sup> radikala.

Kako je hidroksilni radikal najaktivniji, pa time i najtoksičniji među svim ROS, usled čega indukuje različita oštećenja u biomolekulama, protektivni efekat fungálnih ekstrakata mogao bi se

tumačiti njihovom sposobnošću da uklone OH<sup>•</sup> ili da preveniraju njegovu produkciju ostvarenu kroz Fentonovu reakciju (Soler-Rivas i sar., 2000).

Tabela 5.5. Korelacija rezultata OH testa i ukupnog sadržaja fenola i ukupnih flavonoida

OH	LSZ		AU		Mer		FH		AM		Map		Lyc		LC		CD	
	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq
UP	0,04	0,57	0,44	0,14	0,47	0,05	0,3	0,99	0,76	0,85	0,13	0,09	0,23	0,25	0,24	0,6	0	0,25
UF	0,03	0,27	0,16	0,05	0,88	0,07	0,28	0,02	0,97	0,78	0,68	0,15	0,86	0	0,21	0,7	0	0,68

Analizirajući dosadašnja istraživanja antiradikalske aktivnosti ekstrakata gljiva u pogledu OH<sup>•</sup> radikala možemo konstatovati malo dostupnih rezultata. Rezultati naših istraživanja govore u prilog značajno većim sposobnostima neutralizacije OH<sup>•</sup> radikala za vodene ekstrakte vrsta *F. hepatica* i *M. giganteus* u odnosu na ranije publikovane vrednosti (Ribeiro i sar., 2009; Karaman i sar., 2009).

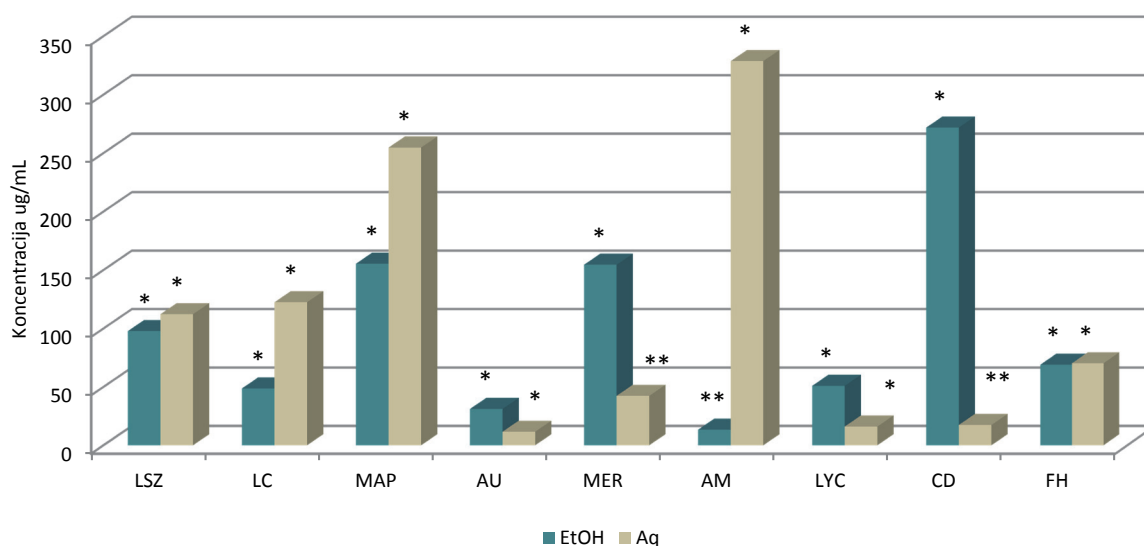
Na osnovu korelacija utvrđenih između ukupnog sadržaja fenola i OH testa veoma visoka korelacija se uočava kod Aq ekstrakta vrste *F. hepatica* ( $r^2=0,99$ ,  $p<0,05$ ) i visoka kod Aq - *A. mellea* ( $r^2=0,85$ ) i EtOH - *F. hepatica* ( $r^2=0,76$ ). Veoma visoka korelacija utvrđena je između sadržaja flavonoida i OH testa kod EtOH ekstrakata *A. mellea* ( $r^2=0,97$ ) i visoka korelacija kod EtOH ekstrakta *M. giganteus* i *L. perlatum* ( $r^2=0,88$  i  $0,86$ ) i Aq ekstrakta *A. mellea* ( $r^2=0,78$ ). Dobijeni korelacioni faktori ukazuju na značajnu aktivnost fenola i flavonoida u ovim procesima, za pomenute ekstrakte. Umerene i niske korelacije koje su utvrđene kod ostalih ekstrakata ukazuje da ovi metaboliti nemaju velikog uticaja na neutralizaciju pomenute radikalske vrste kod tih vrsta gljiva.

### 5.2.3. Određivanje kapaciteta "hvatanja" NO<sup>•</sup> radikala

Rezultati uticaja vodenih i etanolnih ekstrakata ispitivanih vrsta na produkciju NO<sup>•</sup> radikala dati su na Slici 5.20. (Prilog 8.5). Antiradikalska moć ekstrakata izražena je kao IC<sub>25</sub> vrednost, odnosno kao koncentracija ekstrakta pri kojoj je inhibisano 25% NO radikala (IC<sub>50</sub> vrednosti nisu mogle biti registrovane).

Na osnovu dobijenih vrednosti Aq - *A. auricula-judae* (IC<sub>25</sub>=11,66 µg/ml) ispoljio je najbolju aktivnost, dok je među EtOH ekstraktima najbolju aktivnost pokazao ekstrakt vrste *A. mellea* (IC<sub>25</sub>=13,44 µg/ml), interesantno je pomenuti da je upravo Aq ekstrakt ove vrste pokazao najslabiju antiradikalsku aktivnost sa inhibicijom radikala od 25% pri koncentraciji od 328,70 µg/ml.





Slika 5.20. Poređenje antiradikalnog kapaciteta EtOH i Aq ekstrakata ispitivanih vrsta, određenog NO testom. \*Stubići na histogramu sa različitim brojem zvezdica statistički se značajno razlikuju,  $p < 0,05$ .

Statistički značajnu razliku pokazuju vodeni i etanolni ekstrakti kada je upitanju NO antiradikalna aktivnost kod vrsta: *M. giganteus* A. *mellea* i *C. disseminatus*, dok se kod ostalih vrsta ne uočava značajna razlika između ispitivanih vodenih i etanolnih ekstrakata.

Tabela 5.6. Korelacija rezultata NO testa i sadržaja ukupnih fenola (UP) i ukupnih flavonoida (UF)

	LSZ		AU		Mer		FH		AM		Map		Lyc		LC		CD	
	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq
UP	0,18	0,24	0,66	0,91	0,41	0,06	0,00	0,27	0,03	0,04	0,91	0,96	0,21	0,62	0,04	0,86	0,00	0,49
UF	0,20	0,60	0,35	0,37	0,06	0,04	0,80	0,54	0,57	0,01	0,00	0,39	0,85	0,97	0,03	0,78	0,00	0,11

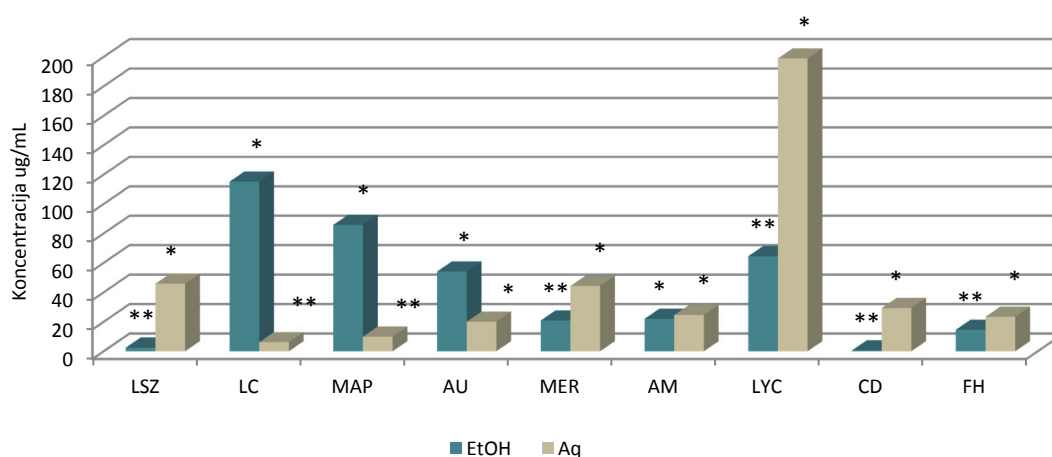
Utvrđena korelacija između sadržaja ukupnih fenola i flavonoida sa NO testom (Tabela 5.6.), pokazuje veoma visoke vrednosti korelacije za ukupne fenole kod Aq ekstrakta vrste *A. auriculajudae* ( $r^2 = 0,91$ ,  $p < 0,05$ ) i *M. procera* ( $r^2 = 0,96$ ), EtOH ekstrakta *M. procera* ( $r^2 = 0,91$ ), *L. controversus* ( $r^2 = 0,91$ ) i *L. perlatum* za ukupne flavonoide ( $r^2 = 0,97$ ). Na osnovu ovih rezultata možemo pretpostaviti da ova jedinjenja imaju značajnu ulogu u ostvarivanju antiradikalne aktivnosti prema NO radikal.

### 5.2.4. Određivanje kapaciteta "hvatanja" O<sub>2</sub><sup>•</sup> radikala

Rezultati "skevendžer" aktivnosti super oksid anjon radikala u vodenim i etanolnim ekstraktima analiziranih gljiva dat je na Slici 5.21., i u Prilogu 8.5.

Najbolje rezultate ispoljili su EtOH ekstrakt vrste *C. disseminatus* (IC<sub>50</sub>=0,66 µg/ml) i Aq ekstrakt *L. controversus* (IC<sub>50</sub>=6,17 µg/ml) dok je etanolni ekstrakt iste vrste ispoljio u ovoj grupi ekstrakata najslabiju aktivnost. Vodeni ekstrakt vrste *L. perlatum* je ispoljio najslabiju aktivnost u odnosu na vodene ekstrakte i u odnosu na sve ispitivane uzorke (IC<sub>50</sub>=198,98 µg/ml).

Slika 5.21. Poređenje antiradikalnog kapaciteta EtOH i Aq ekstrakata ispitivanih vrsta, određenog O<sub>2</sub><sup>•</sup> testom.



Vodeni i etanolni ekstrakti vrsta *A. auricula-judae* i *A. mellea* ne pokazuju statistički značajne razlike kada je upitanju "skevendžer" aktivnosti super oksid anjon radikala.

Na osnovu vrednosti korelacija između ukupnog sadržaja fenola i O<sub>2</sub><sup>•</sup> testa veoma visoka korelacija se uočava kod Aq ekstrakta vrste *L. perlatum* ( $r^2=0,999$ ,  $p<0,05$ ), *L. controversus* ( $r^2=0,97$ ) i *M. giganteus* ( $r^2=0,91$ ) (Tabela 5.7). Ostali ekstrakti ispitivanih vrsta pokazuju umerenu do nisku korelaciju što nam daje mogućnost da pretpostavimo da ova jedinjenja nemaju ključnu ulogu u ostvarivanju ove aktivnosti. Kada su u pitanju korelacije sadržaja ukupnih flavonoida i O<sub>2</sub><sup>•</sup> testa veći je broj veoma visokih i visokih korelacija sa antiradikalnom aktivnosti. Veoma visoku korelaciju ( $r^2>0,90$ ) pokazuju Aq ekstrakti *L. sulphureus*, *L. controversus*, *F. hepatica* i EtOH ekstrakt *F. hepatica*.

Tabela 5.7. Korelacija rezultata O<sub>2</sub><sup>•</sup> testa i sadržaja ukupnih fenola i flavonoida

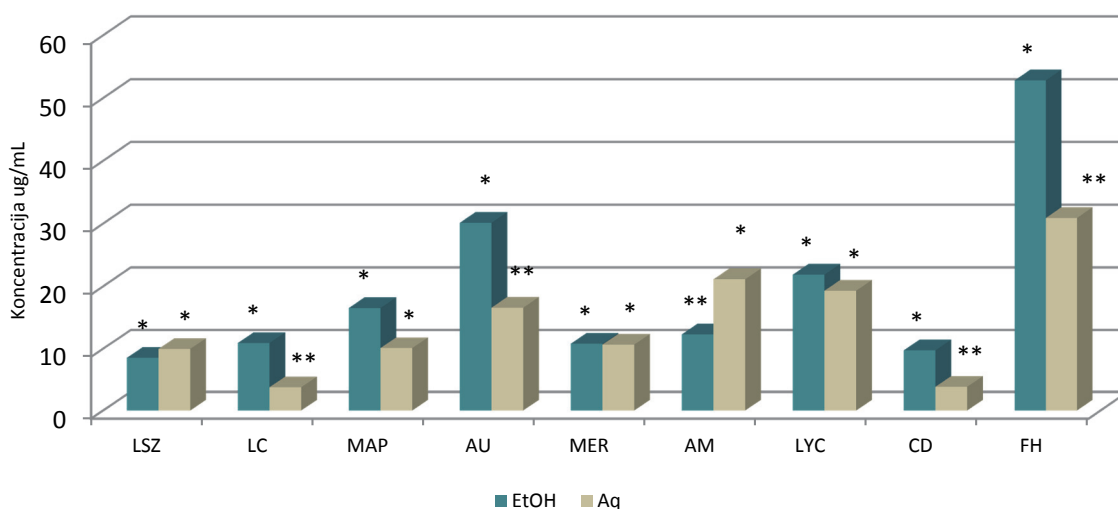
O <sub>2</sub> <sup>•</sup>	LSZ		AU		Mer		FH		AM		Map		Lyc		LC		CD	
	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq
UP	0,64	0,003	0,56	0,46	0,31	0,91	0,00	0,23	0,22	0,66	0,34	0,51	0,00	0,99	0,35	0,97	0,00	0,38
UF	0,67	0,98	0,26	0,00	0,75	0,88	0,95	0,90	0,84	0,74	0,44	0,00	0,35	0,73	0,37	0,93	0,00	0,04

### 5.2.5. Određivanje redukcionog potencijala primenom FRAP-testa

FRAP test, (eng. ferric reducing ability of plasma ili ferric ion reducing antioxidant power) predstavlja jednu od standardnih metoda za ispitivanje redukcionih svojstava prirodnih ekstrakata različitog porekla. Ovom metodom određuje se sposobnost nekog ekstrakta da učestvuje u jednelektronskim redoks-reakcijama, što znači da antioksidansi sa različitim modusom delovanja ne mogu biti registrovani (MacDonald-Wicks i sar., 2006).

Rezultati FRAP testa dati su na Slici 5.22. i u Prilogu 8.5. Zapaža se da su EtOH i Aq ekstrakti *F. hepatica* (52,836 mgAK/g) ispoljili najveći redukциони kapacitet, dok je najmanji efekat zabeležen kod vrste *L. contraversus* (3,78 mgAK/g).

Poređenjem vrednosti dobijenog redukcionog kapaciteta Aq i EtOH ekstrakata možemo zaključiti da ekstrakti vrsta *L. sulphureus*, *M. procera*, *M. giganteus* i *L. perlatum* ne pokazuju signifikantnu razliku u pogledu redukujućeg kapaciteta, dok su kod svih drugih vrsta EtOH ekstrakti ispoljili bolji redukujući kapacitet u odnosu na Aq, osim kod vrste *A. mellea*.



Slika 5.22. Poređenje antioksidativnog kapaciteta EtOH i Aq ekstrakata ispitivanih vrsta, određenog FRAP testom.

U ranijim studijama zabeležen je redukциони potencijal gljive *M. procera*, pokazane vrednost za metanolni ekstrakt (3,70mg ekv. AK/g), i vodeni ekstrakt (3,70mg ekv. AK/g) pokazuju skoro 4 puta jači redukциони potencijal vrste *M. procera* ispitivane u ovoj studiji (Puttaraju i sar., 2006).

Posmatrajući sve ekstrakte gljiva, etanolni ekstrakti su pokazali jače dejstvo u odnosu na vodene, što je suprotno od dobijenog u istraživanju Tsai i sar. (2007). Razlika u redukcionom potencijalu različitih ekstrakata može se objasniti sposobnošću donacije H atoma, kako je objašnjeno od strane Shimad i sar. (1992).

Veoma visok koeficijent korelacije između sadržaja fenola i FRAP testa pokazuju ekstrakti Aq *A. auricula-judae* ( $r^2=0,98$ ,  $p<0,05$ ), *L. controversus* ( $r^2=0,962$ ), i EtOH *A. mellea* ( $r^2=0,989$ ). Sadržaj flavonoida je veoma visoko korelisao sa ovim testom kod ekstrakata vrsta Aq *M. procera* ( $r^2=0,930$ ), EtOH *M. giganteus* ( $r^2=0,927$ ) i Aq *L. controversus* ( $r^2=0,913$ ), Tabela 5.8.

Tabela 5.8. Korelacija rezultata FRAP testa i sadržaja fenola i flavonoida

	LSZ		AU		Mer		FH		AM		Map		Lyc		LC		CD	
	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq	EtOH	Aq
UP	0,17	0,25	0,34	0,98	0,56	0,06	0	0,57	0,98	0,02	0,67	0,81	0,32	0,12	0,49	0,96	0	0,38
UF	0,15	0,6	0,65	0,74	0,92	0,03	0,85	0,61	0,69	0	0,14	0,93	0	0,02	0,51	0,91	0	0,8

U cilju određivanja najpotentnije vrste između devet ispitivanih vrsta, izvršeno je rangiranje gde je korišćen relativni odnos  $IC_{50}$  vrednosti ispitivanih ekstrakata i utvrđen je sledeći odnos antioksidantne aktivnosti vrsta za sledeće testove prema vodenim i etanolnim ekstraktima:

#### Sposobnost neutralizacije DPPH\*

Etanolni ekstrakti

**F. hepatica** (49,4  $\mu\text{g/ml}$ ) > *M. giganteus* (58,3  $\mu\text{g/ml}$ ) > *M. procera* (73,3  $\mu\text{g/ml}$ ) > *L. perlatum* (174,0  $\mu\text{g/ml}$ ) > *A. mellea* (187,6  $\mu\text{g/ml}$ ) > *L. sulphureus* (215,1  $\mu\text{g/ml}$ ) > *L. controversus* (360,8  $\mu\text{g/ml}$ ) > *C. disseminatus* (384,0  $\mu\text{g/ml}$ ) > **A. auricula-judae** (425,9  $\mu\text{g/ml}$ ).

Vodeni ekstrakti

**F. hepatica** (41,16  $\mu\text{g/ml}$ ) > *M. procera* (41,67  $\mu\text{g/ml}$ ) > *L. perlatum* (47,35  $\mu\text{g/ml}$ ) > *A. mellea* (48,40  $\mu\text{g/ml}$ ) > *A. auricula-judae* (61,13  $\mu\text{g/ml}$ ) > *L. sulphureus* (73,53  $\mu\text{g/ml}$ ) > *M. giganteus* (144,94  $\mu\text{g/ml}$ ) > *L. controversus* (218,93  $\mu\text{g/ml}$ ) > **C. disseminatus** (243,08  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### Kapacitet „hvatanja“ OH<sup>•</sup>- radikala:

Etanolni ekstrakt

**A. mellea** (0,54  $\mu\text{g/ml}$ ) > *A. auricula-judae* (0,94  $\mu\text{g/ml}$ ) > *F. hepatica* (1,79  $\mu\text{g/ml}$ ) > *A. aegerita* (2,27  $\mu\text{g/ml}$ ) > *M. giganteus* (2,43  $\mu\text{g/ml}$ ) > *M. procera* (2,96  $\mu\text{g/ml}$ ) > *L. perlatum* (6,72  $\mu\text{g/ml}$ ) > *C. disseminatus* (9,93  $\mu\text{g/ml}$ ) > *L. controversus* (10,51  $\mu\text{g/ml}$ ) > **L. sulphureus** (10,73  $\mu\text{g/ml}$ ).

Vodeni ekstrakt

**C. disseminatus** (4,16  $\mu\text{g/ml}$ ) > *A. aegerita* (4,44  $\mu\text{g/ml}$ ) > *A. mellea* (4,66  $\mu\text{g/ml}$ ) > *F. hepatica* (5,04  $\mu\text{g/ml}$ ) > *M. giganteus* (8,91  $\mu\text{g/ml}$ ) > *L. sulphureus* (12,94  $\mu\text{g/ml}$ ) > *M. procera* (13,94  $\mu\text{g/ml}$ ) > *L. perlatum* (17,25  $\mu\text{g/ml}$ ) > *A. auricula-judae* (17,81  $\mu\text{g/ml}$ ) > **L. controversus** (22,11  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### Kapacitet „hvatanja“ O<sub>2</sub><sup>•</sup>- radikala:

Etanolni ekstrakt

**C. disseminatus** (0,66  $\mu\text{g/ml}$ ) > *L. sulphureus* (2,54  $\mu\text{g/ml}$ ) > *F. hepatica* (14,59  $\mu\text{g/ml}$ ) > *A. aegerita* (18,37  $\mu\text{g/ml}$ ) > *M. giganteus* (20,94  $\mu\text{g/ml}$ ) > *A. mellea* (22,04  $\mu\text{g/ml}$ ) > *A. auricula-judae*

(54,16 µg/ml) > *L. perlatum* (64,57 µg/ml) > *M. procera* (85,81 µg/ml) > ***L. contraversus*** (115,24 µg/ml).

Vodeni ekstrakt

***L. contraversus*** (6,17 µg/ml) > *M. procera* (9,95 µg/ml) > *A. auricula-judae* (20,09 µg/ml) > *F. hepatica* (23,47 µg/ml) > *A. mellea* (24,64 µg/ml) > *C. disseminatus* (29,38 µg/ml) > *M. giganteus* (44,37 µg/ml) > *L. sulphureus* (45,94 µg/ml) > ***L. perlatum*** (198,98 µg/ml).

#### Kapacitet „hvatanja“ NO<sup>•</sup>- radikala:

Etanolni ekstrakt

***A. auricula-judae*** (30,88 µg/ml) > *L. sulphureus* (41,68 µg/ml) > *A. mellea* (50,27 µg/ml) > *L. contraversus* (55,96 µg/ml) > *C. disseminatus* (59,93 µg/ml) > *M. procera* (86,93 µg/ml) > *L. perlatum* (89,42 µg/ml) > *F. hepatica* (126,06 µg/ml) > ***M. giganteus*** (205,96 µg/ml).

Vodeni ekstrakt

***M. procera*** (10,12 µg/ml) > *L. contraversus* (18,55 µg/ml) > *C. disseminatus* (30,74 µg/ml) > *M. giganteus* (31,20 µg/ml) > *F. hepatica* (48,04 µg/ml) > *L. sulphureus* (73,94 µg/ml) > *L. perlatum* (81,37 µg/ml) > *A. mellea* (82,92 µg/ml) > ***A. auricula-judae*** (89,61 µg/ml).

#### FRAP test

Etanolni ekstrakt

***F. hepatica*** (52,84 mgAK/g) > *A. auricula-judae* (30,13 mgAK/g) > *L. perlatum* (21,87 mgAK/g) > *M. procera* (16,55 mgAK/g) > *A. mellea* (12,33 mgAK/g) > *L. contraversus* (10,93 mgAK/g) > *M. giganteus* (10,82 mgAK/g) > *C. disseminatus* (9,75 mgAK/g) > ***L. sulphureus*** (8,531 mgAK/g).

Vodeni ekstrakt

***F. hepatica*** (30,90 mgAK/g) > *A. mellea* (21,13 mgAK/g) > *L. perlatum* (19,30 mgAK/g) > *A. auricula-judae* (16,60 mgAK/g) > *M. giganteus* (10,67 mgAK/g) > *M. procera* (10,11 mgAK/g) > *L. sulphureus* (9,98 mgAK/g) > *C. disseminatus* (3,86 mgAK/g) > ***L. contraversus*** (3,77 mgAK/g).

Dobijeni rezultati ukazuju na činjenicu da analizirane gljive, posebno vrste *F. hepatica*, *C. disseminatus*, *A. mellea*, *L. contraversus*, *M. procera* predstavljaju vrste gljiva koje su od izvanrednog značaja kao prirodni izvori antioksidanata. Takođe bi posebnu pažnju trebalo posvetiti vrstama koje su do sada skoro potpuno neistražene (*M. giganteus*, *C. disseminatus*, *L. controversus*), prema dobijenim rezultatima njihov antioksidantni potencijal, a time i medicinsku značaj obećava. Stoga bi se analizirane vrste gljiva mogle koristiti kao jednostavan dostupan izvor jakih antioksidanata, ali i dodataka ishrani ili u farmaceutskoj industriji u budućnosti kao zamena sintetskim antioksidantima.

Na osnovu dobijenih rezultata ne uočava se povezanost IC<sub>50</sub> vrednosti i tipa rastvarača (etanol, voda), ali se takođe javljaju i znatne razlike u okviru iste vrste, u različitim primenjenim testovima. To upućuje na mogućnost da različita jedinjenja prisutna u analiziranim ekstraktima ostvaruju antioksidantnu aktivnost različitim mehanizmima.

Ostvareni rezultati IC<sub>50</sub> ukazuju da se taksonomski bliže (srodnije) gljive ponašaju slično. To nam govori da genotipske karakteristike analiziranih vrsta gljiva imaju značajan uticaj na biohemijske osobine i ispoljene biološke aktivnosti ekstrakata gljiva, pored sredinskih faktora.

### 5.2.6. Antimikrobna aktivnost odabranih vrsta gljiva

Rezultati antimikrobne aktivnosti pokazali su da ispitivani MeOH i HEX ekstrakti ispoljavaju antimikrobnu aktivnost (Tabela 5.9 i 5.10.) pretežno na Gram-pozitivne bakterije, što je u skladu sa literaturnim podacima (Karaman, 2009; Alves i sar., 2012a, 2012b, 2013). Od 14 testiranih ekstrakata (5 MeOH i 9 HeX) najveću efikasnost u odnosu na ispitane sojeve pokazao je metanolni ekstrakt vrste *F. hepatica*.

Gram-pozitivne bakterije bile su najosetljivije na metanolne ekstrakte, a vrednosti za MIC i MBC su se kretale u opsegu od 0,078 mg/ml do > 10 mg/ml (Tabela 5.9). Najniže vrednosti za MIC i MBC zabeležene su za vrstu *F. hepatica* 0,078 mg/ml na *S. aureus*.

Heksanski ekstrakti iste vrste *F. hepatica* i *C. disseminatus* su na istu bakteriju, ispoljile MIC i MBC za red veličine veću vrednost (0,78 mg/ml), dok je kod vrste *M. giganteus* zabeležena MBC od 3,12 mg/ml).

U ispitivanim opsezima koncentracija (0,78 mg/ml do 25 mg/ml) heksanskih ekstrakata sledećih vrsta: *L. controversus*, *F. hepatica*, *L. perlatum* nisu pokazali aktivnost prema *E. coli* (Gram-negativna) i *B. subtilis* (Gram-pozitivna), dok ekstrakt vrste *M. giganteus* nije pokazao aktivnost samo u odnosu na *B. subtilis*, što nije u skladu sa aktivnostima dobijenim za vrstu *Bacillus sp.* poreklom sa Fruške gore za metanolni ekstrakt (Karaman i sar., 2009a).

U skriningu na Gram-negativne bakterije: *S. enteritidis* i *E. coli*, prilikom utvrđivanja minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne aktivnosti, najnižu vrednost MIC (5 mg/ml) pokazao je metanolni ekstrakt vrste *F. hepatica* (FHMeOH), dok je MBC detektovana pri koncentraciji 10 mg/ml. Metanolni ekstrakti ostalih ispitivanih vrsta ispoljavaju MIC i MBC vrednosti na višim koncentracijama od 10 mg/ml.

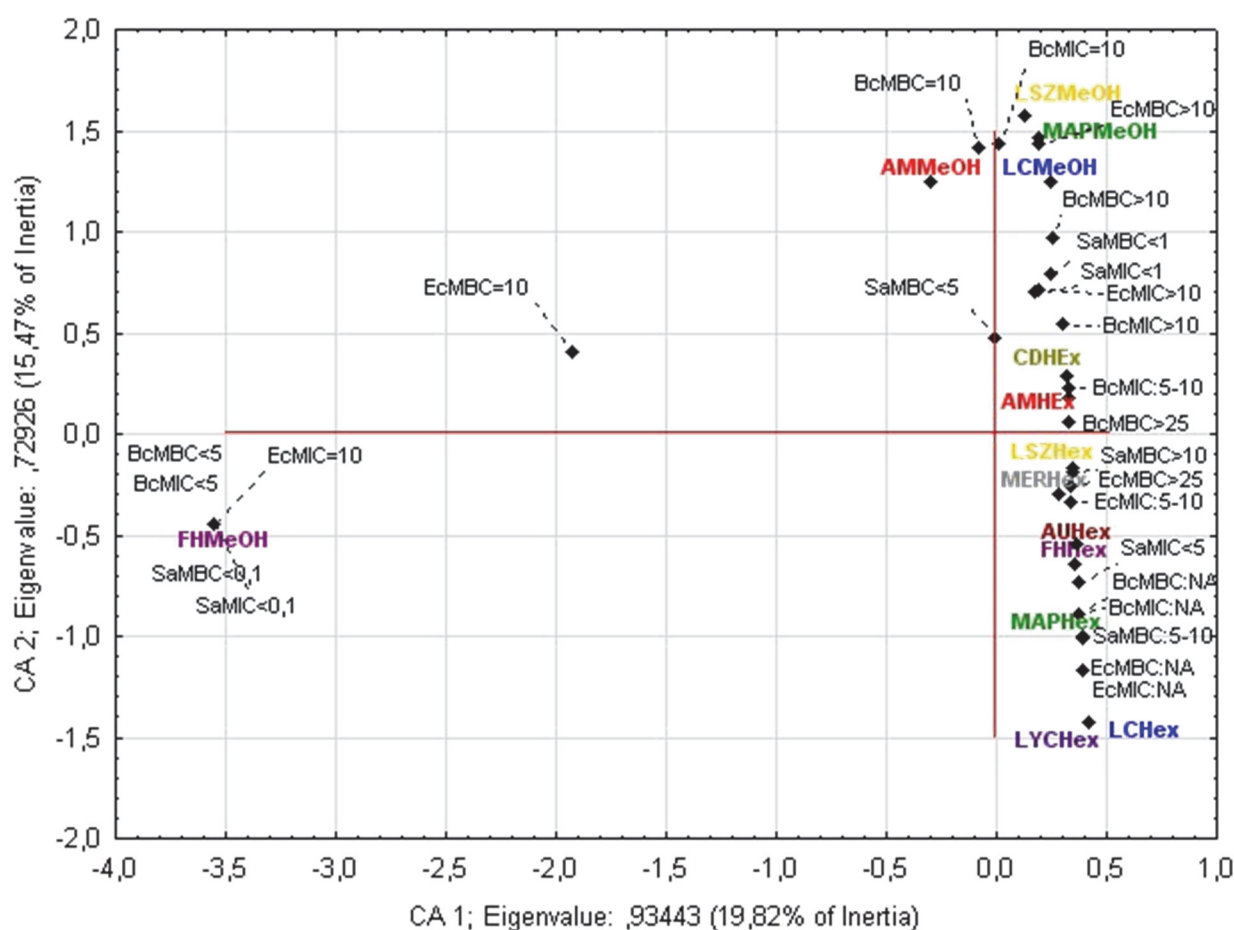
Rezultati dobijeni na osnovu analize antibakterijske aktivnosti heksanskih ekstrakata (HEX) gljiva ukazuju na to da su najbolju MIC vrednost u odnosu na Gram-negativne bakterije postigli ekstrakti sledećih vrsta: *M. procera*, *M. giganteus* i *C. disseminatus* pri koncentraciji od 6,25 mg/ml, dok su isti ekstrakti MBC vrednosti dostizali pri koncentracijama iznad 25 mg/ml.

Za lakše sagledavanje dobijenih rezultata MIC i MBC vrednosti urađene su korespondentne analize na osnovu dostignutih MIC i MBC koje su uključile MeOH i HEX ekstrakte (Slika 5.19). Na osnovu analize međusobne asociranosti bakterijskih sojeva prema MIC i MBC vrednostima za sve analizirane sojeve bakterija u prostoru prve dve korespondentne ose, uočava se velika grupa centriola u odnosu na drugu osu, a kao poseban oblik asociranosti izdvajaju se MIC i MBC vrednosti FHMeOH. Upravo zbog ovakvog oblika asociranosti pristupilo se odvojenim analizama za MeOH i HEX ekstrakte (Slika 5.20. i 5.21).

Zasebna analiza međusobne asociranosti bakterijskih sojeva prema MIC i MBC za MeOH ekstrakte pokazuje asociranost centriola u pozitivnoj zoni prve i negativnoj zoni druge ose, a obuhvata vrednosti MIC i MBC za ekstrakte *M. procera* (MP), *L. sulphureus* (LSZ) i *A. mellea* (AM) koji pokazuju sličan efekat na ispitivane sojeve a pre svega na *C. albicans*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *B. subtilis*, i *E. faecalis* kod kojih su koncentracije pri kojima se ostvaruju MIC i MBC vrednosti za sve Gram-negativne sojeve i *C. albicans* >10 mg/ml, a za Gram-pozitivne 10 mg/ml. U negativnoj zoni obe ose pozicionirani su centrioli koji pokazuju efekat MeOH vrste *L. controversus* (LC) na ispitivane sojeve.

Asociranost u odnosu na prethodnu grupu je posledica MIC i MBC vrednosti za Gram-pozitivne *B. subtilis*, *E. faecalis* >10 mg/ml. U pozitivnoj zoni prve ose kao poseban oblik asociiranosti izdvajaju se centrioli za ispitivane sojeve za ekstrakt *F. hepatica* (FH) koji pokazuje na najnižim koncentracijama (0,078 mg/ml) MIC i MBC za *S. aureus*. Ovoj asociiranosti pored navedenog doprinosi i vrednost MIC 10 mg/ml za *C. albicans* kao i znatno niže vrednosti za sve ispitivane sojeve.

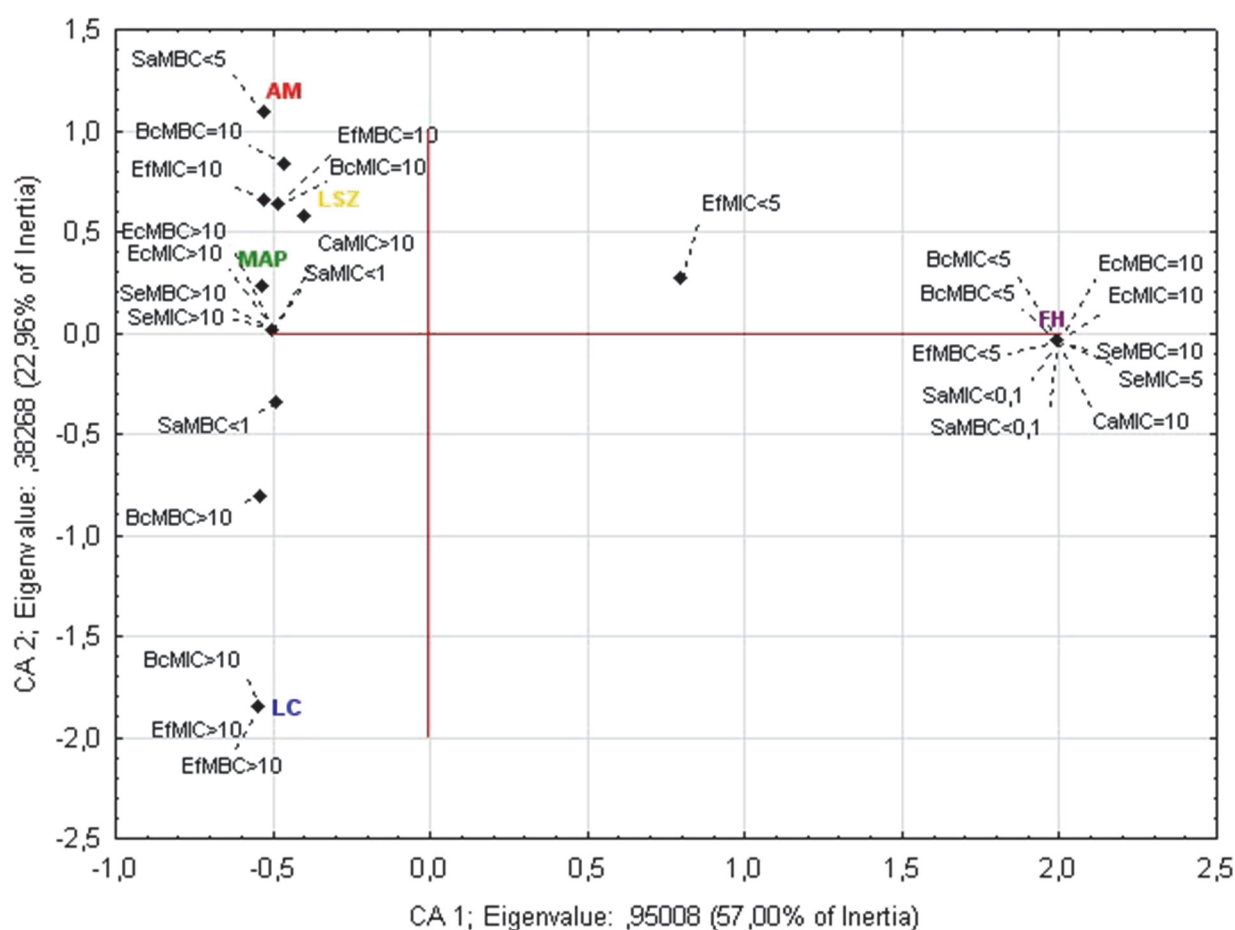
Analiza međusobne asociiranosti bakterijskih sojeva prema MIC i MBC za HEX ekstrakte pokazuje znatno manju asociiranost analiziranih grupa. Na osnovu položaja centriola u prostoru druge ose izdvajaju se dve grupe centriola. Negativna zona druge ose obuhvata centriole koji pokazuje efekat MIC i MBC vrednosti za *A. mellea* (AM), *L. sulphureus* (LSZ), i *C. disseminatus* (CD) koje karakteriše aktivnost na svim ispitivanim sojevima. U odnosu na navedenu grupu položaj *A. auricula-judae* (AU) pokazuje izvestan stepen korespondencije sa grupom koja se nalazi u pozitivnoj zoni druge ose zbog odsustva aktivnosti na soju *B. subtilis*. Asociiranost centriola *M. procera* (MAP) i *M. giganteus* (MER) na drugoj pozitivnoj osi ukazuju na bliskost ova dva ekstrakta na osnovu odsustva aktivnosti na soju *B. subtilis* i postignutim vrednostima MIC i MBC za *E. coli*, dok asociiranost centriola *L. controversus* (LC), *L. perlatum* (LYC) i *F. hepatica* (FH) je posledica odsustva aktivnosti na *B. subtilis* i *E. coli*.



Slika 5.19. Pozicije centriola koncentracija metanolnih i heksanskih ekstrakta ispitivanih vrsta za koje su utvrđene MIC i MBC vrednosti bakterijskih sojeva, korespondentna analiza, prve dve ose.

Metanolni ekstrakt vrste *L. sulphureus* pokazao je bolju antibakterijsku aktivnost (Tabela 5.9.) nego etanolni ekstrakt iste vrste poreklom iz Poljske na *S. aureus* ATCC25923 (MIC 1,25 mg/ml i MBC 2,5 mg/ml), kao i na *B. subtilis* i Gram-negativnu *E.coli*. Za razliku od hloroformskog ekstrakta ove vrste poreklom sa Fruške gore rezultati za heksanski ekstrakt ove studije pokazuju aktivnost na soju *E. coli* i slabiju aktivnost na sojevima *B. subtilis* i *S. aureus* (Karaman, 2009). Slična aktivnost etanolnih ekstrakata na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije je utvrđena i za druge analizirane vrste *M. procera* i *A. mellea* iz Poljske (Nowacka i sar.,2014;). Metanolni ekstrakti vrsta poreklom iz Indije *A. mellea* pokazuje aktivnost na *S. aureus*, *E. coli*, *P. vulgaris*, dok isti ekstrakt *F. hepatica* pokazuju aktivnost u odnosu na *E. coli*, *P. vulgaris* što je u saglasnosti sa rezultatima ove studije za ispitivane sojeve (Giri i sar. 2012).

Rezultati antimikrobne aktivnosti za HEX ekstrakt vrste *L. controversus* koji pokazuju odsustvo aktivnosti prema *E. coli* u skladu su sa rezultatima za ispitivani mix ekstrakt ove vrste (Altuner i Akata, 2010). Heksanski ekstrakt vrste *C. disseminatus* analiziran u ovoj studiji pokazao je bolje rezultate (6,25 mg/ml) antimikrobne aktivnosti u odnosu na analizirana tri ekstrakta (dihlormetanski, metanolni i vodeni) ove vrste poreklom iz Jemena, kod kojih je izostala aktivnost na soju *E. coli* (Al-Fatimi i sar.,2013).

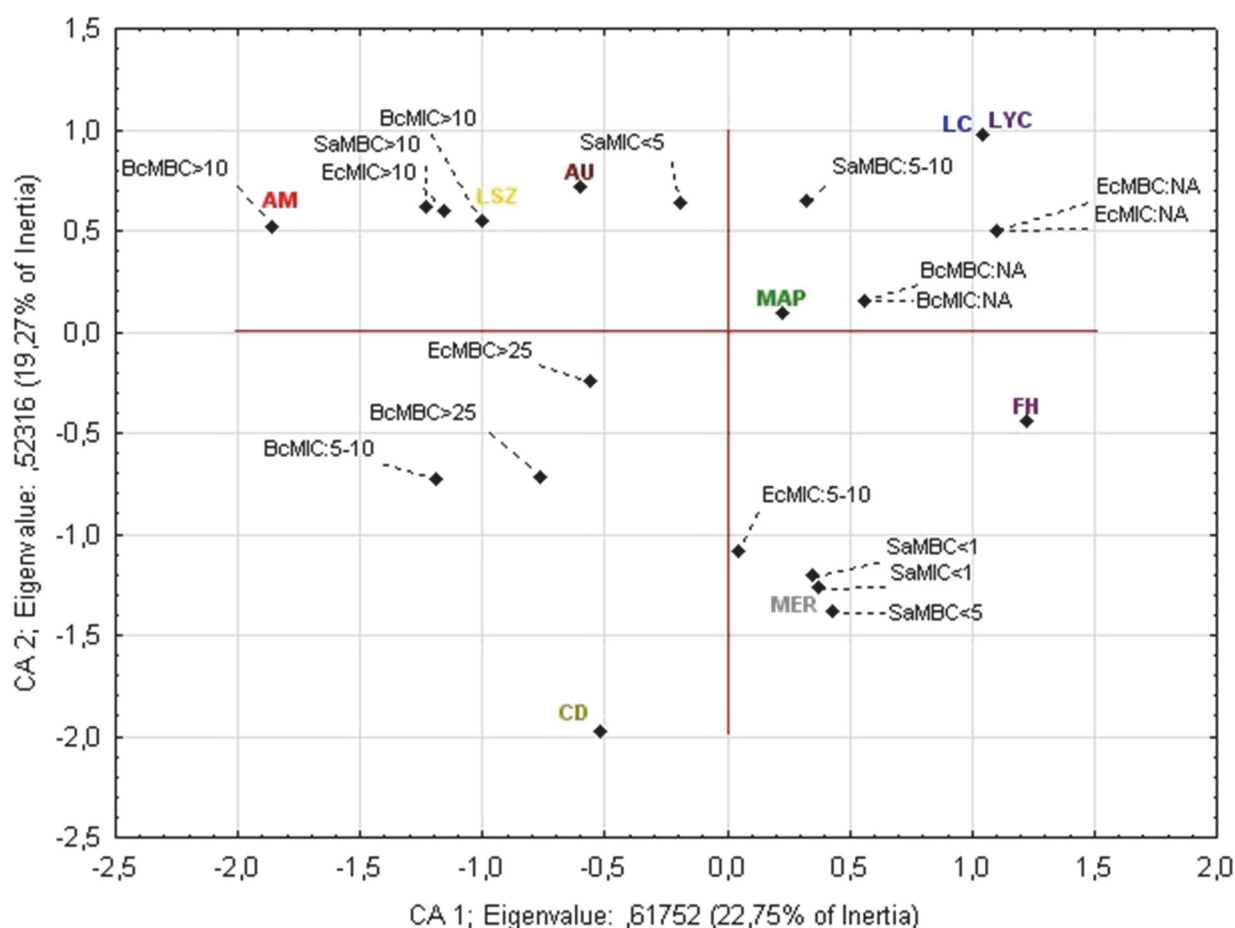


Slika 5.20. Pozicije centriola koncentracija metanolnih ekstrakata ispitivanih vrsta za koje su utvrđene MIC i MBC vrednosti bakterijskih sojeva, korespondentna analiza, prve dve ose.



Na osnovu literaturnih podataka može se pretpostaviti da metanolni i heksanski ekstrakti mogu sadržati različite familije jedinjenja na osnovu različite polarnosti, kao što su fenolne komponente u metanolnim ekstraktima, steroli i terpeni u heksanskim ekstraktima (Cowan, 1999).

Antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata mogla bi se tumačiti prisustvom polifenolnih jedinjenja, ranije publikacije ukazuju na ulogu ovih jedinjenja u ostvarivanju ove aktivnosti u različitim prirodnim matriksima (D'Oliveira i sar., 2003; Barros i sar., 2007e; Alves i sar., 2012b). Alves i sar., 2013, su utvrdili da fenolne kiseline poreklom iz gljiva, protokatehinske i p-kumarinske efikasno inhibiraju rast Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Rezultati Lou i sar., (2012) pokazuju da p-kumarinska ima dvostruki mehanizam baktericidne aktivnosti, koji se ogleda u ireverzibilnoj propustljivosti ćelijske membrane, što dovodi do gubitka citoplazme (makromolekula), njenog daljeg vezivanja za bakterijski genom i konačno do inhibicije ćelijskih funkcija, što na kraju dovodi do ćelijske smrti. Pored navedenih, i druga fenolna jedinjenja mogu uticati na antibakterijsku aktivnost: tanini, lignani, flavonoidi itd. (Karaman, 2012).



Slika 5.21. Pozicije centroida koncentracija heksanskog ekstrakta ispitivanih vrsta za koje su utvrđene MIC i MBC vrednosti bakterijskih sojeva, korespondentna analiza, prve dve ose.

Gljive su izvori prirodnih antimikrobnih jedinjenja koji mogu biti male i velike molekulske mase. Jedinjenja male molekulske mase koja ispoljavaju antimikrobnu aktivnost pripadaju

sekundarnim metabolitima (terpeni, seskviterpeni, antrahinoni, derivati benzojeve kiseline, hinolini), ali i primarnim metaboliti kao što je oksalna kiselina, dok su jedinjenja velike molekulske mase peptidi i proteini.

Manja zabeležena aktivnost ili potpuno odsustvo aktivnosti ekstrakta prema Gram-negativnim bakterijama može se tumačiti razlikama u građi ćelijske membrane kod ove grupe bakterija u odnosu na Gram-pozitivne bakterije. Spoljašnja membrana (lipopolisaharidne prirode) Gram-negativnih bakterija zadržava svoju površinu visoko hidrofилnom, dok lipofilni krajevi lipoteihojnih kiselina u ćelijskom zidu Gram-pozitivnih bakterija mogu da podstaknu prodiranje hidrofobnih jedinjenja kao što su steroli i terpeni (Karaman, 2009).

Prema dostupnim podacima dokazana je antimikrobna aktivnost jedinjenja poreklom iz gljiva u odnosu na Gram-negativne sojeve među kojima su: terpeni - Ganomicin A i B (izolovani iz *Ganoderma pfeifferi*), organske kiseline (poreklom iz *Lentinus edodes*), derivati benzoične kiseline, hinolini (izolovani iz *Leucopaxillus albissimus*), proteini (CSAP izolovan iz *Cordyceps sinensis*), ribonukleaze (izolovane iz *Pleurotus sajor-caju*) (Alves i sar., 2012a).

Među jedinjenjima za koje dokazana antimikrobna aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama jesu pet terpena (Konfluentin, Grifolin, Neogrifolin, Ganomicin A i B), sterol (3,11-dioksolanosta-8,24(Z)-dien-26-oična kiselina) (izolovan iz *Jahnoporus hirtus*) i mikaceol (izolovan iz vrsta roda *Coprinus*), seskviterpeni Enokipodini A, B, C i D (izolovani iz *Flammulina velutipes*), oksalna kiselina, derivat benzoične kiseline - Coloratin A (izolovan iz *Xylaria intracolarata*). Za osam antrahinona: 6-Metilksantopurpurin-3-O-metil eter, Austrokortilutein, (1S,3R)-Austrokortilutein, (1S,3S)-Austrokortirubin i Torosahrisona izolovanih iz vrste *Cortinarius basirubencens*, i Fiscion, Eritroglaukin i Emodin izolovani iz druge vrste *Cortinarius* dokazana je aktivnost na *S. aureus*. Nekoliko proteina i peptida pokazuje antimikrobnu aktivnost na sojevima Gram-pozitivnih bakterija, CSAP (*Cordyceps sinensis*) i ribonukleaze (*Pleurotus sajor-caju*) pokazuje jaku aktivnost na *S. aureus*, peptid Plektasin (*Pseudoplectania nigrella*) pokazuje aktivnost na *S. aureus*, *E. faecalis* i *E. faecium* na multirezistentnim sojevima *S. epidermidis*, *S. pneumonia*, *S. pyogenes*. Nekoliko peptida izolovanih iz vrsta *Boletus* sp., Peptaibol Boletusin, Pepteibol Krizospermin 3, i Peptaibol Krizospermin 5 deluju na sojeve *B. subtilis*, *C. liliun* i *S. aureus* (Zahid i sar., 2006; Alves i sar., 2012a).

Značajno je, da je aktivnost na bakterije specijes-specifična, a varijabilnost u odnosu na aktivnost vrsta različitog geografskog područja može se pripisati razlikama u hemijskoj kompoziciji sekundarnih metabolita (Karaman, 2009; Alves i sar., 2012a). Koja od jedinjenja iz navedenih klasa su najodgovornija za uočenu aktivnost, biće moguće utvrditi tek kombinacijom frakcionisanja, određivanja aktivnosti i hemijske analize.

Rezultati ove studije pokazuju da ekstrakti ispitivanih vrsta mogu poslužiti u prevenciji i lečenju bakterijskih infekcija, životinja i ljudi, posebno infekcija sojevima koji pokazuju antibiotsku rezistenciju. Zanimljivo je razmatrati mogućnost primene ovih ekstrakata u proizvodnji hrane, kao mogućih dodataka samom proizvoda u cilju poboljšanja održivosti proizvoda ali i kao mogućih ingredijenata savremenih ambalažnih materijala.

Prikazana ostvarena aktivnost trebalo bi u budućnosti da podstakne istraživanja posebno vrsta *F. hepatica*, *C. disseminatus* i *M. giganteus*

Tabela 5.9. MIC i MBC vrednosti MeOH ekstrakata na analizirane bakterije.

MeOH	AM			LC			MAP			FH			LSZ		
	MIC	MBC	MBC	MIC	MBC	MBC	MIC	MBC	MBC	MIC	MBC	MBC	MIC	MBC	MBC
<i>C. albicans</i> H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> L	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0
<i>S. enteritidis</i> ATCC13076	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0
<i>E. coli</i> ATCC 11229	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	10,0	10,0	10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	10,0	↑10,0	↑10,0	1,25	1,25	1,25	10,0	10,0	10,0
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	10,0	10,0	10,0	↑10,0	↑10,0	↑10,0	10,0	10,0	10,0	1,25	5,0	5,0	2,50	10,0	10,0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,312	1,250	0,312	0,625	0,625	0,625	0,156	0,625	0,625	0,078	0,078	0,078	0,312	0,625	0,625

Tabela 5.10. MIC i MBC vrednosti HEX ekstrakata na analizirane bakterije

HEX	AM			LC			MAP			FH			LSZ			AU			LYC			MER			CD				
	MIC	MBC	MBC	MIC	MBC	MBC	MIC	MBC	MBC	MIC	MBC	MBC	MIC	MBC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MBC	MIC	MBC	MBC	MIC	MBC	MBC	MIC	MBC	
<i>E. coli</i> ATCC 11229	12,5	↓25	-	3,12	6,25	6,25	1,56	6,25	↓25	6,25	6,25	6,25	12,5	↓25	↓25	↓25	12,5	12,5	12,5	3,12	3,12	6,25	6,25	0,78	0,78	0,78	6,25	↓25	↓25
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	6,25	12,5	-	3,12	6,25	6,25	1,56	6,25	-	-	-	-	12,5	↓25	↓25	↓25	12,5	12,5	12,5	3,12	3,12	6,25	6,25	0,78	0,78	0,78	6,25	↓25	↓25
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3,12	12,5	-	3,12	6,25	6,25	1,56	6,25	12,5	12,5	12,5	3,12	3,12	12,5	12,5	12,5	3,12	3,12	3,12	6,25	6,25	6,25	0,78	0,78	0,78	6,25	3,12	3,12	0,78

### 5.2.7. Antibiotička rezistencija ispitivanih sojeva

Rezistencija sojeva bakterija na standardne antibiotike relevantne za svaki rod prikazana je u Tabeli 5.11. Samo dva izolata Gram-negativnih sojeva su ispoljila klasičan način rezistencije, dok ostali sojevi pokazuju osetljivost na testirane antibiotike, stoga su ovi sojevi posebno interesantni za testiranje ekstrakata gljiva.

Tabela 5.11. Test osetljivosti bakterija na uobičajne antibiotike

Kulture	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>
<b>Antibiotici</b>				
<b>E (15 µg)- eritromicin</b>	R	R	27	15
<b>LEV (5 µg)- levofloksacin</b>	32	25	34	22
<b>DA (2 µg)- klindamicin</b>	R	R	21	8
<b>KF (20 µg)- cefokoliv</b>	24	20	48	12
<b>CIP (5 µg)- ciprofloksacin</b>	32	26	32	20
<b>CN (10 µg)- gentamicin</b>	19	16	25	12
<b>OFX (5 µg)- ofloksacin</b>	28	22	31	18
<b>C (30 µg)- hloramfenikol</b>	30	22	26	27

- R rezistentne

U antifungalnom "skriningu" analizirane su dve kulture *C. albicans* laboratorijski i humani, od kojih je samo laboratorijska kultura pokazala osetljivost na metanolni ekstrakt vrste *F. hepatica* sa MIC vrednostima od 10 mg/ml, dok ostali ekstrakti nisu ispoljili aktivnosti u ispitivanom opsegu koncentracija.

Rezultati naših istraživanja se razlikuju od ranije publikovanih kada je u pitanju osetljivost *C. albicans* u odnosu na metanolne ekstrakte *M. giganteus*, etanolni *L. sulphureus*, etanolni i vodene ekstrakt *A. auricula-judae*, kod kojih je zabeležena antifungalna aktivnost (Suay i sar., 2000; Turkoglu i sar., 2007; Nwachukwu i Uzoeto, 2010).

### 5.2.8. Antiproliferativna aktivnost vodenih i etanolnih ekstrakata

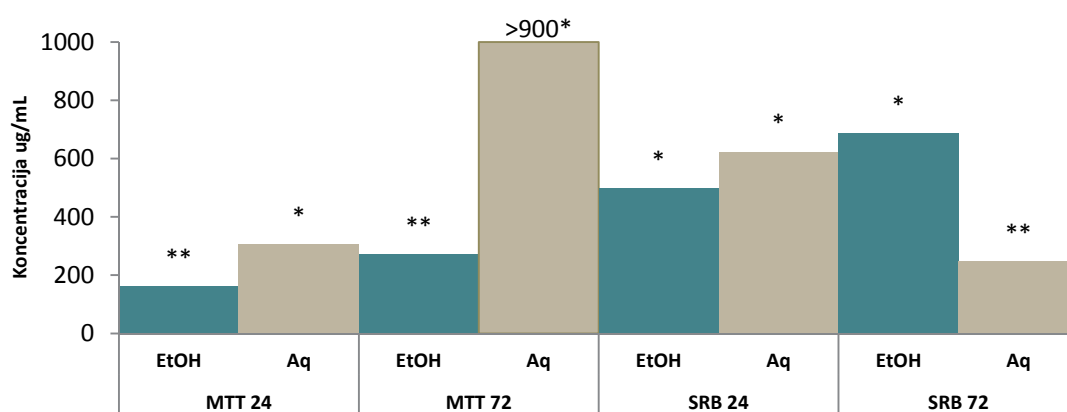
Efekat EtOH i Aq ekstrakata odabranih vrsta gljiva na rast ćelijske linije MCF7 (humani adenokarcinom dojke pozitivan na estrogenske i progesteronske receptore), ispitan je MTT i SRB testom nakon 24 h i 72 h tretmana pri različitim koncentracijama ekstrakta (od 900 µg/ml do 33,3 µg/ml). Efikasnost inhibicije proliferacije tumorskih ćelija kvantitativno je izražena kao IC<sub>50</sub> vrednost, odnosno kao koncentracija ispitivane supstance pri kojoj se broj tretiranih ćelija smanjuje za 50% u odnosu na netretiranu kontrolu.

Ispitivani fungalni ekstrakti ispoljili su različito antiproliferativno delovanje u zavisnosti od vrste ekstrakta, koncentracije ispitivanih ekstrakata i dužine sprovedenog tretmana ćelija.

Uzimajući u obzir da je u ekstraktima ispitivanih vrsta detektovan niz biomolekula koji mogu pomoći u prevenciji kancera (npr. antioksidansi) ili su citotoksični, uključujući fenolne kiseline i flavonoide (Wasser, 2002; Ferreira i sar., 2010; Ivanova i sar., 2014; ), prepostavili smo da će ekstrakti analiziranih vrsta ispoljiti izvestan procenat antiproliferativnog dejstva.

### 5.2.8.1. *Lactarius contraversus*

Rezultati efekta delovanja vodenog i etanolnog ekstrakta tj. citotoksičnosti prikazani su na uporednom prikazu oba testa na Slici 5.22. i Prilogu 8.6.



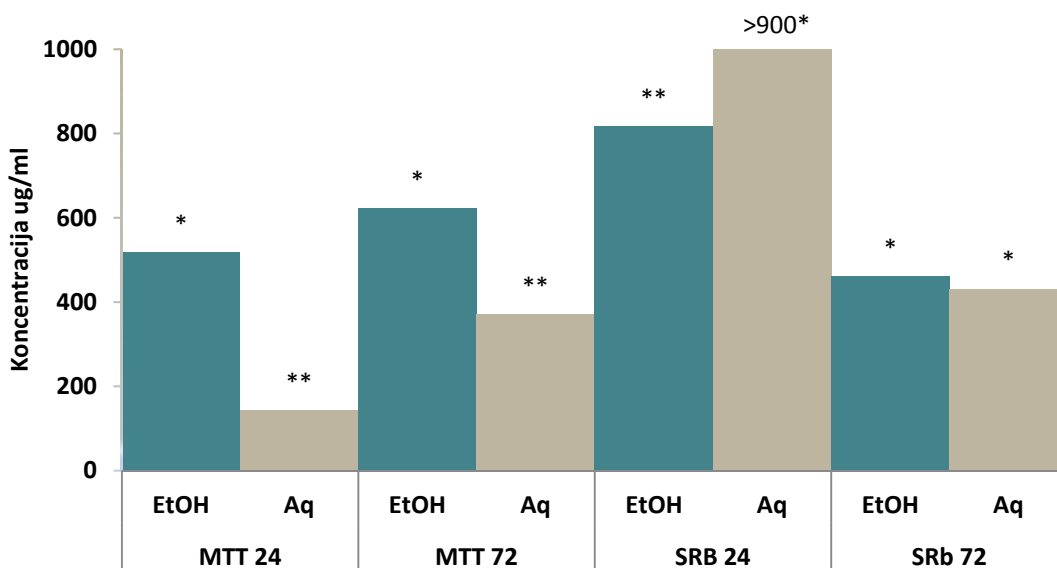
Slika 5.22. Poređenje antiproliferativnog delovanja ispitivanih EtOH i Aq ekstrakata vrste *L. contraversus*, određenog MTT i SRB testom nakon 24 h i 72 h ( $IC_{50}$   $\mu\text{g/ml}$ ). \*statistički značajna razlika između EtOH i Aq ( $p < 0,05$ ).

Najbolji efekat antiproliferativne aktivnosti među svim ispitivanim ekstraktima vrste *L. contraversus* ispoljio je EtOH ekstrakt sa najnižom  $IC_{50}$  vrednosti od 163,75  $\mu\text{g/ml}$  nakon tretmana od 24 h ispitan primenom MTT testa, dok je najbolji efekat citotoksičnosti ostvario Aq ekstrakt nakon 72 h ispitan SRB testom ( $IC_{50}$ =249,03  $\mu\text{g/ml}$ ). Poređenjem  $IC_{50}$  vrednosti EtOH i Aq ekstrakata može se uočiti da su etanolni ekstrakti ispoljili statistički značajno ( $p < 0,05$ ) bolju aktivnost nakon oba inkubaciona tretmana u odnosu na vodene ekstrakte primenom MTT testa. Za razliku od rezultata MTT testa, rezultati SRB testa pokazuju da ispitivani EtOH i Aq ekstrakti nemaju statistički značajnu aktivnost nakon tretmana od 24 h, dok nakon 72 h sata vodeni ekstrakt pokazuje značajno bolju aktivnost.

### 5.2.8.2. *Macrolepiota procera*

Na osnovu rezultata oba sprovedena testa antiproliferativnog delovanja, Aq ekstrakt pokazao je najbolju aktivnost ( $IC_{50}$ = 144,53  $\mu\text{g/ml}$ ) nakon 24 h primenom MTT testa. Etanolni ekstrakt pokazuje najbolju aktivnost nakon tretmana od 72 h ispitan SRB testom ( $IC_{50}$ =462,18  $\mu\text{g/ml}$ ).

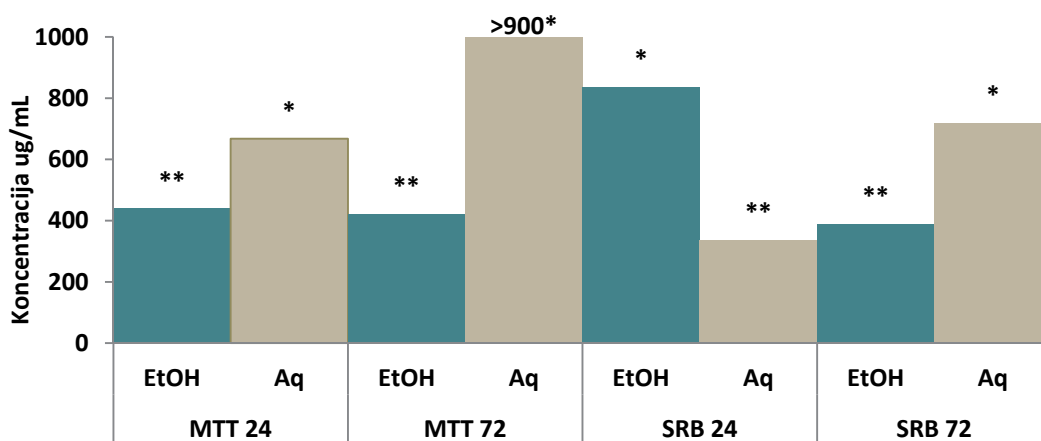
Poređenjem rezultata citotoksičnog efekta EtOH i Aq ekstrakata uočava se značajno bolja aktivnost Aq ekstrakata na oba inkubaciona tretmana kada je upitanju MTT test, u odnosu na rezultate SRB testa gde EtOH ekstrakt ostvaruje značajno bolju aktivnost ( $p < 0,05$ ) nakon 24 h tretmana, u odnosu na Aq ekstrakt koji pri maksimalnoj koncentraciji od 900  $\mu\text{g/ml}$  nije ostvario  $\text{IC}_{50}$  vrednost. Rezultati antiproliferativne aktivnosti oba ekstrakta pri inkubacionom tretmanu od 72 h na SRB testu se statistički ne razlikuju Slika 5.23. Prilog. 8.6



Slika 5.23. Poređenje antiproliferativnog delovanja ispitivanih EtOH i Aq ekstrakata vrste *M. procera*, određenog MTT i SRB testom nakon 24 h i 72 h ( $\text{IC}_{50}$   $\mu\text{g/ml}$ ). \*statistički značajna razlika između EtOH i Aq ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.8.3. *Lycoperdon perlatum*

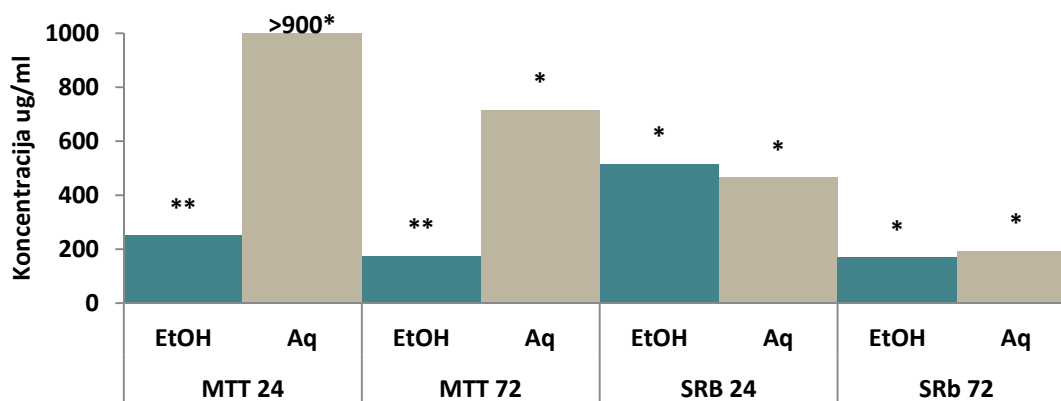
Rezultati antiproliferativne aktivnosti EtOH i Aq ekstrakata prikazani su na Slici 5.24. i Prilogu 8.6. Najbolju aktivnost pokazao je Aq ( $\text{IC}_{50} = 336,423$   $\mu\text{g/ml}$ ) nakon 24h tretmana i EtOH nakon 72h ( $\text{IC}_{50} = 388,36$   $\mu\text{g/ml}$ ) primenom SRB testa. Poređenjem citotoksične aktivnosti između EtOH i Aq ekstrakata možemo zapaziti da je EtOH ekstrakt pokazao značajno bolju aktivnost (niže vrednosti  $\text{IC}_{50}$ ) nakon oba inkubaciona tretmana za MTT test, dok je kod SRB testa EtOH pokazao statistički značajno bolju aktivnost nakon 24 h a Aq nakon 72 h.



Slika 5.24. Poređenje antiproliferativnog delovanja ispitivanih EtOH i Aq ekstrakata vrste *L. perlatum*, određenog MTT i SRB testom nakon 24 h i 72 h ( $IC_{50}$   $\mu\text{g/ml}$ ). \*statistički značajna razlika između EtOH i Aq ( $p < 0,05$ ).

#### 5.2.8.4. *Coprinellus disseminatus*

Najbolji efekat antiproliferativne aktivnosti odnosno najmanje  $IC_{50}$  vrednosti pokazao je EtOH ekstrakt ( $IC_{50} = 168,253 \mu\text{g/ml}$ ) primenom SRB testa nakon tretmana od 72 h (Slika 5.25., Prilog 8.6).

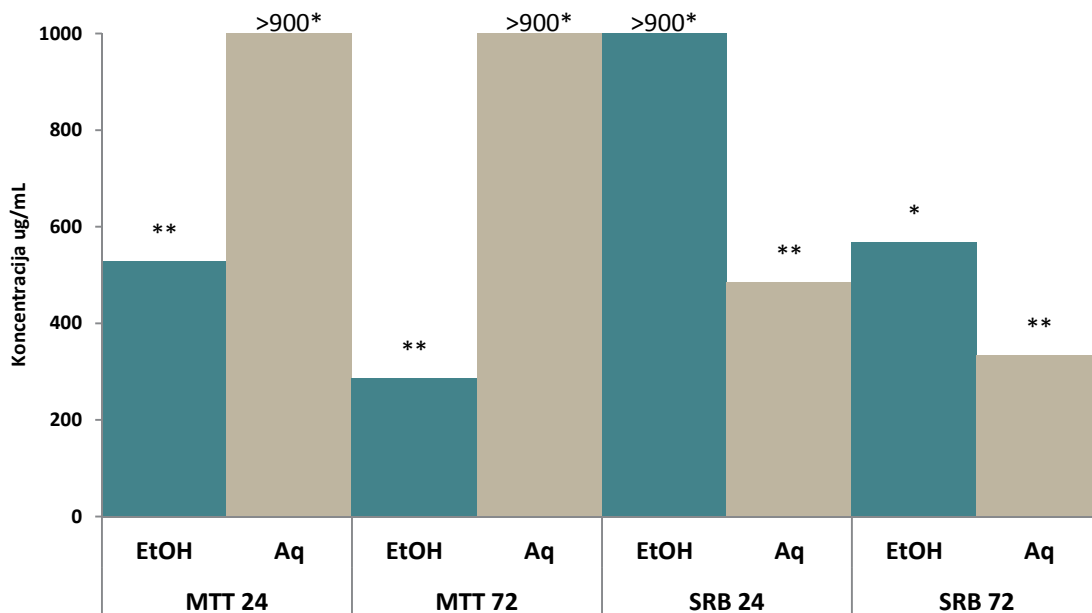


Slika 5.25. Poređenje antiproliferativnog delovanja ispitivanih EtOH i Aq ekstrakata vrste *C. disseminatus* određenog MTT i SRB testom nakon 24 h i 72 h ( $IC_{50}$   $\mu\text{g/ml}$ ). \*statistički značajna razlika između EtOH i Aq ( $p < 0,05$ ).

Najbolje vrednosti antiproliferativne aktivnosti za Aq ekstrakt takođe su ostvarene primenom SRB testa, nakon 72 h tretmana ( $IC_{50} = 192,06 \mu\text{g/ml}$ ). Poređenjem ostvarenih  $IC_{50}$  vrednosti EtOH i Aq ekstrakata uočava se značajno ( $p < 0,05$ ) bolja aktivnost EtOH ekstrakata nakon oba inkubaciona tretmana primenom MTT testa, dok rezultati antiproliferativne aktivnosti oba ekstrakta primenom SRB testa ne pokazuju značajnu razliku.

### 5.2.8.5. *Auricularia auricula-judae*

Najbolju antiproliferativnu aktivnost pokazao je EtOH ekstrakt ( $IC_{50}=285,71 \mu\text{g/ml}$ ) nakon 72 h primenom MTT testa u odnosu na sve ispitivane ekstrakte (Slika 5.26., Prilog 8.6.). Vodeni ekstrakt pokazao je najbolju aktivnost nakon 72 h tretmana primenom SRB testa ( $IC_{50}=333,359 \mu\text{g/ml}$ ), na ostalim inkubacionim tretmanima uz primenu oba testa ovi ekstrakti nisu postigli  $IC_{50}$  vrednost pri najvišim ispitivanim koncentracijama (900  $\mu\text{g/ml}$ ). Poređenjem dobijenih vrednosti između EtOH i Aq ekstrakata značajno bolju ( $p<0,05$ ) aktivnost pokazuju EtOH ekstrakti pri MTT testu, dok se poređenjem vrednosti antiproliferativne aktivnosti na osnovu SRB testa može uočiti značajno bolja aktivnost Aq ekstrakta.

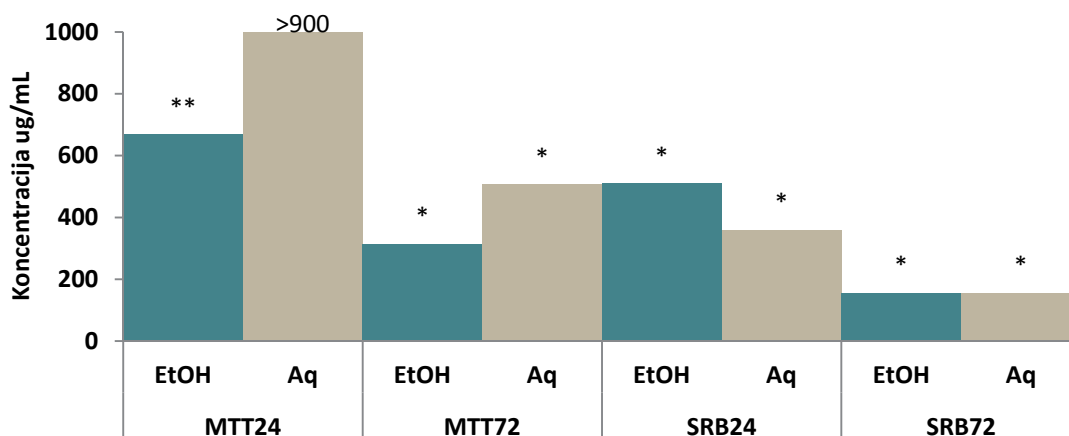


Slika 5.26. Poređenje antiproliferativnog delovanja ispitivanih EtOH i Aq ekstrakata vrste *A. auricula-judae* određenog MTT i SRB testom nakon 24 h i 72 h ( $IC_{50} \mu\text{g/ml}$ ). \*statistički značajna razlika između EtOH i Aq ( $p<0,05$ ).

### 5.2.8.6. *Meripilus giganteus*

Etanolni ekstrakt je pokazao najbolju antiproliferativnu aktivnost, sa najnižom  $IC_{50}$  vrednosti (155,03  $\mu\text{g/ml}$ ) pri SRB testu nakon 72 h tretmana, pri istim uslovima je Aq ekstrakt pokazao najbolju aktivnost (Slika 5.27., Prilog 8.6.). Poređenjem ostvarenih aktivnosti, zapažamo da ne postoji statistički značajna razlika ( $p<0,05$ ) ostvarenih vrednosti oba ekstrakta osim u slučaju ostvarene aktivnosti nakon 24 sata tretmana primenom MTT testa, kada vodeni ekstrakt nije postigao  $IC_{50}$  pri koncentraciji od 900  $\mu\text{g/ml}$ .

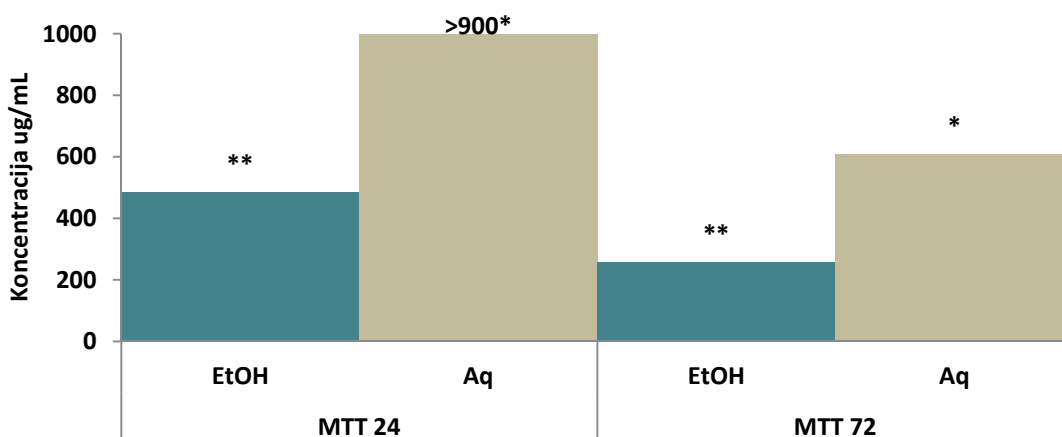




Slika 5.27. Poređenje antiproliferativnog delovanja ispitivanih EtOH i Aq ekstrakata vrste *M. giganteus* određenog MTT i SRB testom nakon 24 h i 72 h (IC<sub>50</sub> µg/ml). \*statistički značajna razlika između EtOH i Aq ( $p < 0,05$ ).

#### 5.2.8.7. *Armillaria mellea*

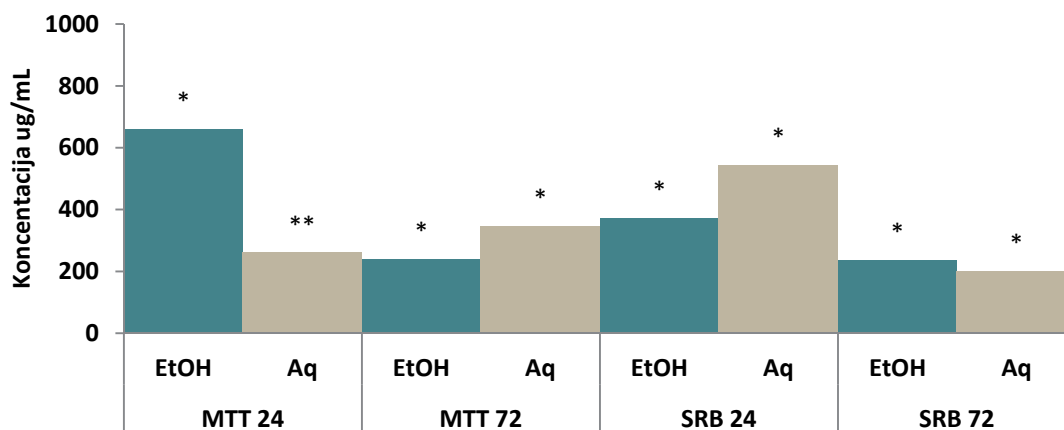
Najbolju antiproliferativnu aktivnost ispoljava EtOH ekstrakt nakon 72h (IC<sub>50</sub>=285,11 µg/ml) pri MTT testu (SRB test za ekstrakte ove vrste nije rađen), ovi ekstrakti pokazuju i statistički značajno bolju aktivnost u odnosu na Aq ekstrakte (Slika 5.28., Prilog 8.6).



Slika 5.28. Poređenje antiproliferativnog delovanja ispitivanih EtOH i Aq ekstrakata vrste *A. mellea* određenog MTT i SRB testom nakon 24 h i 72 h (IC<sub>50</sub> µg/ml). \*statistički značajna razlika između EtOH i Aq ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.8.8. *Laetiporus sulphureus*

Rezultati antiproliferativne aktivnosti EtOH i Aq ekstrakata prikazani su na Slici 5.29. Najbolji antiproliferativni efekat je ispoljio Aq ekstrakt ( $IC_{50} = 199,73 \mu\text{g/ml}$ ) nakon 24 h primenom SRB testa, pri istim uslovima etanolni ekstrakt pokazuje najbolju aktivnost ( $IC_{50} = 236,77 \mu\text{g/ml}$ )

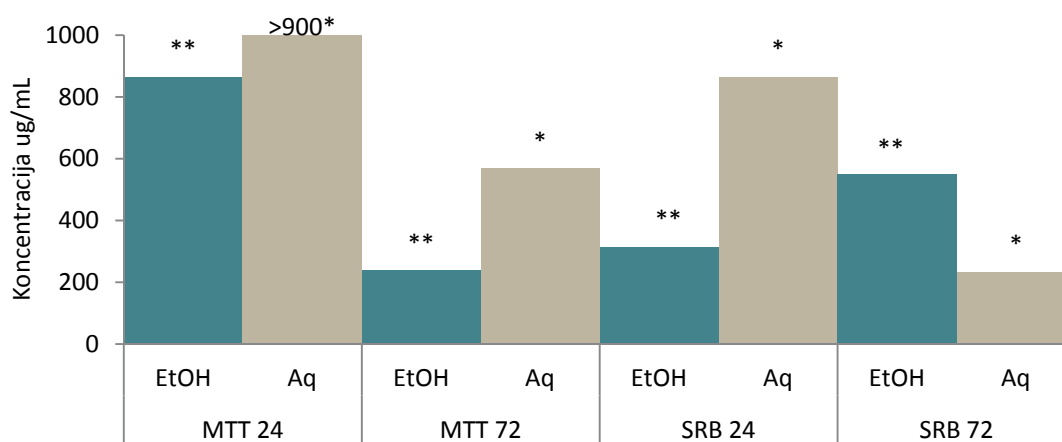


Slika 5.29. Poređenje antiproliferativnog delovanja ispitivanih EtOH i Aq ekstrakata vrste *L. sulphureus* određenog MTT i SRB testom nakon 24 h i 72 h ( $IC_{50} \mu\text{g/ml}$ ). \*statistički značajna razlika između EtOH i Aq ( $p < 0,05$ ).

Na osnovu poređenja ostvarenih  $IC_{50}$  vrednosti nema statistički značajne razlike u ostvarenim aktivnostima između Aq i EtOH ekstrakata, osim u slučaju aktivnosti nakon tretmana 24h kada Aq ekstrakt pokazuje značajno bolju aktivnost u odnosu na EtOH primenom MTT testa.

### 5.2.8.9. *Fistulina hepatica*

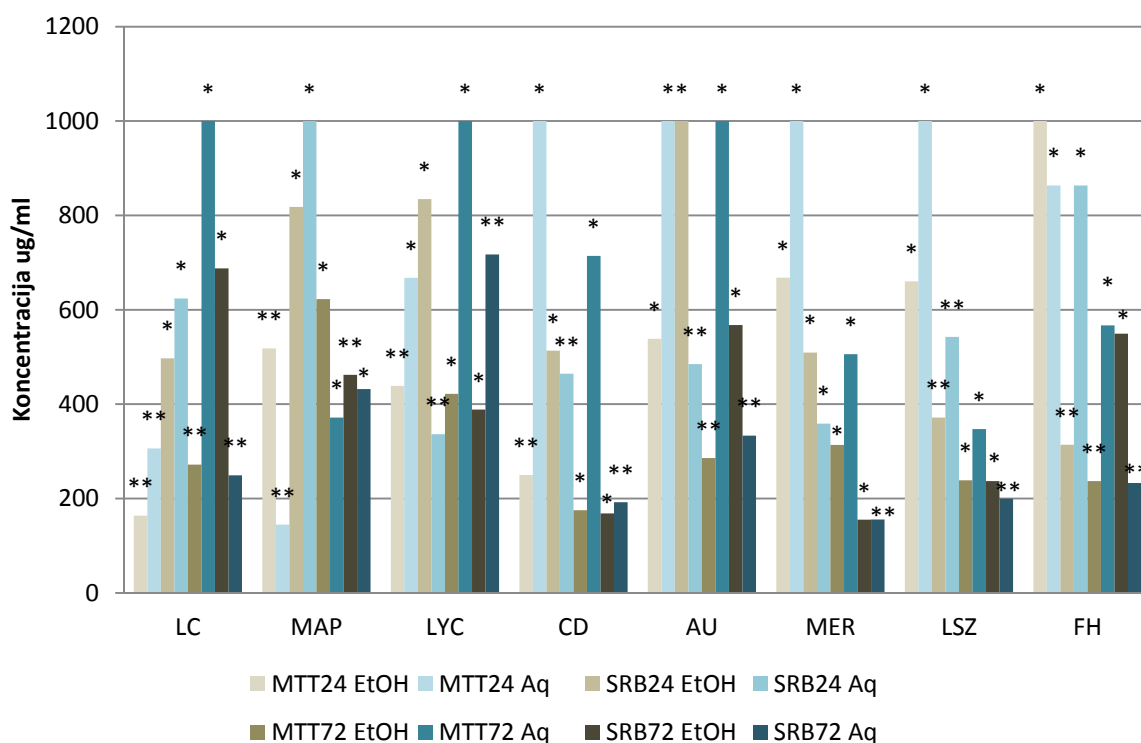
Najbolji antiproliferativni efekat ispoljava Aq ekstrakt ( $IC_{50} = 232,804 \mu\text{g/ml}$ ) u odnosu na sve analizirane ekstrakte posle 72 h primenom SRB testa.



Slika 5.30. Poređenje antiproliferativnog delovanja ispitivanih EtOH i Aq ekstrakata vrste *F. hepatica* određenog MTT i SRB testom nakon 24 h i 72 h ( $IC_{50} \mu\text{g/ml}$ ). \*statistički značajna razlika između EtOH i Aq ( $p < 0,05$ ).

Etanolni ekstrakt pokazuje najbolju antiproliferativnu aktivnost ( $IC_{50}= 236,77 \mu\text{g/ml}$ ) nakon 72 h primenom MTT testa (Slika 5.30. Prilog 8.6). Poređenjem aktivnosti oba ekstrakta može se uočiti značajna razlika ( $p<0,05$ ) u ispoljenoj antiproliferativnoj aktivnosti.

Rezultati ispitivanja antiproliferativne aktivnosti vodenih i etanolnih ekstrakata gljiva pokazali su da ekstrakti svih vrsta ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost, najbolju aktivnost pokazao je Aq ekstrakt *M. procera* ( $IC_{50}= 144,53 \mu\text{g/ml}$ ) nakon 24 h (MTT test) (Slika 5.31.). Na osnovu poređenja rezultata EtOH ekstrakata najbolju aktivnost ( $IC_{50}= 155,02 \mu\text{g/ml}$ ) pokazao je ekstrakt vrste *M. giganteus* nakon 72 h (SRB test).



Slika 5.31. Upporedni prikaz antiproliferativnog delovanja ( $IC_{50}$ ) EtOH i Aq ekstrakata u MTT i SRB testu nakon 24 h i 72 h ( $IC_{50} \mu\text{g/ml}$ ) \*statistički značajna razlika između EtOH i Aq ( $p<0,05$ )

Rezultati ostvarene aktivnosti Aq i EtOH ispitivanih vrsta ukazuju na veliku varijabilnost rezultata na osnovu MTT i SRB testa. Statističke analize rezultata antiproliferativne aktivnosti na osnovu MTT i SRB testa ukazuju da se ne uočava značajna razlika ( $p<0,05$ ) u pokazanoj aktivnosti između primenjenih testova kod sledećih ekstrakata Aq *F. hepatica* i EtOH *M. giganteus* nakon tretmana od 24h, dok se rezultati aktivnosti nakon 72h statistički značajno ne razlikuju kod: EtOH *L. sulphureus*, Aq *L. controversus*, Aq *M. procera*, EtOH *L. perlatum*, EtOH *C. disseminatus*.

Razlog za ovakvu neusaglašenost verovatno treba tražiti u različitim principima, odnosno različitim ćelijskim markerima toksičnosti na kojima su testovi zasnovani (Kaišarević, 2011). Iako brojne studije pokazuju dobru korelaciju između rezultata testova citotoksičnosti koji se baziraju na merenju različitih krajnjih parametara, pokazano je i to da osetljivost samih markera toksičnosti,

odnosno eseja koji su na njima bazirani može značajno varirati u zavisnosti od vrste supstance koja je testirana (Garle i sar., 1994)

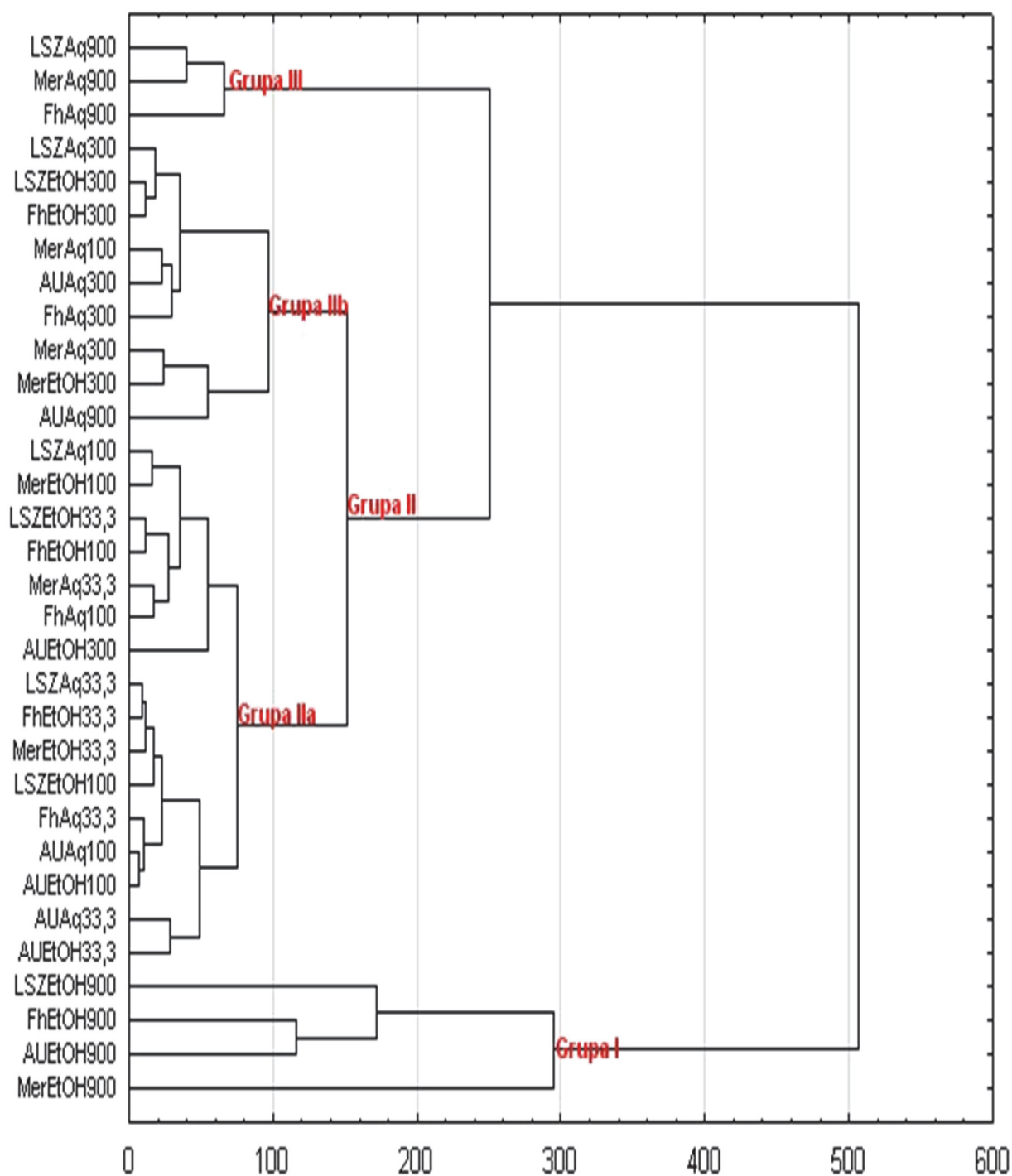
Test toksičnosti mora biti pažljivo odabran tako da odgovara potrebama svake studije, što predstavlja problem kada ispituje efekat kombinovanih tretmana, odnosno uzoraka koji sadrže različite tipove supstanci (Mickuviene i sar., 2004). S obzirom da u našim istraživanjima pri ispitivanju citotoksičnog efekta ekstrakata gljiva MTT i SRB testom, nije došlo do odstupanja u smislu da je jednim testom potvrđen citotoksični efekat, a drugim ne, postoji mogućnost da je sama kompleksnost uzorka kakvi su ekstrakti gljiva, uzrok različitih efekata u dva primenjena testa.

U MTT testu rezultati zavise u velikoj veri od mitohondrijalne aktivnosti, pa ako je njihova aktivnost poremećena, rezultati mogu ukazati na to da ćelije nisu žive ili ne proliferišu, što realno nije slučaj (Kaišarević 2011, Houghton i sar., 2007). Sličan mehanizam se može primeniti i na stimulaciju mitohondrijalne aktivnosti, pa bi u tom slučaju u našim istraživanjima rezultati zapravo ukazali na povećanu aktivnost mitohondrijalne dehidrogenaze, a ne na proliferativni efekat. MTT test se bazira na merenju veoma specifičnog biohemijškog parametra (kakav je aktivnost mitohondrijalne dehidrogenaze), što ga čini senzitivnim, ali u isto vreme i suviše selektivnim. Što se tiče SRB testa, ističe se da je osetljiv, jednostavan, sa visokim stepenom reproducibilnosti, dobrom linearnošću, dobrim odnosom signal-šumovima (Kaišarević 2011), a merenje se zasniva na stabilnim parametrima koji nisu vremenski zavisni, upravo iz tih razloga je primenjen kao potvrda MTT u našim istraživanjima.

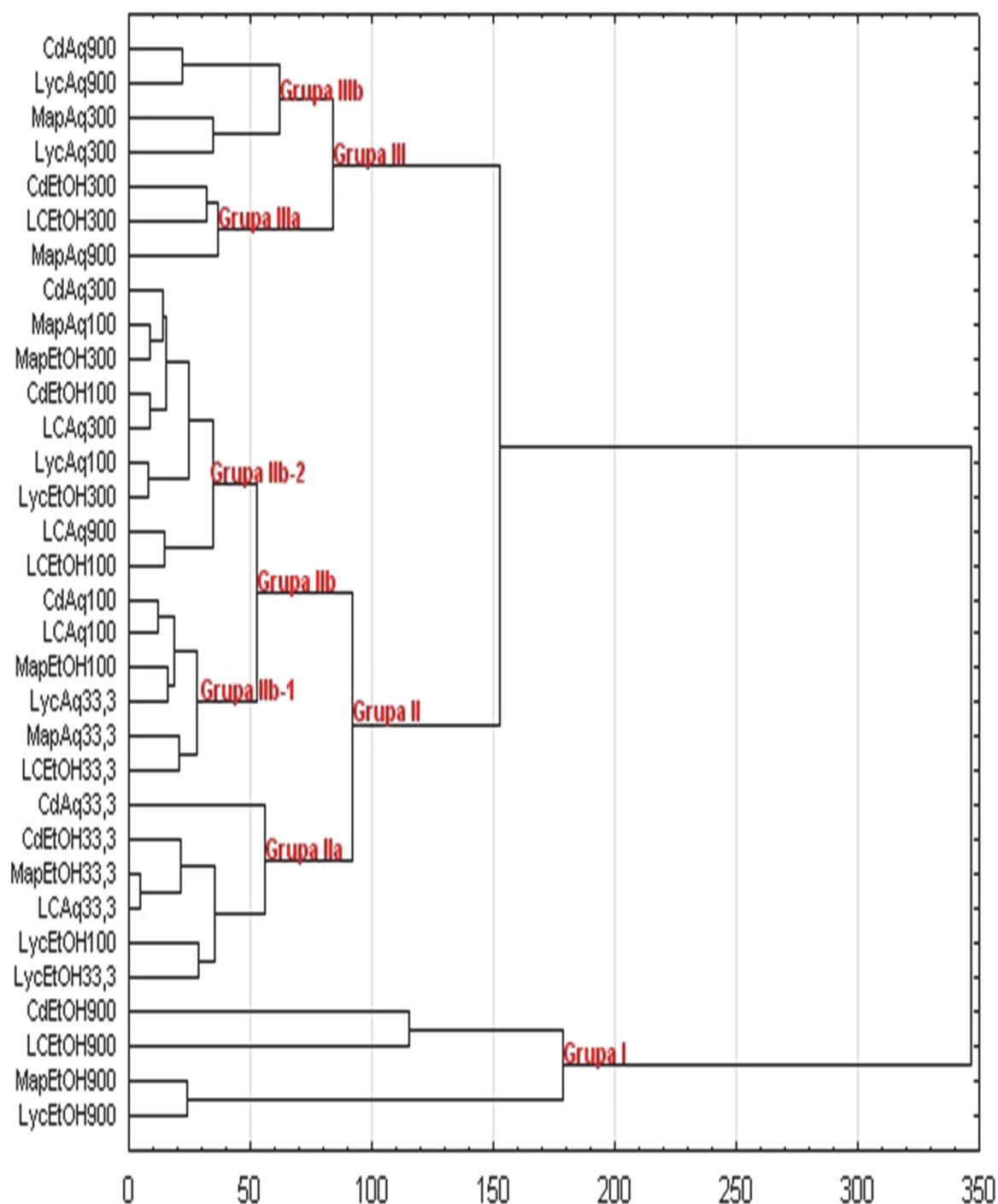
Usled velikog variranja rezultata u ispitivanim koncentracijama, kao i u cilju generalnog prikazivanja citotoksičnog efekta EtOH i Aq ekstrakata nakon dva inkubaciona tretmana (24h, 72h) dobijene vrednosti citotoksičnosti (CI%) podvrgnute su diskriminantnoj analizi. Izračunate vrednosti Mahalanobiusovih distanci korišćene su u aglomerativnoj politetičkoj klaster analizi i prikazane su horizontalnim klasterom (Slika 5.32). Odvojenim klasterima prikazani su rezultati citotoksičnosti za lignokolne vrste (*A. mellea*, *F. hepatica*, *M. giganteus*, *A. auricula-judae*, *L. sulphureus*) i terikolne vrste gljiva (*M. procera*, *L. perlatum*, *L. controversus*, *C. disseminatus*).

Na osnovu ove statističke analize, prema naglašenom efektu citotoksičnosti izdvojili su se EtOH ekstrakti na koncentraciji od 900 µg/ml kod sledećih vrsta: *L. sulphureus*, *F. hepatica*, *A. auricula-judae*, *M. giganteus* (Grupa I). U zasebnu grupu analiziranih uzoraka (Grupa III) izdvojile su se visoke koncentracije vodenih ekstrakta istih lignikolnih vrsta gljiva u kojoj se po svojoj specifičnosti izdvaja vodeni ekstrakt *F. hepatica*. Ipak, ovakav citotoksični efekat nije pokazao Aq ekstrakt *A. auricula-judae*, što je bilo za očekivati s obzirom na dobijene vrednosti njenog EtOH ekstrakta.

Pri nižim koncentracijama (u opsegu od 33,3 µg/ml do 300 µg/ml) gotovo da ne postoji pravilo grupisanja ekstrakata po tipu i koncentraciji (Grupa II). Možemo generalno zaključiti da ovu grupu čine ekstrakti koji se pretežno grupišu prema koncentraciji, a ne prema tipu ekstrakta, pri čemu se uočava fina povezanost dobijenih vrednosti istih koncentracija različitih ekstrakata (EtOH, Aq) poreklom od istih vrsta gljiva, što govori u prilog korelaciji efekta citotoksičnosti sa koncentracijom, a znatno manje sa tipom analiziranog ekstrakta.



Slika 5.32. Klaster lignikolnih vrsta nastao na osnovu procenta citotoksične aktivnosti različitih koncentracija EtOH i Aq ekstrakata u toku 24 h i 72h tretmana ispitan MTT i SRB testom.



Slika 5.33. Klaster terikolnih vrsta nastao na osnovu procenta citotoksične aktivnosti različitih koncentracija EtOH i Aq ekstrakata u toku 24 h i 72h tretmana ispitan MTT i SRB testom.

Klaster analiza za terikolne vrste (Slika 5.33) pokazuje naglašeniju diferenciranost analiziranih vrsta i usaglašeniji efekat koncentracije ekstrakata u dobijenim grupama u odnosu na klaster lignikolnih vrsta. Na osnovu ove analize izdvojile su se tri grupe (Grupa I, Grupa II, Grupa III) od kojih Grupa II sadrži dve podgrupe (IIa i IIb), podgrupa IIb sadrži dve subgrupe (IIb-1 i IIa-1), dok Grupa III sadrži dve podgrupe (IIIa i IIIb)

Etanolne ekstrakte visoke koncentracije (900 µg/ml) svih analiziranih terikolnih gljiva, karakteriše visoka citotoksičnost (Grupa I), sličnosti u efektima pokazale su vrste *M. procera* i *L. perlatum* sa jedne, kao i *C. disseminatus* i *L. controversus* sa druge strane. Međutim; interesantno je primetiti da se na isti način ne ponašaju njihovi vodeni ekstrakti koji su se izdvojili u posebnu grupu (Grupa IIIb).

Najpribližnije vrednosti vodenom ekstraktu *M. procera* (900 µg/ml) pokazale su etanolni ekstrakti gljiva *C. disseminatus* i *L. controversus* (300 µg/ml) gradeći zasebnu grupu karakterističnog citotoksičnog efekta (Grupa IIIa).

Visoke koncentracije Aq ekstrakta *C. disseminatus* i *L. perlatum* (900 µg/ml) nasuprot prethodnom pokazuju sličan efekat Aq ekstrakti vrsta *L. perlatum* i *M. procera* trostruko niže koncentracije (300 µg/ml). Vodeni ekstrakt visoke koncentracije (900 µg/ml) vrste *L. controversus* je pokazao apsolutnu zavisnost od tipa ekstrakta s obzirom da su dobijene vrednosti citotoksičnosti kod ekstrakta ove vrste bile ujednačene, kod vodenog ekstrakta visoke koncentracije (900 µg/ml) i etanolnog ekstrakta znatno niže koncentracije (100 µg/ml). Ostale vrednosti citotoksičnog efekta kod ekstrakata analiziranih gljiva nižih koncentracija pokazuju znatno sličnije efekte u korelisanim parovima, etanolni ekstrakt niže koncentracije i vodeni ekstrakt više koncentracije za istu vrstu gljive.

Rezultati efekta ekstrakata su u saglasnosti sa publikovanim rezultatima za vrstu *L. sulphureus* u odnosu na antiproliferativni efekat, mada u našim istraživanjima već nakon 24 h tretmana EtOH ekstrakt pokazuje bolji efekat u odnosu na ranije rezultate za metanolni ekstrakt na 48 h. Oba ekstrakta pokazuju bolji efekat citotoksičnosti u odnosu na rezultate za polisaharidni i metanolni ekstrakt skorijih istraživanja (Petrović i sar., 2014).

Na osnovu rezultata naših istraživanja antiproliferativne aktivnosti smatramo da bi trebalo produžiti inkubacioni tretmana sa 24 na 72h, radi ostvarivanja boljeg efekta što je u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima APA odabranih vrsta lignikolnih gljiva (Karaman, 2009).

Gu i Leonard (2006) su pokazali da vodeni ekstrakt vrste *Coprinellus sp.* izaziva apoptozu (programiranu ćelijsku smrt), 71% u ranoj fazi tretmana pri koncentraciji 125 µg/ml i ukupno 82% u produženoj fazi tretmana. Ekstrakti vrste *C. disseminatus* u našim istraživanjima pokazuju nešto slabiji efekat citotoksičnosti u odnosu na ranije publikovane rezultate za Aq ekstrakt (IC<sub>50</sub>= 120 µg/ml na 24 h), ali je u odnosu na efekte citotoksičnosti koji su ispoljili ostali analizirani ekstrakti ispitivanih vrsta autohtonih gljiva, ispoljio jako dobar antiproliferativni potencijal (IC<sub>50</sub>= 168,25 EtOH na 72h), u odnosu na ispitivanu ćelijsku liniju MCF7.

Prethodna istraživanja metanolnih i vodenih ekstrakata lignikolne vrste *M. giganteus* poreklom sa Fruške gore ukazuju na bolji citotoksičan efekat ispitivanih metanolnih i vodenih ekstrakata na MCF7 ćelije u akutnoj fazi tretmana (24h), gde je metanolni ekstrakt pokazao bolji efekat u odnosu na vodeni (IC<sub>50</sub>= 403,4 µg/ml i IC<sub>50</sub>=580,0 µg/ml) (Karaman i sar., 2009). Naši rezultati pokazuju bolji efekat EtOH ekstrakta (IC<sub>50</sub>= 313,49 µg/ml pri MTT testu i IC<sub>50</sub>= 155,02 µg/ml pri SRB testu) nakon hronične faze tretmana od 72h.

Mlinarić i sar., 2004, su analizirali antigenotoksični potencijal metanolnog ekstrakta *Lactarius vellereus* na humanim HepG2 ćelijama, nakon aplikacije IQ (O2-amino-3-metilimidazo (4,5-f) kinolin). Tretman HepG2 ćelija sa ekstraktom *L. vellereus* i IQ, značajno, dozno zavisno smanjuje genotoksični efekat, razaranje DNK na ćelijama HepG2. Sposobnost ekstrakta *L. vellereus* da umanjí genotoksični efekat IQ na humanim ćelijama je od posebnog interesa, i ukazuje na potencijal ove

vrste u farmakološkoj primeni imajući u vidu da su heterociklični amini (IQ) etiološki faktori kancera kod ljudi i nalaze se na listi IARC (IARC 1993) kao kancerogene materije (ova jedinjenja se generišu tokom kuvanja mesa i ribe) (Skog i sar., 1998).

Wu i sar., 2011 su analizirali polisaharide ekstrahovane iz micelija druge vrste istog roda *Lactarius flavidulus* i ustanovili inhibiciju rasta Sarkoma 180 u dozi od 300mg/kg. Takođe, izolovani dimer 29,8-kDa lektina plodnog tela *L. flavidulus* ispoljava APA na ćelijama HepG2 i L1210 sa  $IC_{50}=8,90 \mu M$  i  $IC_{50}=6,81 \mu M$  (Patel i Goyal 2012). Prema našim dosadašnjim saznanjima *L. controversus* je vrsta čiji APA potencijal do sada nije ispitivan zbog čega je njegova utvrđena aktivnost za vodeni i etanolni ekstrakti u okviru naših istraživanja još značajnija u otkrivanju njihovog antiproliferativnog potencijala. Carvalho i sar., 2014 su detektovali prisustvo ergosterola (ergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol) kod vrste *L. controversus* poreklom iz Portugala pri koncentraciji 58,6 mg/100 g (sveže mase), ovi rezultati daju mogućnost da pretpostavimo da klase ovih jedinjenja imaju ulogu u citotoksičnoj aktivnosti. Prethodne studije *in vivo* su analizirale uticaj ergosterola na rast Sarkoma 180 pacova (Ferreira i sar., 2010), pri čemu je potvrđena pretpostavka da sam ergosterol inhibira angiogenezu. Potvrđen je citotoksični efekat derivata ergosterola na kancer ovarijuma, melanoma kože i debelog creva (Kim i sar., 2014).

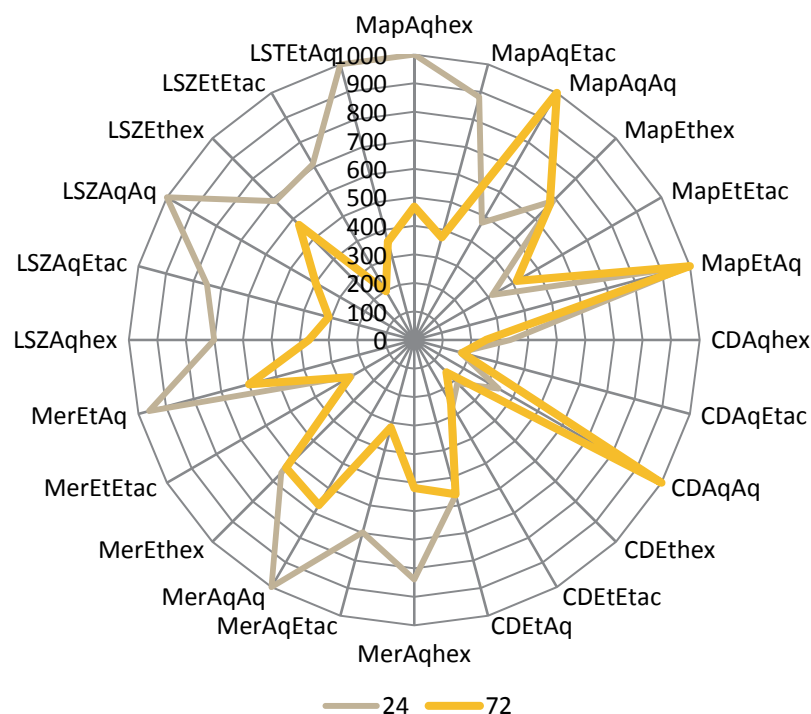
Ma i sar., 2010 su istraživali uticaj  $\beta$ -D-glukana izolovanog iz 70% etanolnog ekstrakta vrste *A. auricula-judae* na Sarkoma 180 tumor i utvrdili dozno-zavisnu inhibiciju rasta tumora, imunohistohemijska apoptoza posredovana regulacijom ekspresije Bax proteina i inhibicijom regulacije ekspresije Bcl-2 proteina.

Brojna istraživanja poslednjih decenija ustanovila su da bioaktivni metaboliti izolovani iz gljiva pružaju povoljne efekte u prevenciji i kontroli razvoja kancera: hinoni, cerebrozidi, izoflavoni, kateholi, amini, triacilgliceroli, seskviterpeni, steroidi, organski germanijum, selen, homo- i heteropolisaharidi, glikoproteini, glikopeptidi, proteini, i RNA-protein kompleksi (Ferreira i sar., 2010; De Silva i sar., 2012a, Petrova 2012, Xu i sar., 2012b). Imajući u vidu da je tretman sproveden na neprečišćenim ekstraktima (tzv. "crude" ekstraktima) pretpostavljamo da međusobne interakcije različitih biomolekula prisutnih u analiziranim ekstraktima, koje stoga imaju različite ćelijske i molekulske taržete, mogu biti odgovorne i za antiproliferativnu aktivnost ovih ekstrakata.

Sprovedenim testovima citotoksičnosti (MTT i SRB) utvrdili smo da svi Aq i EtOH ekstrakti ispitivanih vrsta pokazuju antiproliferativnu aktivnost. Polazeći od pretpostavke da određene grupe tj. familije jedinjenja jesu prisutne u ekstraktima, i pri tome imaju veći ili manji značaj u ostvarivanju same APA, izvršeno je i frakcionisanje ekstrakata, na osnovu ranije utvrđenih najmanjih vrednosti  $IC_{50}$  kod Aq i EtOH ekstrakata (str. 67, poglavlje 4.2.3.).

Rezultati citotoksičnog efekta različitih frakcija (MapAqhex, MapAqEtac, MapAqAq, MapEthex, MapEtEtac, MapEtAq, CDAqhex, CDAqEtac, CDAqAq, CDEthex, CDEtEtac, CDEtAq, MerAqhex, MerAqEtac, MerAqAq, MerEthex, MerEtEtac, MerEtAq, LSZAqhex, LSZAqEtac, LSZAqAq, LSZEthex, LSZEtEtac, LSEtAq) na ćelijsku liniju MCF7 nakon 24h i 72 h tretmana primenom MTT testa prikazani su na Slici 5.34.





Slika 5.34. Prikaz IC<sub>50</sub> vrednosti različitih frakcija na MCF7 ćelijsku liniju nakon 24h i 72 h tretmana.

Na osnovu rezultata APA različitih frakcija uočavamo da heksanske i etilacetatne frakcije ostvaruju najbolji efekat citotoksičnosti na ćelijskoj liniji MCF7. Na osnovu toga može se zaključiti da su za dobijene aktivnosti odgovorne familije nepolarnih (kod heksanskih) i srednje polarnih jedinjenja (kod etilacetatnih), osim u slučaju jestive vrste *M. procera* Aq ekstrakt, za koju se dobija bolji efekat kod ukupnog ekstrakta nego kod samih frakcija, što bi značilo za ovu aktivnost da su odgovorna polarna jedinjenja i to jedinjenja koja imaju sinergističko delovanje.

Nakon 24 h tretmana efekat antiproliferative aktivnosti frakcija kod vrste *M. procera* - MapAq i MapEtOH je manji u odnosu na efekat koji je ispoljio ukupan MapAq vodeni ekstrakt.

Frakcija Aq ekstrakta *C. disseminatus* ispoljile su bolju aktivnost u odnosu na ukupan vodeni ekstrakt ali je etilacetatna frakcija ispoljila najbolju APA za oba inkubaciona perioda, dok je heksanska frakcija ispoljila bolju APA nakon 72h, a vodena frakcija nakon akutnog tretmana (24h).

Heksanska frakcija iz EtOH ekstrakta *C. disseminatus* ispoljila je najbolju APA nakon 72 h, dok su ostale frakcije postigle efekte koji su slične APA kod ukupnog CDEtOH.

Frakcija poreklom iz vrste *M. giganteus* MerAq i MerEtOH ne pokazuju bolje rezultate APA osim frakcije MerEtEtac poreklom iz EtOH ekstrakta *M. giganteus* nakon 24 h.

Frakcije poreklom iz vrste *L. sulphureus* LSZAq i LSZEtOH ne pokazuju bolje rezultate APA od ukupnog ekstrakta iste vrste, osim kod etilacetatne frakcije koja pokazuju nešto bolju APA na tretmanu 72h.

Dosadašnja istraživanja ukazuju na značajnu ulogu sterolnih jedinjenja kada je upitanju APA aktivnost (Bok i sar., 1999) koja se upravo mogu naći u heksanskoj frakciji. Na osnovu polarnosti

etilacetatne frakcije možemo pretpostaviti da srednje polarna jedinjenja po tipu polifenola, terpenoida imaju značajnu ulogu u ostvarivanju ove aktivnosti.

Pored toga, u pojedinim slučajevima ekstrakti su pokazali bolji efekat citotoksičnog delovanja nego frakcije što je u saglasnosti sa ranijim pretpostavkama da upravo sinergizam bioaktivnih molekula ima za posledicu najbolji efekat. Sa druge strane treba imati u vidu da samo frakcionisanje može da dovede do inaktivacije biomolekula, kao i činjenicu da je frakcionisanje izvedeno na najprostiji način bez upotrebe sofisticiranih metoda razdvajanja (Karaman, 2009).

Smatramo da aktivnost ekstrakata zavisi prevashodno od prisutnih hemijskih jedinjenja koja ispoljavaju biološku aktivnost biomolekula i njihovog mehanizma citotoksičnog delovanja. Pri tome prisustvo sekundarnih metabolita, za koje se pretpostavlja da imaju ulogu u antiproliferativnom delovanju, kao i njihova efikasnost tj. specifična aktivnost zavisi od niza sredinskih faktora kao što su specifično mikrostanište tj. mesto produkcije plodnih tela (fruktifikacije), uslova kultivisanja (u laboratorijskim uslovima), same procedure ekstrakcije, ali i genetskih faktora određene vrste i samog soja unutar vrste (Karaman, 2009). Stoga je na osnovu ranije poznatih činjenica utvrđeno da vrste različitog geografskog porekla ispoljavaju različite antioksidantne efekte, a samim tim se može očekivati da isto važi i za samu antiproliferativnu aktivnost.

Analizirajući efekte koje odabrane vrste postižu na ispitivanoj ćelijskoj liniji možemo zaključiti da su daleko niži od efekata koje postižu prečišćene biomolekule (Zaidman i sar., 2005) te je u budućim eksperimentima potrebno primeniti efikasnije metode frakcionisanja kako bi došli do što čistijih supstanci za koje pretpostavljamo da imaju ulogu u APA.

Rezultati generalno ukazuju na veliki potencijal istraživanih vrsta, mada komparirajući vrednosti citotoksičnog delovanja sa vrednostima koje se smatraju farmakološki značajnim (Kovačević, 2015), ispitivane vrste postižu značajno manje efekte.

### 5.3. Korelacija ukupnih fenola i flavonoida sa testovima citotoksičnosti

Kako bismo utvrdili uticaj određenih jedinjenja na dobijenu citotoksičnu aktivnost gljiva, vrednosti sadržaja ukupnih fenola i flavonoida korelisane su sa  $IC_{50}$  vrednostima u MTT i SRB testu citotoksičnosti nakon 24h, i 72h, (Slika 5.35.). *M. gignateus*, *L. sulphureus*, *A. auricula-judae*, *F. hepatica*, *A. mellea*, *C. disseminatus*, *L. controversus*, *L. perlatum*, *M. procera*.

Dobijene signifikantne korelacije između sadržaja fenola i flavonoida i  $IC_{50}$  vrednostima dobijenim u testovima citotoksičnosti ukazuju na značaj pomenutih jedinjenja u ostvarivanju APA efekta

Sadržaji ukupnih fenola pokazuje veoma visoku korelaciju ( $r^2=0,99$ ,  $p<0,05$ ) sa MTT testom na 24 h kod EtOH ekstrakata *A. auricula judae*, *A. mellea* i *M. giganteus* ( $r^2= 0,96$ ).

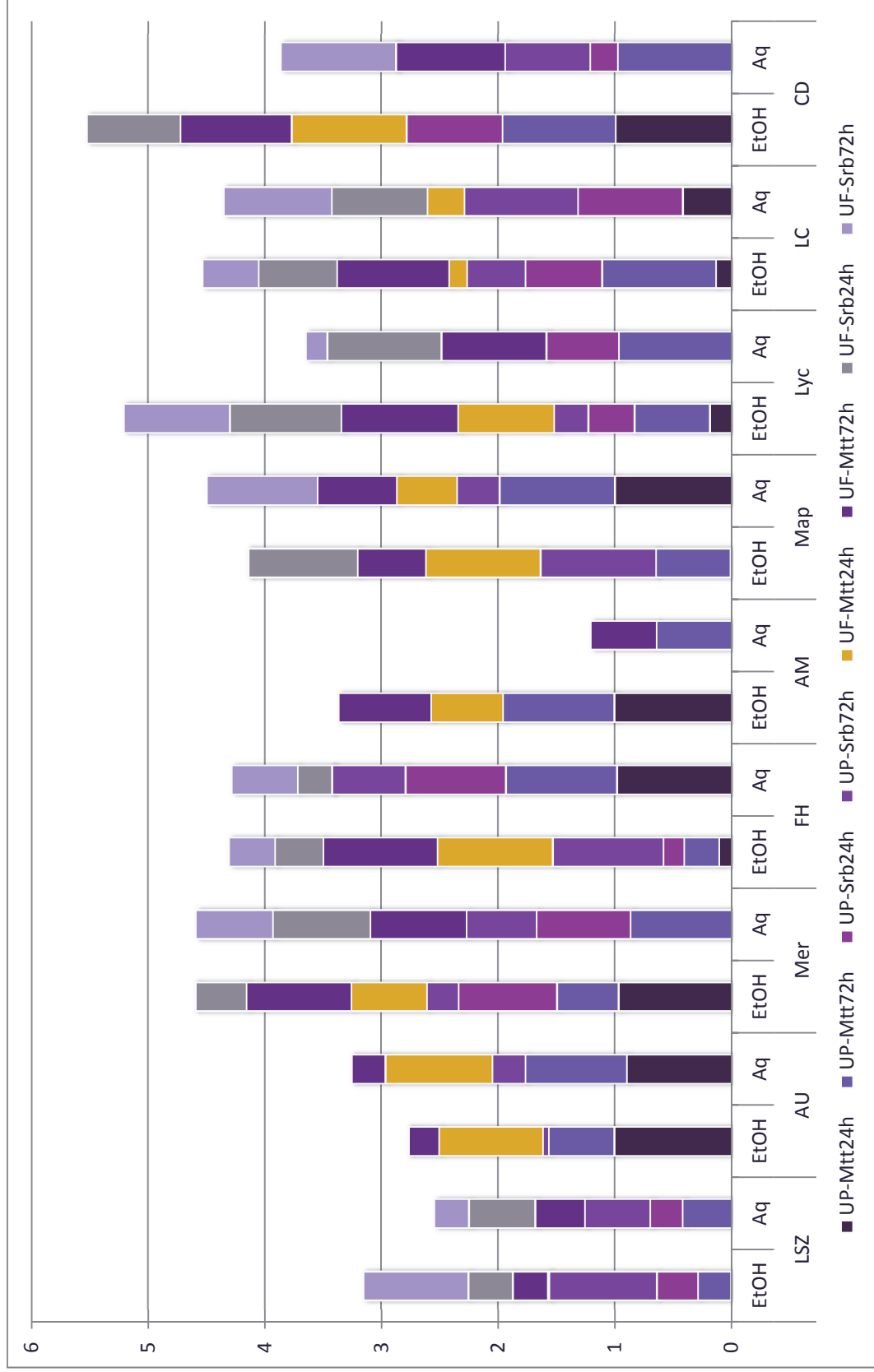
Veoma visoka i negativna korelacija ukupnih fenola i MTT testa na oba inkubaciona tretmana zabeležena je kod ekstrakata vrsta *C. disseminatus* EtOH ( $r^2=0,99$  za MTT 24h i  $r^2=0,97$  za MTT 72h,  $p<0,05$ ), *M. procera* Aq ( $r^2=0,99$  za MTT 24h i  $r^2=0,98$  za MTT 72h,  $p<0,05$ ) i vrstu *F. hepatica* Aq

( $r^2=0,97$  za MTT 24h i  $r^2=0,95$  za MTT72h,  $p<0,05$ ), *L. controversus* EtOH, *C. disseminatus* Aq ( $r^2=0,97$ ), *L. perlatum* Aq ( $r^2=0,96$ ) na 24h.

Veoma visoke korelacije zabeležene su kod vrsta *L. sulphureus*, *F. hepatica*, *M. procera* EtOH ekstrakt Aq ekstrakt *L. controversus* na 72 h ( $r^2=0,91$  do  $r^2=0,98$  i LCAq  $r^2=0,97$ ) za SRB test, dok su visoke negativne korelacije zabeležene za *L. controversus* Aq ekstrakt ( $r^2=0,89$ ) na 24 h.

Veoma visoke korelacije ( $r^2=0,99$ ,  $p<0,05$ ) utvrđene su između sadržaja flavonoida i MTT testova kod *F. hepatica* i *C. disseminatus* EtOH ekstrakt (negativna korelacija) na oba inkubaciona tretmana, i na tretmanu od 24 sata kod ekstrakta EtOH *M. procera*, Aq *A. auricula-judae* ( $p<0,05$ ). Za tretman od 72 h signifikantne korelacije pokazuju EtOH i Aq ekstrakti vrsta *L. perlatum*, *L. controversus*, *M. giganteus*, zatim Aq ekstrakt *C. disseminatus* i EtOH *F. hepatica* (negativna korelacija). Kada je upitanju drugi test citotoksičnosti (SRB) i sadržaj ukupnih flavonoida signifikantne korelacije su zabeležene kod EtOH *L. perlatum* na oba inkubaciona vremena, na 24 h kod EtOH *M. procera*, Aq *L. perlatum* (negativna korelacija dok su na 72 h zabeležene kod Aq ekstrakata *C. disseminatus*, *M. procera*, *L. controversus* (negativna korelacija).

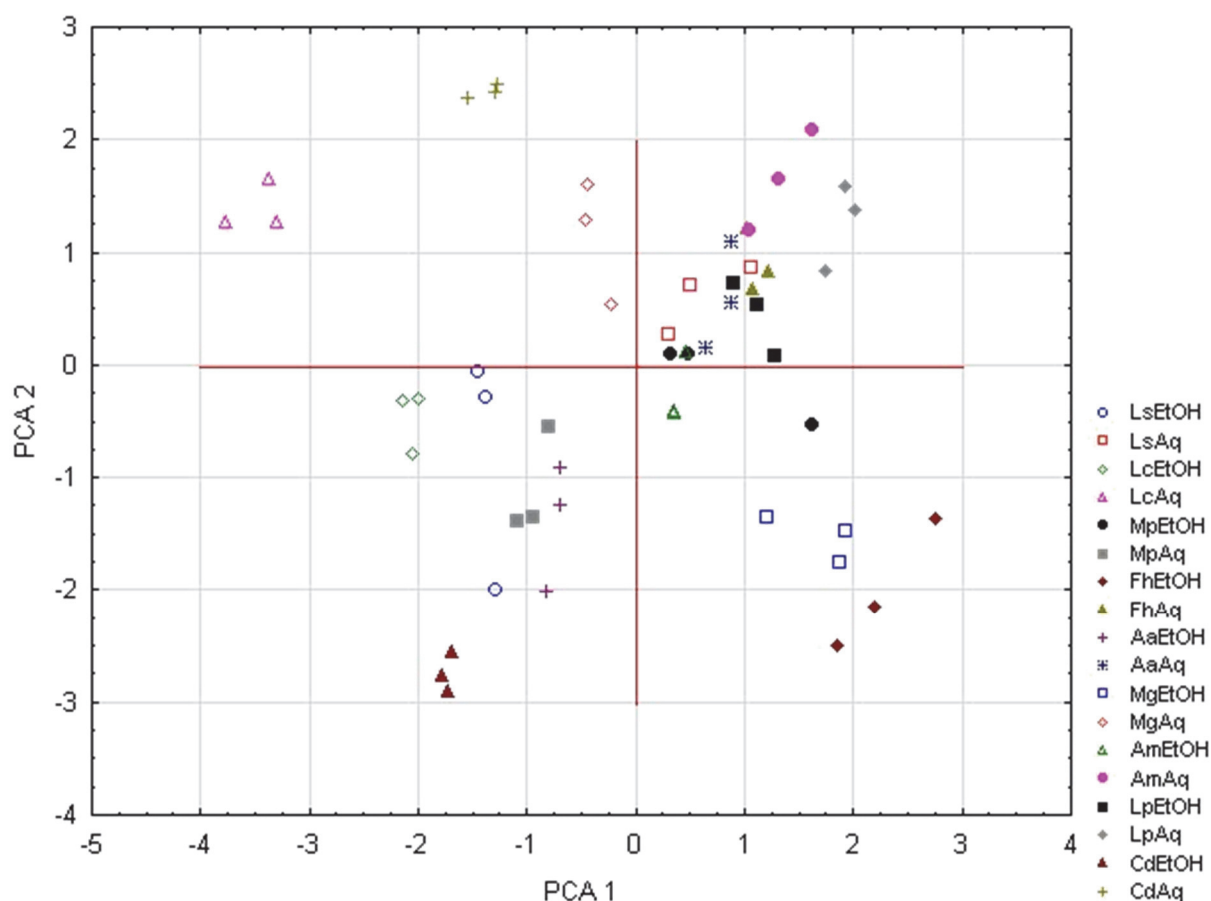
Uočeno je da su negativne korelacije između sadržaja fenola, flavonoida i  $IC_{50}$  vrednosti testova citotoksičnosti što bi značilo da povećana količina ovih jedinjenja ima za posledicu smanjenje  $IC_{50}$  što ukazuje da postoji značajan uticaj ovih jedinjenja na ostvarivanje citotoksičnog efekta. Ove vrednosti imaju posebno značajnu ulogu za MTT test na 72 h inkubacionom tretmanu. U odnosu na sadržaj ovih biomolekula, osobito flavonoida, SRB test pokazuje značajno manje korelacije posebno na tretmanu od 24h. Na osnovu dobijenih korelacija pretpostavljamo da i neke druge klase biomolekula ostvaruju ulogu kada je upitanju ova bioaktivnost.



Slika 5.35. Koeffijenti korelacija ( $r^2$ ) između sadržaja ukupnih fenola (UP) i ukupnih flavonoida (UF) sa IC50 u testovima citotoksičnosti

### 5.3.1 Analiza ukupne biološke aktivnosti svih analiziranih vrsta gljiva

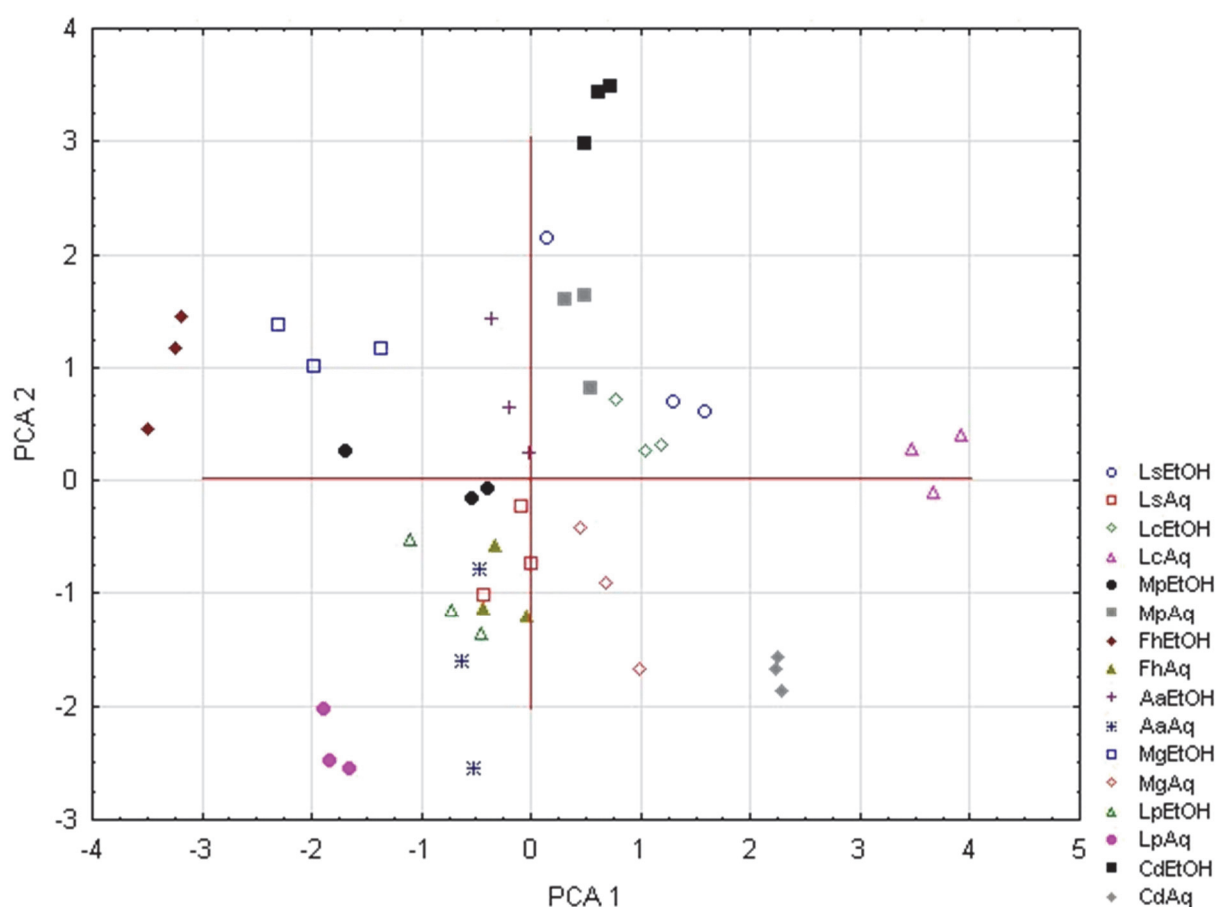
Dobijene vrednosti ( $IC_{50}$ ) u svim testovima biološke aktivnosti, kao i vrednosti ukupnih fenola i flavonoida pokazali su izuzetnu varijabilnost. Obim i tip varijabilnosti podataka ukazivao je na određene pravilnosti, te su dobijeni rezultati podvrgnuti multivarijantnoj statističkoj obradi kroz analizu osnovnih komponenti (PCA), kako bi se potvrdile uočene pravilnosti u varijabilnosti. Rezultati sprovedene analize prikazani su "scatter" dijagramom u prostoru prve dve glavne ose koje zajedno nose ukupno 49%, i 38% varijabilnosti uzoraka (Slika 5.36). Na osnovu ove analize utvrđeno je sledeće: ukupnoj varijabilnosti rezultata, citotoksične aktivnosti, ponajviše doprinose koncentracije ukupnih fenola, potom  $IC_{50}$  vrednosti DPPH i FRAP testa kada se posmatra prva glavna osa (osa veličina), dok su u odnosu na oblik varijabilnosti značajan efekat pokazali koncentracija ukupnih flavonoida i rezultati MTT testa nakon 72h.



Slika 5.36. Pozicije analiziranih uzoraka u prostoru 1. i 2. ose glavnih komponenti

Na osnovu varijabilnosti vrednosti bioloških aktivnosti dva tipa ekstrakata ispitivanih vrsta, mogu se definisati grupe ekstrakata gljiva sa sličnom veličinom i oblikom variranja. Kao zasebni oblici variranja izdvajaju se četiri grupe ekstrakata:

- 1) Aq ekstrakti vrsta *L. controversus*, *C. disseminatus* i nešto manje, *M. giganteus* čije variranje karakterišu osobene vrednosti  $IC_{50}$  na DPPH i testovima citotoksičnosti.
- 2) EtOH ekstrakti *L. sulphureus*, *A. auricula-judae*, *C. disseminatus*, i te Aq ekstrakt *M. procera* takođe karakteriše sličan tip variranja rezultata bioloških testova što se tiče  $IC_{50}$  DPPH ali u odnosu na prethodnu grupu njihov oblik variranja poprilično zavisi od koncentracije ukupnih flavonoida.
- 3) Svojom osobenošću izdvajaju se EtOH ekstrakti vrsta *F. hepatica*, *M. giganteus* čija veličina variranja je diktirana vrednostima ukupnih fenola i efekta FRAP testa, dok njihov oblik variranja diktiraju vrednosti ukupnih flavonoida.
- 4) Preostali ekstrakti čine heterogenu grupu u kojoj u veličini variranja dobijenih vrednosti dominira efekat FRAP testa, te delimično vrednosti testova citotoksičnosti na 24 h, dok je oblik variranja definitivno posledica testova citotoksičnosti.



Slika 5.37. Pozicije analiziranih uzoraka u prostoru 1. i 2. ose glavnih komponenti

Ukoliko varijabilnosti dobijenih vrednosti biološke aktivnosti ekstrakata i dobijene citotoksičnosti MTT testom uključimo vrednosti SRB testa (pritom je isključena vrsta AM na kojoj nisu sprovedeni SRB testovi) rezultati efekta pojedinih parametara na veličinu variranja uzorka (efekat prve ose) su gotovo nepromenjeni, dok se u odnosu na oblik variranja (efekat druge ose), pored efekta variranja koncentracije ukupnih flavonoida i efekta MTT testa na 24 h, izdvaja i pojačani efekat varijabilnosti  $IC_{25}$  vrednosti NO i  $IC_{50}$  vrednosti O2 testa.

Ukupan značaj varijabilnosti SRB testa na oba inkubaciona vremena nije pokazao značajniji uticaj na varijabilnost uzoraka etanolnih i vodenih ekstrakata ni u veličini ni u obliku varijabilnosti. Na taj način i raspored grupa ekstrakata koje pokazuju sličan model varijabilnosti nije pretrpeo značajnije promene Slika 5.37.

Sumarno, ukupni biopotencijal ispitivanih vrsta na osnovu sprovedenih analiza hemijske karakterizacije i bioloških testova koji su uključili ispitivanje antioksidativnog, antimikrobnog i antiproliferativnog potencijala govore u prilog opravdanosti hipoteze da su odabrane vrste potencijalni izvori nutraceutika. Svakako je potrebno i neophodno nastaviti dalja istraživanja ovih vrsta sa posebnim akcentom na vrste: *C. disseminatus*, *F. hepatica*, *M. giganteus*, *M. procera*.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu izloženih i diskutovanih rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji, a u saglasnosti sa ranijim radovima i literaturnim podacima mogu se izvesti sledeći zaključci:

### Hemijska karakterizacija

U okviru preliminarnog ispitivanja hemijskog sastava ekstrakata plodnih tela autohtonih vrsta gljiva pripadnika razdela Basidiomycota spektrofotometrijskom metodom određen je sadržaj ukupnih fenola i ukupnih flavonoida na etanolnim i vodenim ekstraktima sledećih vrsta: *M. giganteus*, *L. sulphureus*, *A. auricula-judae*, *F. hepatica*, *A. mellea*, *C. disseminatus*, *L. controversus*, *L. perlatum*, *M. procera*.

Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim etanolnim i vodenim ekstraktima kretao se u vrednostima od 16,68 mgGK/g do 106,33 mgGK/g. Najveći sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim etanolnim ekstraktima utvrđen je kod vrste *M. giganteus*, dok je među analiziranim vodenim ekstraktima najveći sadržaj fenolnih jedinjenja zabeležen kod vrste *A. auricula-judae*. Najmanju količinu ukupnih fenola sadržali su EtOH i Aq ekstrakti vrste *L. controversus*.

Sadržaj ukupnih flavonoida za ispitivane etanolne i vodene ekstrakte kretao se u rasponu od 18,0 mgKV/g do 0,34 mgKV/g. Najveći sadržaj flavonoida kod etanolnih ekstrakata zabeležen je kod vrste *A. auricula-judae*, vodeni ekstrakt sa najvećim sadržajem flavonoida je *M. giganteus*. Najniža koncentracija ove klase jedinjenja zabeležena je u EtOH ekstrakta kod vrste *L. perlatum* i Aq ekstraktima kod vrste *A. mellea*.

Generalno, vrednosti ukupnih fenola i flavonoida su statistički značajno veće kod etanolnih ekstrakata osim u sporadičnim slučajevima kod vrsta: *A. auricula-judae*, *L. sulphureus*, *A. mellea* (UP) i *L. perlatum* (UF).

### Ispitivanje fenolnih jedinjenja

HPLC-MS/MS tehnika primenjena je za kvalitativnu i kvantitativnu analizu metanolnih ekstrakata vrsta *M. giganteus*, *A. auricula-judae*, *F. hepatica*, *L. sulphureus*, *L. controversus*, i *C. disseminatus*. Od 45 kvantifikovanih jedinjenja dokazano je prisustvo 10 fenolnih jedinjenja (p-OH-benzoeva, protokatehinska, p-kumarinska, kafena, hinska, hlorogenska, krizoeriol, Api-7-O-Glukozid, Lut-7-O-Glukozid, amentoflavon).

U ispitivanim ekstraktima najzastupljenija fenolna jedinjenja su: p-OH-benzoeva kiselina (*M. giganteus*), p-kumarinska (*F. hepatica*) kiselina i hinska kiselina (*L. controversus*). Najveća koncentracija detektovanih fenolnih jedinjenja zabeležena je kod vrste *M. giganteus* kod koje je pored p-OH-benzoeva kiselina dokazana, protokatehinska kiselina, kafena kiselina i p-kumarinska kiselina. U pogledu raznovrsnosti fenolnih jedinjenja među ispitivanim vrstama ističe se vrsta *C. disseminatus* kod koje su pored fenolnih kiselina p-OH benzoeva, protokatehinska, p-kumarinska i hlorogenska kiselina dokazani i flavonoidi: krizoeriol, Api-7-O-Glc, Lut-7-O-Glc, i amentoflavon. Kod



vrste *F. hepatica*, detektovane su tri fenolne kiseline: protokatehinska, p-kumarinska i kafena kiselina, po jedna fenolna kiselina dokazana je kod vrsta *L. sulphureus* (p-kumarinska) i *L. controversus* (hinska). Od 45 kvantifikovanih komponenti u metanolnom ekstraktu vrste *A. auricula-judae* sve analizirane komponente su bile ispod nivoa detekcije, što je u suprotnosti sa ranijim podacima za vrstu poreklom iz Turske kod koje je detektovano 8 fenolnih kiselina od kojih su dominantne bile: galna, p-OH-benzoeva, kafena, p-kumarinska kiselina i cimetna kiselina.

Na osnovu kvalitativnih i kvantitativnih rezultata ispitivanih fenolnih jedinjenja kao i na osnovu literaturnih podataka zapaža se velika varijabilnost među vrstama analiziranih gljiva i velika varijabilnost u odnosu na detektovana fenolna jedinjenja vrsta različitog geografskog područja. Varijabilnosti rezultata detektovanih fenolnih jedinjenja mogla bi biti posledica različitih sredinskih faktora (faktora stresa), genetske varijabilnosti, i različitih metodologija ekstrakcije, kao i mogućih promena koje nastaju tokom i nakon vremena prikupljanja uzoraka, uzimajući u obzir enzimatske i oksidativne procese kao i nestabilnost fenolnih jedinjenja.

Sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanim divlje rastućim gljivama upućuje na značajnu lekovitost ovih vrsta koje su veoma široko raspostranjena u našem regionu

#### **Ispitivanje sastava masnih kiselina**

U cilju definisanja sastava masnih kiselina uzorci vrsta *M. gignateus*, *L. sulphureus*, *A. auricula-judae*, *F. hepatica*, *A. mellea*, *C. disseminatus*, *L. controversus*, *L. perlatum*, *M. procera* analizirani su gasnom hromatografijom. Analiza dobijenih profila pokazala je da su linolna, oleinska, palmitinska i stearinska kiselina dominantno prisutne masne kiseline. Na osnovu rezultata svih ispitivanih vrsta dominantna masna kiselina je linolna (C18:2n6c) sa najvećim udelom kod vrste *L. sulphureus* i najmanjim udelom kod vrste *A. auricula-judae*. Kod vrsta *L. perlatum* i *C. disseminatus* detektovana je dokosaheksaenska kiselina (DHA).

Dobijene vrednosti sadržaja masnih kiselina pokazale su veliku varijabilnost. Analizom glavnih komponenti (PCA) ustanovljeno je da najveći doprinos varijabilnosti ispitivanih uzoraka daju sledeće masne kiseline: C18:2n6c, C8:00, C18:1n9t, C20:02, C18:1n9c, C6:00.

Procentualni sadržaj PUFA iznosio je od 34,86% do 70,54%, dok je sadržaj MUFA od 4,66 % do 43,61% a sadržaj SFA od 15,79% do 37,08%. Najveći sadržaj PUFA zabeležen je kod *L. sulphureus* a najmanji kod *A. mellea*, najveći sadržaj SFA zabeležen je kod vrste *F. hepatica* najmanji kod vrste *M. gignateus*. Prikazani rezultati jasno ukazuju na to da analizirane vrste gljiva predstavljaju izvor esencijalnih hranljivih supstanci, tj. nezasićenih masnih kiselina. Shodno rezultatima, ispitane vrste se mogu preporučiti u niskokalorijskim dijetama, a zbog raznolikog sadržaja nezasićenih masnih kiselina, što je od velikog značaja za metabolizam i ljudsko zdravlje, ispitane vrste se mogu u redovnoj ishrani ili kao nutraceutici.

#### **Ispitivanje sadržaja proteina**

Sadržaj proteina u odabranim vrstama određen je standardnom metodom a kretao se u rasponu od 9,72 % do 31,62%. Najveći procenat proteina zabeležen je kod vrste *M. procera*, a najmanji kod vrste *C. disseminatus*.

Elektroforetskom metodom ustanovili smo prisustvo proteinskih frakcija koje su se kretale u opsegu od 5,2 do 91 kDa. Najveći broj detektovanih frakcija imala je vrsta *F. hepatica*.

Diskriminantne analize izvršene na osnovu procentualne zastupljenosti molekulskih masa proteinskih frakcija potvrdile su apsolutnu diferenciranost vrste *F. hepatica*, i određen stepen bliskosti vrsta *M. giganteus*, *L. sulphureus* i *A. mellea*, odnosno udaljenost vrste *M. procera* i *A. auricula-judae* kao i bliskost vrsta *C. disseminatus* i *L. perlatum*.

Iako je veliki je broj studija koje su istraživale bioaktivne proteine u gljivama, malo je dostupnih podataka o vrstama koje su istraživane u ovoj studiji. Naši rezultati govore u prilog tome da su analizirane vrste gljiva bogate različitim proteinskim frakcijama za koje možemo samo da pretpostavimo da su kompatibilne sa već izolovanim aktivnim proteinima iz drugih vrsta gljiva, pre svega zbog nemogućnosti da determinišemo N-terminalne sekvence i izolujemo frakcija za koje pretpostavljamo da imaju određenu biološku aktivnost.

U svim analiziranim gljivama od makro-elemenata najviše je prisutan kalijum koji se kretao u koncentracijama od 17,8 mg/g kod vrste *M. giganteus* do 34,0 mg/g kod vrste *F. hepatica*. Sadržaj kalcijuma se kretao u vrednostima od 0,84 mg/g kod *L. sulphureus* do 23,9 mg/g kod vrste *C. disseminatus*. Posebno je interesantna činjenica da je sadržaj kalcijuma višestruko (dvadeset puta) veći kod vrste *C. disseminatus* u odnosu na ispitane vrste gljiva. Sadržaj magnezijuma se kretao u opsegu od 0,8 mg/g kod vrste *L. sulphureus* do 6,7 mg/g kod vrste *C. disseminatus*. Uočava se trend sadržaja Ca i Mg isti kod većine vrsta gljiva.

Na osnovu rezultata ispitivanja sadržaja mikro-elemenata najviše je prisutan cink koji se kretao u koncentracijama od 34,2 mg/kg kod vrste *F. hepatica* do 193,3 mg/kg kod vrste *C. disseminatus*. Najveći sadržaj mangana i gvožđa zabeležen je takođe kod vrste *C. disseminatus* 188,2mg/kg i 5,9 mg/g dok se sadržaj bakra kretao od 104,7 mg/kg kod *M. procera* do 6,8 mg/kg kod *A. mellea*.

Klaster analiza izvršena na osnovu rezultata sadržaja makro- i mikro-elemenata potvrdila je određen stepen bliskosti kod vrsta: *A. mellea*, *F. hepatica* i *L. controversus*, *L. sulphureus*, *M. giganteus*, odnosno diferenciranosti *M. procera*, i *C. disseminatus* pre svega zbog sadržaja bakra i gvožđa.

## Procena biološke aktivnosti

### Procena antioksidantne aktivnosti

Antioksidantna aktivnost EtOH i Aq ekstrakata ispitivanih vrsta ocenjena merenjem njihove sposobnosti da neutrališu sledeće radikale: DPPH<sup>•</sup>, OH<sup>•</sup>, SOA<sup>•</sup>, NO<sup>•</sup> kao i sposobnost da redukuju [Fe-TPTZ]<sub>3+</sub> primenom FRAP testa.

Dobijeni su sledeći rezultati:

**Sposobnost neutralizacije DPPH<sup>•</sup> radikala:** IC<sub>50</sub> vrednosti ispitanih ekstrakata iznosile od 41,2 µg/ml do 425,9 µg/ml. Najbolju aktivnost pokazao je vodeni ekstrakt *F. hepatica*, dok je najmanju aktivnost pokazao etanolni ekstrakt vrste *A. auricula-judae*. Poređenjem etanolnih i vodenih ekstrakata, može se zaključiti da su vodeni ekstrakti ispoljili bolju aktivnost osim u slučaju *M. giganteus*.

Na osnovu korelacionih koeficijenata hipoteza o dobijenoj aktivnosti kao posledice prisustva fenolnih jedinjenja, odnosno flavonoidnih jedinjenja je potvrđena osim kod ekstrakata vrsta *L. sulphureus*, *M. giganteus* i *C. disseminatus* (kod kojih su zabeleženi mali koeficijenti korelacije što nas

navodi na pretpostavku da u ostvarivanju ove aktivnosti neka druga jedinjenja imaju značajniju ulogu).

**Kapacitet „hvatanja“ HO• radikala:** IC<sub>50</sub> vrednosti ispitanih ekstrakata iznosile su od 0,54 µg/ml do 116 µg/ml. Najveću aktivnost pokazao je *A. mellea*, dok je najmanji potencijal antiradikalske aktivnosti pokazao *L. contraversus*.

Na osnovu utvrđenih korelacija visoka korelacija sa ukupnim fenolima se uočava kod Aq ekstrakta vrste *F. hepatica* i visoka kod Aq *A. mellea* i EtOH *F. hepatica*. Veoma visoka korelacija utvrđena je između sadržaja flavonoida i OH testa kod EtOH ekstrakata *A. mellea* i visoka korelacija kod EtOH ekstrakta *M. giganteus*, *L. perlatum* i Aq ekstrakta *A. mellea*.

**Kapacitet „hvatanja“ O<sub>2</sub>•- radikala:** IC<sub>50</sub> vrednosti ispitanih ekstrakata iznosile su od 0,66 µg/ml do 198,98 µg/ml. Najveću aktivnost pokazao je etanolni ekstrakti vrste *C. disseminatus*, dok je najmanja O<sub>2</sub>•- skevindžer aktivnost nađena kod vodenog ekstrakta *L. perlatum*.

Na osnovu vrednosti korelacija između ukupnog sadržaja fenola i O<sub>2</sub>•-testa veoma visoka korelacija se uočava kod Aq ekstrakta vrste *L. perlatum*, *L. controversus* i *M. giganteus*. Sadržaj ukupnih flavonoida i O<sub>2</sub>•-testa pokazuje veoma visoku korelaciju kod Aq ekstrakti *L. sulphureus*, *L. controversus*, *F. hepatica* i EtOH *F. hepatica*.

**Kapacitet „hvatanja“ NO• radikala:** IC<sub>25</sub> vrednosti ispitanih ekstrakata iznosile su od 11,66 µg/ml do 328,70 µg/ml. Najveću aktivnost pokazali su ekstrakti vodeni ekstrakt *A. auricula-judae*, a najmanji potencijal „hvatanja“ NO• radikala imao je vodeni ekstrakt *A. mellea*.

Utvrđena korelacija između sadržaja ukupnih fenola i flavonoida sa NO testom, pokazuje veoma visoke vrednosti korelacije za ukupne fenole kod Aq ekstrakta vrste *A. auricula-judae*, *M. procera*, EtOH ekstrakta *M. procera*, *L. controversus* i *L. perlatum* za ukupne flavonoide.

**Redukcioni potencijal:** u ispitivanim ekstraktima iznosio je od 52,836 mgAK/g do 3,78 mgAK/g. Najveći redukcioni potencijal imaju ekstrakti etanolni i vodeni ekstrakti *F. hepatica*, dok vodeni ekstrakt vrste *L. controversus* ima najmanji. Poređenjem vrednosti dobijenog redukcionog kapaciteta vodenih i etanolnih ekstrakata možemo zaključiti da ekstrakti vrsta *L. sulphureus*, *M. procera*, *M. giganteus* i *L. perlatum* ne pokazuju signifikantnu razliku u pogledu redukujući kapaciteta dok su kod svih drugih vrsta etanolni ekstrakti ispoljavali bolji redukujući kapacitet u odnosu na vodene, osim kod vrste *A. mellea*.

Veoma visok koeficijent korelacije između sadržaja fenola i FRAP testa pokazuju ekstrakti Aq *A. auricula-judae*, *L. controversus*, i EtOH *A. mellea*. Sadržaj flavonoida je veoma visoko korelisao sa ovim testom kod ekstrakata vrsta Aq *M. procera*, EtOH *M. giganteus* i Aq *L. controversus*.

#### Procena antimikrobne aktivnosti

Procena antimikrobne aktivnosti MeOH ekstrakta na Gram-pozitivne: *S. aureus*, *B. subtilis* i *E. faecalis* i Gram negativne: *S. enteritidis* i *E. coli* i HEX ekstrakata na Gram-pozitivne: *S. aureus*, *B. subtilis* i Gram-negativnu *E. coli* vršena je primenom minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije agar (MBC) dilucionom metodom.

Gram-pozitivne bakterije bile su najosetljivije na metanolne ekstrakte, najniže vrednosti za MIC i MBC zabeležene su za vrstu *F. hepatica* na *S. aureus*.

U "skriningu" na Gram-negativne bakterije: *S. enteritidis* i *E. coli*, prilikom utvrđivanja minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne aktivnosti, najnižu vrednost MIC pokazao je metanolni ekstrakt vrste *F. hepatica*. Metanolni ekstrakti ostalih ispitivanih vrsta ispoljavaju MIC i MBC vrednosti na višim koncentracijama.

Rezultati dobijeni na osnovu analize antibakterijske aktivnosti heksanskih ekstrakata (HEX) gljiva ukazuju na to da su najbolju MIC vrednost u odnosu na Gram-negativne bakterije postigli ekstrakti sledećih vrsta: *M. procera*, *M. giganteus* i *C. disseminatus* pri koncentraciji.

Rezultati ove studije pokazuju da ekstrakti ispitivanih vrsta mogu poslužiti u prevenciji i lečenju bakterijskih infekcija, životinja i ljudi, posebno infekcija sojeva koji pokazuju antibiotsku rezistenciju. Zanimljivo je razmatrati mogućnost primene ovih ekstrakata u proizvodnji hrane, kao mogućih dodataka samom proizvoda u cilju poboljšanja održivosti proizvoda ali i kao mogućih ingredijenata savremenih ambalažnih materijala. Prikazana ostvarena aktivnost trebalo bi u budućnosti da podstakne istraživanja posebno vrsta *F. hepatica*, *C. disseminatus*, *M. giganteus*.

### **Procena antiproliferativne aktivnosti**

Efekat vodenih i etanolnih ekstrakata odabranih vrsta gljiva na rast ćelijske linije MCF7 (humani adenokarcinom dojke pozitivan na estrogenske i progesteronske receptore), ispitan je MTT i SRB testom nakon 24 h i 72 h tretmana pri različitim koncentracijama ekstrakta (od 33,3 µg/ml do 900 µg/ml).

Rezultati ispitivanja antiproliferativne aktivnosti vodenih i etanolnih ekstrakata gljiva pokazali su da ekstrakti svih vrsta ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost, najbolju aktivnost pokazao je Aq ekstrakt *M. procera* nakon 24 h. Na osnovu poređenja rezultata EtOH ekstrakata najbolju aktivnost pokazao je ekstrakt vrste *M. giganteus* nakon 72 h.

Rezultati ostvarene aktivnosti Aq i EtOH ispitivanih vrsta ukazuju na veliku varijabilnost rezultata na osnovu MTT i SRB testa. Statističke analize rezultata antiproliferativne aktivnosti na osnovu MTT i SRB testa ukazuju da se ne uočava značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u pokazanoj aktivnosti između primenjenih testova kod sledećih ekstrakata Aq *F. hepatica* i EtOH *M. giganteus* nakon tretmana od 24h, dok se rezultati aktivnosti nakon 72h statistički značajno ne razlikuju kod: EtOH *L. sulphureus*, Aq *L. controversus*, Aq *M. procera*, EtOH *L. perlatum*, EtOH *C. disseminatus*.

Na osnovu rezultata citotoksičnog efekta heksanskih, etilacetatnih i vodenih frakcija vodenih i etanolnih ekstrakata vrsta: *M. procera*, *M. giganteus*, *C. disseminatus* i *L. sulphureus*, možemo zaključiti da su za dobijene aktivnosti odgovorne familije nepolarnih i srednje polarnih jedinjenja koje ostvaruju posebno bolji efekat citotoksičnosti nakon hroničnog tretmana, osim u slučaju vrste *M. procera* MapAq, kod koje bolji efekat pokazuje ukupni ekstrakt, odnosno polarna jedinjenja sa sinergističkim delovanjem.

Uočene veoma visoke i visoke korelacije između sadržaja fenola, flavonoida i vrednosti IC<sub>50</sub> testova citotoksičnosti ukazuju da postoji značajan uticaj ovih jedinjenja na ostvarivanje citotoksičnog efekta. Ove vrednosti imaju posebno značajnu ulogu za MTT test na 72 h. u odnosu na sadržaj ovih biomolekula, osobito flavonoida SRB test pokazuje značajno manje korelacije posebno na tretmanu od 24h. Na osnovu dobijenih korelacija pretpostavljamo da i neke druge klase biomolekula ostvaruju ulogu kada je upitanju ova bioaktivnost.

Na osnovu PCA analize utvrđeno je sledeće: ukupnoj varijabilnosti rezultata, citotoksične aktivnosti, ponajviše doprinose koncentracije ukupnih fenola, potom  $IC_{50}$  vrednosti DPPH i FRAP testa kada se posmatra prva glavna osa, dok su u odnosu na oblik varijabilnosti značajan efekat pokazali koncentracija ukupnih flavonoida i rezultati MTT testa nakon 72h. Ukoliko varijabilnosti dobijenih vrednosti biološke aktivnosti ekstrakata i dobijene citotoksičnosti MTT testom uključimo vrednosti SRB testa (pritom je isključena vrsta AM na kojoj nisu sprovedeni SRB testovi) rezultati efekta pojedinih parametara na veličinu variranja uzorka su gotovo nepromenjeni, dok se u odnosu na oblik variranja, pored efekta variranja koncentracije ukupnih flavonoida i efekta MTT testa na 24 h, izdvaja i pojačani efekat varijabilnosti  $IC_{25}$  vrednosti NO i  $IC_{50}$  vrednosti  $O_2^{\cdot-}$  testa.

Sumarno, ukupni biopotencijal ispitivanih vrsta na osnovu sprovedenih analiza hemijske karakterizacije i bioloških testova koji su uključili ispitivanje antioksidativnog, antimikrobnog i antiproliferativnog potencijala upućuju opravdanost hipoteze da su odabrane vrste potencijalni izvori nutraceutika. Svakako je potrebno i neophodno nastaviti dalja istraživanja ovih vrsta.

## 7. REFERENCE

- Acharya, K., Samui, K., Rai, M., Dutta, B. B., Acharya, R. (2004). Antioxidant and nitric oxide synthase activation properties of *Auricularia auricula*. *Indian journal of experimental biology*, 42(5), 538-540.
- Al-Fatimi, M., Schröder, G., Kreisel, H., Lindequist, U. (2013). Biological activities of selected basidiomycetes from Yemen. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68(3), 221-226.
- Almendros, G., Martín, F., González-Vila, F. J., Martínez, A. T. (1987). Melanins and lipids in *Lycoperdon perlatum* fruit bodies. *Transactions of the British Mycological Society*, 89(4), 533-537.
- Alves, M. J., Ferreira, I. C., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., Pintado, M. (2012a). A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds.
- Alves, M. J., Ferreira, I. C., Froufe, H. J., Abreu, R. M. V., Martins, A., Pintado, M. (2013). Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of applied microbiology*, 115(2), 346-357.
- Alves, M. J., Ferreira, I. C., Martins, A., Pintado, M. (2012b). Antimicrobial activity of wild mushroom extracts against clinical isolates resistant to different antibiotics. *Journal of applied microbiology*, 113(2), 466-475.
- Armstrong, D. (Ed.). (2002). *Oxidative stress biomarkers and antioxidant protocols* (Vol. 186). Humana Press.
- Arora, S., Goyal, S., Balani, J., Tandon, S. (2013). Enhanced antiproliferative effects of aqueous extracts of some medicinal mushrooms on colon cancer cells. *International journal of medicinal mushrooms*, 15(3).
- Ayaz, F. A., Chuang, L. T., Torun, H., Colak, A., Sesli, E., Presley, J., Glew, R. H. (2011). Fatty acid and amino acid compositions of selected wild-edible mushrooms consumed in Turkey. *International journal of food sciences and nutrition*, 62(04), 328-335.
- Bao, H., You, S. (2011). Molecular characteristics of water-soluble extracts from *Hypsizigus marmoreus* and their in vitro growth inhibition of various cancer cell lines and immunomodulatory function in raw 264.7 cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75(5), 891-898.
- Barreira, J. C., Oliveira, M. B. P., Ferreira, I. C. (2014). Development of a novel methodology for the analysis of ergosterol in mushrooms. *Food Analytical Methods*, 7(1), 217-223.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Sá Morais, J., Ferreira, I. C. (2007a). Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4781-4788.
- Barros, L., Baptista, P., Estevinho, L. M., Ferreira, I. C. (2007b). Effect of fruiting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of *Laccaria* sp. mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(21), 8766-8771.
- Barros, L., Baptista, P., Estevinho, L. M., Ferreira, I. C. (2007c). Bioactive properties of the medicinal mushroom *Leucopaxillus giganteus* mycelium obtained in the presence of different nitrogen sources. *Food chemistry*, 105(1), 179-186.
- Barros, L., Correia, D. M., Ferreira, I. C., Baptista, P., Santos-Buelga, C. (2008a). Optimization of the determination of tocopherols in *Agaricus* sp. edible mushrooms by a normal phase liquid chromatographic method. *Food Chemistry*, 110(4), 1046-1050.
- Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L. M., Ferreira, I. C. (2008c). Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology*, 46(8), 2742-2747.
- Barros, L., Duenas, M., Ferreira, I. C., Baptista, P., Santos-Buelga, C. (2009). Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1076-1079.
- Barros, L., Pereira, C., Ferreira, I. C. (2013). Optimized analysis of organic acids in edible mushrooms from Portugal by ultra fast liquid chromatography and photodiode array detection. *Food Analytical Methods*, 6(1), 309-316.
- Barros, L., Venturini, B. A., Baptista, P., Estevinho, L. M., Ferreira, I. C. (2008b). Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: a comprehensive study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(10), 3856-3862.

- Beattie, K. D., Rouf, R., Gander, L., May, T. W., Ratkowsky, D., Donner, C. D., Tiralongo, E. (2010). Antibacterial metabolites from Australian macrofungi from the genus *Cortinarius*. *Phytochemistry*, 71(8), 948-955.
- Benzie, I. F., Strain, J. J. (1999). [2] 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 concentration. *Methods in enzymology*, 299, 15-27.
- Bobek, P., Galbavy, S. (2000). Effect of pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon. *British journal of biomedical science*, 58(3), 164-168.
- Bogdanović, V (2007) Redoks regulacija ćelijskog ciklusa azot oksidom. Doktorska disertacija, Prirodno matematički fakultet, Novi Sad, Univerzite u Novom Sadu.
- Boik, J. (2001). Natural compounds in cancer therapy. *Aware Journalism*.  
Bok, J. W., Lermer, L., Chilton, J., Klingeman, H. G., & Towers, G. N. (1999). Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry*, 51(7), 891-898.
- Bok, J. W., Lermer, L., Chilton, J., Klingeman, H. G., Towers, G. N. (1999). Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry*, 51(7), 891-898.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.
- Brzin, J., Rogelj, B., Popovič, T., Štrukelj, B., & Ritonja, A. (2000). Clitocyprin, a new type of cysteine proteinase inhibitor from fruit bodies of mushroom *Clitocybe nebularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(26), 20104-20109.
- Byerrum, R., Clarke, D., Lucas, E., Ringler, R., Stevens, J. A., Stock, C. C. (1957). Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other *Holobasidiomycetes*. *Antibiotics & chemotherapy*, 7(1), 1.
- Can, K. H., Kuo, S. H., Lin, C. N. C.-N. 1998. Steroidal constituents of *Ganoderma applanatum* and *Ganoderma neo-japonicum*. *J. Nat. Prod*, 61, 1421-1422.
- Cao, Q. Z., Lin, Z. B. (2006). *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide inhibits the growth of vascular endothelial cell and the induction of VEGF in human lung cancer cell. *Life Sciences*, 78(13), 1457-1463.
- Carocho, M., CFR Ferreira, I. (2013). The role of phenolic compounds in the fight against cancer—a review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 13(8), 1236-1258.
- Carr, A. C., McCall, M. R., Frei, B. (2000). Oxidation of ldl by myeloperoxidase and reactive nitrogen species reaction pathways and antioxidant protection. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(7), 1716-1723.
- Cassinelli, G., Lanzi, C., Pensa, T., Gambetta, R. A., Nasini, G., Cuccuru, G., Zunino, F. (2000). Clavilactones, a novel class of tyrosine kinase inhibitors of fungal origin. *Biochemical pharmacology*, 59(12), 1539-1547.
- Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews*, 73(3), 203-266.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3), 178-182.
- Chang, K. L., Kung, M. L., Chow, N. H., Su, S. J. (2004). Genistein arrests hepatoma cells at G2/M phase: involvement of ATM activation and upregulation of p21 waf1/cip1 and Wee1. *Biochemical pharmacology*, 67(4), 717-726.
- Chang, S. T. (2008). Overview of mushroom cultivation and utilization as functional foods. *Mushrooms as functional foods*, 1-33.
- Chatterjee, S., Biswas, G., Basu, S. K., Acharya, K. (2011). Antineoplastic effect of mushrooms: a review.
- Cheeseman, K. H., Beavis, A., Esterbauer, H. (1988). Hydroxyl-radical-induced iron-catalysed degradation of 2-deoxyribose. Quantitative determination of malondialdehyde. *Biochem. J*, 252, 649-653.
- Chen, G., Luo, Y. C., Ji, B. P., Li, B., Su, W., Xiao, Z. L., Zhang, G. Z. (2011). Hypocholesterolemic effects of *Auricularia auricula* ethanol extract in ICR mice fed a cholesterol-enriched diet. *Journal of food science and technology*, 48(6), 692-698.
- Chen, J. N., de Mejia, E. G., Wu, J. S. B. (2011). Inhibitory effect of a glycoprotein isolated from golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus*) on the lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction in RAW 264.7 macrophage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(13), 7092-7097.
- Chen, J. N., Wang, Y. T., Wu, J. S. B. (2009). A glycoprotein extracted from golden oyster mushroom *Pleurotus citrinopileatus* exhibiting growth inhibitory effect against U937 leukemia cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(15), 6706-6711.

- Cheung, L. M., Cheung, P. C., Ooi, V. E. (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, 81(2), 249-255.
- Cheung, P. C. K. (2010). The nutritional and health benefits of mushrooms. *Nutrition Bulletin*, 35(4), 292-299.
- Chihara, G. (1981). The antitumor polysaccharide Lentinan: an overview. *Manipulation of host defence mechanisms*. *Excerpta Med, Int Congr Ser*, 576.
- Chiu, S. W., Wang, Z. M., Leung, T. M., Moore, D. (2000). Nutritional value of Ganoderma extract and assessment of its genotoxicity and anti-genotoxicity using comet assays of mouse lymphocytes. *Food and chemical toxicology*, 38(2), 173-178.
- Choi, Y. H., Lee, W. H., Park, K. Y., Zhang, L. (2000). p53-independent Induction of p21 (WAF1/CIP1), Reduction of Cyclin B1 and G2/M Arrest by the Isoflavone Genistein in Human Prostate Carcinoma Cells. *Cancer science*, 91(2), 164-173.
- Choi, Y., Lee, S. M., Chun, J., Lee, H. B., Lee, J. (2006). Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry*, 99(2), 381-387.
- Chu, K. T., Xia, L., Ng, T. B. (2005). Pleurostrin, an antifungal peptide from the oyster mushroom. *Peptides*, 26(11), 2098-2103.
- Ciric, L., Tymon, A., Zaura, E., Lingström, P., Stauder, M., Papetti, A., Spratt, D. (2011). In vitro assessment of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) extract for its antigingivitis activity. *BioMed Research International*, 2011.
- Collins, R. A., Ng, T. B. (1997). Polysaccharopeptide from *Coriolus versicolor* has potential for use against human immunodeficiency virus type 1 infection. *Life Sciences*, 60(25), PL383-PL387.
- Conlon, J. M., Eriksson, B., Grimelius, L., Oberg, K., & Thim, L. (1987). Characterization of three peptides derived from prosomatostatin [prosomatostatin-(1-63)-,-(65-76)-and-(79-92)-peptides] in a human pancreatic tumour. *Biochem. J*, 248, 123-127.
- Cook, N. C., Samman, S. (1996). Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of nutritional biochemistry*, 7(2), 66-76.
- Cooper, G. M. (1993). *The cancer book: a guide to understanding the causes, prevention, and treatment of cancer*. Jones & Bartlett Learning.
- Courtecuisse, R., Duhem, B. (1995). *Mushrooms toadstools of Britain and Europe*. HarperCollins.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H. (Eds.). (2008). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. John Wiley & Sons.
- Dadachova, E., Bryan, R. A., Huang, X., Moadel, T., Schweitzer, A. D., Aisen, P., Casadevall, A. (2007). Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *PloS one*, 2(5), e457.
- Dai, Y. C., Yang, Z. L., Cui, B. K., Yu, C. J., Zhou, L. W. (2009). Species diversity and utilization of medicinal mushrooms and fungi in China (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 11(3).
- Day, A. J., Cañada, F. J., Díaz, J. C., Kroon, P. A., Mclauchlan, R., Faulds, C. B., Williamson, G. (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS letters*, 468(2), 166-170.
- De Silva, D. D., Rapior, S., Fons, F., Bahkali, A. H., Hyde, K. D. (2012). Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: an approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action. *Fungal Diversity*, 55(1), 1-35.
- Deacon, J. (2006). *Fungal Biology*. 4th edition. Oxford: Blackwell Publishing
- DeFelice, S. L. (1995). The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. *Trends in Food Science & Technology*, 6(2), 59-61.
- Dewick, P.M. (2009): *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*, John Wiley & Sons Ltd, Chippingham,UK.
- Diez, V. A., Alvarez, A. (2001). Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. *Food Chemistry*, 75(4), 417-422.
- Diez, V. A., Alvarez, A. (2001). Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. *Food chemistry*, 75(4), 417-422.
- Dulger, B. (2005). Antimicrobial activity of ten Lycoperdaceae. *Fitoterapia*, 76(3), 352-354.
- Dulger, B., Ergul, C. C., Gucin, F. (2002). Antimicrobial activity of the macrofungus *Lepista nuda*. *Fitoterapia*, 73(7), 695-697.
- Duraković, S. (1996). *Primijenjena mikrobiologija. Prehrambeno tehnološki inženjering*, Zagreb, 371.



- El Enshasy, H. A., Hatti-Kaul, R. (2013). Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. *Trends in biotechnology*, 31(12), 668-677.
- Espin, J. C., Soler-Rivas, C., Wichers, H. J. (2000). Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 648-656.
- Ferreira, I. C., Barros, L., Abreu, R. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16(12), 1543-1560.
- Ferreira, I., A Vaz, J., Vasconcelos, M. H., Martins, A. (2010). Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 10(5), 424-436.
- Frankel, E. N., Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925-1941.
- Fu, H., Shieh, D., Ho, C., (2002). Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. *Journal of food lipids*, 9(1), 35-43.
- Galeša, K., Thomas, R. M., Kidrič, M., Pain, R. H. (2004). Clitocyprin, a new cysteine proteinase inhibitor, is monomeric: impact on the mechanism of folding. *Biochemical and biophysical research communications*, 324(2), 576-578.
- Gao, J. M., Yang, X., Wang, C. Y., Liu, J. K. (2001). Armillaramide, a new sphingolipid from the fungus *Armillaria mellea*. *Fitoterapia*, 72(8), 858-864.
- Gbolagade, J., Ajayi, A., Oku, I., Wankasi, D. (2006). Nutritive value of common wild edible mushrooms from southern Nigeria. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 1(1), 16-21.
- Gezer, K., Duru, M. E., Kivrak, I., Turkoglu, A., Mercan, N., Turkoglu, H., Gulcan, S. (2006). Free-radical scavenging capacity and antimicrobial activity of wild edible mushroom from Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 5(20).
- Giovannini, I. S. (2006). Cultivated Basidiomycetes as a Source of New Products: In Vitro Cultivation Development, Selection of Strains Resistant to *Trichoderma Viride*, Search for New Active Compounds, Factors Influencing Plasticity in *Grifola Frondosa* (Doctoral dissertation, Université de Neuchâtel).
- Giri, S., Biswas, G., Pradhan, P., Mandal, S. C., Acharya, K. (2012). Antimicrobial activities of basidiocarps of wild edible mushrooms of West Bengal, India. *International Journal of PharmTech Research*, 4(4), 1554-1560.
- Girjal, V., Neelagund, S., Krishnappa, M. (2011). *Ganoderma lucidum*: a source for novel bioactive lectin. *Protein and peptide letters*, 18(11), 1150-1157.
- Gonindard, C., Bergonzi, C., Denier, C., Sergheraert, C., Klaebe, A., Chavant, L., Hollande, E. (1997). Synthetic hispidin, a PKC inhibitor, is more cytotoxic toward cancer cells than normal cells in vitro. *Cell biology and toxicology*, 13(3), 141-153.
- Gould, K. S., Lister, C., Andersen, Ø. M., Markham, K. R. (2006). Flavonoid functions in plants. *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*, 397-441.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N] nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry*, 126(1), 131-138.
- Greer, F. R., Marshall, S. (1989). Bone mineral content, serum vitamin D metabolite concentrations, and ultraviolet B light exposure in infants fed human milk with and without vitamin D 2 supplements. *The Journal of pediatrics*, 114(2), 204-212.
- Gu, C. Q., Li, J. W., Chao, F., Jin, M., Wang, X. W., Shen, Z. Q. (2007). Isolation, identification and function of a novel anti-HSV-1 protein from *Grifola frondosa*. *Antiviral research*, 75(3), 250-257.
- Gu, Y. H., & 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. *Oncology reports*, 15(2), 417-423
- Guarro, J., Gené, J., Stchigel, A. M. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clinical microbiology reviews*, 12(3), 454-500.
- Guo, Y., Wang, H., Ng, T. B. (2005). Isolation of trichogin, an antifungal protein from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides*, 26(4), 575-580.
- Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and biophysical research communications*, 393(4), 561-564.
- Gutteridge, J., Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 136-147.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), 312-322.

- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition reviews*, 70(5), 257-265.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007). Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. *Free radicals in biology and medicine*, 4.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, 186, 1.
- Han, C. H., Zhang, G. Q., Wang, H. X., Ng, T. B. (2010). Schizolysin, a hemolysin from the split gill mushroom *Schizophyllum commune*. *FEMS microbiology letters*, 309(2), 115-121.
- Han, S. S. R., Cho, C. K., Lee, Y. W., Yoo, H. S. (2009). Antimetastatic and immunomodulating effect of water extracts from various mushrooms. *Journal of acupuncture and meridian studies*, 2(3), 218-227.
- Hardman, W. E. (2004). (n-3) fatty acids and cancer therapy. *The Journal of nutrition*, 134(12), 3427S-3430S.
- Hatvani, N. (2001). Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(1), 71-74.
- Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1• 5 million species estimate revisited. *Mycological research*, 105(12), 1422-1432.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., Pegler D.N. (1995). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi*. CAB International, Wallingford, Oxon, United Kingdom.
- He, J. B., Tao, J., Miao, X. S., Bu, W., Zhang, S., Dong, Z. J., Liu, J. K. (2015). Seven new drimane-type sesquiterpenoids from cultures of fungus *Laetiporus sulphureus*. *Fitoterapia*, 102, 1-6.
- Hearst, R., Nelson, D., McCollum, G., Millar, B. C., Maeda, Y., Goldsmith, C. E., Moore, J. E. (2009). An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 15(1), 5-7.
- Heleno, S. A., Barros, L., Martins, A., Queiroz, M. J. R., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. (2012a). Fruiting body, spores and in vitro produced mycelium of *Ganoderma lucidum* from Northeast Portugal: A comparative study of the antioxidant potential of phenolic and polysaccharidic extracts. *Food Research International*, 46(1), 135-140.
- Heleno, S. A., Barros, L., Martins, A., Queiroz, M. J. R., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. (2012b). Phenolic, polysaccharidic, and lipidic fractions of mushrooms from northeastern Portugal: Chemical compounds with antioxidant properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(18), 4634-4640.
- Heleno, S. A., Barros, L., Sousa, M. J., Martins, A., & Ferreira, I. C. (2010). Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 119(4), 1443-1450.
- Heleno, S. A., Barros, L., Sousa, M. J., Martins, A., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. (2011). Targeted metabolites analysis in wild *Boletus* species. *LWT-Food Science and Technology*, 44(6), 1343-1348.
- Heleno, S. A., Ferreira, I. C., Calhelha, R. C., Esteves, A. P., Martins, A., Queiroz, M. J. R. (2014a). Cytotoxicity of *Coprinopsis atramentaria* extract, organic acids and their synthesized methylated and glucuronate derivatives. *Food Research International*, 55, 170-175.
- Heleno, S. A., Ferreira, I. C., Ćirić, A., Glamočlija, J., Martins, A., Queiroz, M. J. R., Soković, M. (2014b). *Coprinopsis atramentaria* extract, its organic acids, and synthesized glucuronated and methylated derivatives as antibacterial and antifungal agents. *Food & function*, 5(10), 2521-2528.
- Heleno, S. A., Ferreira, I. C., Esteves, A. P., Ćirić, A., Glamočlija, J., Martins, A., Queiroz, M. J. R. (2013a). Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. *Food and Chemical Toxicology*, 58, 95-100.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R., Ferreira, I. C. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food chemistry*, 173, 501-513.
- Heleno, S. A., Stojković, D., Barros, L., Glamočlija, J., Soković, M., Martins, A., Ferreira, I. C. (2013b). A comparative study of chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Morchella esculenta* (L.) Pers. from Portugal and Serbia. *Food Research International*, 51(1), 236-243.
- Henderson, B. E., Feigelson, H. S. (2000). Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(3), 427-433.
- Hill, R. A., Connolly, J. D. (2015). Triterpenoids. *Natural product reports*.
- Hirasawa, M., Shouji, N., Neta, T., Fukushima, K., Takada, K. (1999). Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.(Shiitake, an edible mushroom). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11(2), 151-157.
- Hobbs, C., 1995. *Medicinal mushrooms*, Botanica press, 10226, Empire Grade, Santa Cruz, CA, 95060
- Houghton, P., Fang, R., Techatanawat, I., Steventon, G., Hylands, P. J., Lee, C. C. (2007). The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*, 42(4), 377-387.

- Hrubik, J. D., Kaišarević, S. N., Glišić, B. D., Jovin, E. Đ., Mimica-Dukić, N. M., Kovačević, R. Z. (2012). *Myrtus comunis* and *Eucalyptus camaldulensis* cytotoxicity on breast cancer cells. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, (123), 65-73.
- Hsiao, Y. M., Huang, Y. L., Tang, S. C., Shieh, G. J., Lai, J. Y., Wang, P. H., Ko, J. L. (2008). Effect of a fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae* on cell cycle and interferon-gamma production through phosphatidylinositol 3-kinase signal pathway. *Process Biochemistry*, 43(4), 423-430.
- Hu, D. D., Zhang, R. Y., Zhang, G. Q., Wang, H. X., Ng, T. B. (2011). A laccase with antiproliferative activity against tumor cells from an edible mushroom, white common *Agrocybe cylindracea*. *Phytomedicine*, 18(5), 374-379.
- Hua, Z., Zhen-Yu, W., Xin, Y., Lin, Y., Li-Li, Z., Hai-Na, B., & Xiao-Yu, L. (2014). Protective effects of sulfated derivatives of polysaccharides extracted from *Auricularia auricular* on hematologic injury induced by radiation. *International journal of radiation research*, 12(2), 99-111.
- Hur, J. M., Yang, C. H., Han, S. H., Lee, S. H., You, Y. O., Park, J. C., Kim, K. J. (2004). Antibacterial effect of *Phellinus linteus* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*, 75(6), 603-605.
- Hwang, H. S., & Yun, J. W. (2010). Hypoglycemic effect of polysaccharides produced by submerged mycelial culture of *Laetiporus sulphureus* on streptozotocin-induced diabetic rats. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(1), 173-181.
- Isanga, J., Zhang, G. N. (2007). Biologically active components and nutraceuticals in peanuts and related products: Review. *Food Reviews International*, 23(2), 123-140.
- Ishikawa, N. K., Kasuya, M. C. M., Vanetti, M. C. D. (2001). Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. *Brazilian journal of Microbiology*, 32(3), 206-210.
- Isiloglu, M., Yilmaz, F. i Merdivan, M. (2001). Concentrations of trace elements in wild edible mushrooms. *Food Chemistry*, 73(2), 169-175.
- Israilides, C., Kletsas, D., Arapoglou, D., Philippoussis, A., Pratsinis, H., Ebringerová, A., Harding, S. E. (2008). In vitro cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*. *Phytomedicine*, 15(6), 512-519.
- Ivanova, T. S., Krupodorova, T. A., Barshteyn, V. Y., Artamonova, A. B., & Shlyakhovenko, V. A. (2014). Anticancer substances of mushroom origin. *Experimental oncology*, 36(2), 58-66.
- Jacobs, F. (1985). *Breakthrough: The True Story of Penicillin*. Dodd Mead.
- Jarzynska, G., Gućia, M., Kojta, A. K., Rezulak, K., Falandyś, J. (2011). Profile of trace elements in Parasol Mushroom (*Macrolepiota procera*) from Tucholskie Forest. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 46(8), 741-751.
- Jasinghe, V. J., Perera, C. O. (2005). Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D 2 by UV irradiation. *Food chemistry*, 92(3), 541-546.
- Jaworska, G., Bernaś, E., Mickowska, B. (2011). Effect of production process on the amino acid content of frozen and canned *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Food chemistry*, 125(3), 936-943.
- Jayakumar, T., Thomas, P. A., Sheu, J. R., Geraldine, P. (2011). In-vitro and in-vivo antioxidant effects of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Food research international*, 44(4), 851-861.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2), 69-90.
- Jeurink, P. V., Noguera, C. L., Savelkoul, H. F., Wichers, H. J. (2008). Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology*, 8(8), 1124-1133.
- Jiang, J., Grieb, B., Thyagarajan, A., Sliva, D. (2008). Ganoderic acids suppress growth and invasive behavior of breast cancer cells by modulating AP-1 and NF-κB signaling. *International journal of molecular medicine*, 21(5), 577-584.
- Kaisarevic, S., Andric, N., Bobic, S., Trickovic, J., Teodorovic, I., Vojinovic-Miloradov, M., Kovacevic, R. Z. (2007). Detection of dioxin-like contaminants in soil from the area of oil refineries in Vojvodina region of Serbia. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 79(4), 422-426.
- Kalač, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food chemistry*, 113(1), 9-16.
- Kalač, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food chemistry*, 113(1), 9-16.
- Kalač, P. (2013). A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(2), 209-218.
- Kalač, P., Svoboda, L. (2000). A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 69(3), 273-281

- Kalogeropoulos, N., Yanni, A. E., Koutrotsios, G., Aloupi, M. (2013). Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the island of Lesbos, Greece. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 378-385.
- Kalyoncu, F., Ergönül, B., Yildiz, H., Kalmış, E., Solak, H. (2010a). Chemical composition of four wild edible mushroom species collected from southwest Anatolia. *Gazi University Journal of Science*, 23(4), 375-379.
- Kalyoncu, F., Oskay, M., Lelley, J. I., Buswell, J. A. (2008). Antimicrobial activities of four wild mushroom species collected from Turkey. In *Mushroom biology and mushroom products. Proceedings of the Sixth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, Bonn, Germany, 29 September-3 October, 2008. (pp. 31-35). GAMU GmbH, Institut für Pilzforschung.
- Kalyoncu, F., Oskay, M., Saglam, H., Erdogan, T. F., Tamer, A. U. (2010b). Antimicrobial and antioxidant activities of mycelia of 10 wild mushroom species. *Journal of medicinal food*, 13(2), 415-419.
- Kandaswami, C., Middleton, E. (1997). Flavonoids as antioxidants. *Natural antioxidants. Chemistry, health effects and practical applications*, 174-194.
- Karaman, M (2009). Autohtone vrste Basidiomycotina potencijalni resursi biološki aktivnih materija. Doktorska disertacija, Prirodno matematički fakultet, Novi Sad, Univerzitet u Novom Sad
- Karaman, M., (2012). Lekovitost autohtonih makrogljiva. Zadužbina Andrejević, Beograd
- Karaman, M., Jovin, E., Malbaša, R., Matavuly, M., Popović, M. (2010). Medicinal and edible lignicolous fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agents. *Phytotherapy research*, 24(10), 1473-1481.
- Karaman, M., Kaišarević, S., Somborski, J., Kebert, M., Matavulj, M. (2009a). Biological activity of lignicolous fungi *Meripilus giganteus* (Pers.: Pers.) Karst.. *Archives of Biological Sciences*, 61(4), 853-861
- Karaman, M., Matavuly, M. (2005 ). Heavy metals and macroelements in some macro-fungi of national park Frushka gora (Serbia). In *Proc. 8th ISIRR-International Symposium on Interdisciplinary Regional Research (H, RO, SCG), EEP-34, April 19th–21st (pp. 1-10)*.
- Karaman, M., Mimica-Dukic, N., Knezevic, P., Svircev, Z., Matavuly, M. (2009). Antibacterial properties of selected lignicolous mushrooms and fungi from northern Serbia. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 11(3).
- Karaman, M., Mimica-Dukic, N., Matavulj, M. (2009b). Lignicolous fungi from northern Serbia as natural sources of antioxidants. *Open Life Sciences*, 4(3), 387-396.
- 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. *International journal of food sciences and nutrition*, 65(3), 311-319.
- Karaman, M., Stahl, M., Vulic, J., Vesic, M., Canadanovic-Brunet, J. (2013). Wild-growing lignicolous mushroom species as sources of novel agents with antioxidative and antibacterial potentials. *International journal of food sciences and nutrition*, 65(3), 311-319.
- Kavishree, S., Hemavathy, J., Lokesh, B. R., Shashirekha, M. N., & Rajarathnam, S. (2008). Fat and fatty acids of Indian edible mushrooms. *Food Chemistry*, 106(2), 597-602.
- Khatua, S., Paul, S., Acharya, K. (2013). Mushroom as the potential source of new generation of antioxidant: a review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 6(5), 496-505.
- Kho, Y. S., Vikineswary, S., Abdullah, N., Kuppasamy, U. R., Oh, H. I. (2009). Antioxidant capacity of fresh and processed fruit bodies and mycelium of *Auricularia auricula-judae* (Fr.) Quél. *Journal of medicinal food*, 12(1), 167-174.
- Kim, D. S., Jeong, H. J., Bhat, K. P., Park, S. Y., Kang, S. H., Yoo, E. H., i Krueger, R. J. (2000). Aromatase and sulfatase inhibitors from *Lepiota americana*. *Planta medica*, 66(1), 78-79.
- Kim, K. H., Noh, H. J., Lee, K. R. (2014). Article: Cytotoxic Ergosterol Derivatives from the Mushroom *Naematoloma fasciculare*. *Natural Product Sciences*, 20(2), 76-79.
- Klaus, A., Kozarski, M., Niksic, M., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Stefanoska, I., & Van Griensven, L. J. (2013). The edible mushroom *Laetiporus sulphureus* as potential source of natural antioxidants. *International journal of food sciences and nutrition*, 64(5), 599-610.
- Kobayashi, Y., Kawagishi, H. (2014). Fungal Lectins: A Growing Family. In *Lectins (pp. 15-38)*. Springer New York.
- Kodama, N., Komuta, K., Nanba, H. (2003). Effect of Maitake (*Grifola frondosa*) D-Fraction on the activation of NK cells in cancer patients. *Journal of medicinal food*, 6(4), 371-377.
- Komali, A. S., Zheng, Z., Shetty, K. (1999). A mathematical model for the growth kinetics and synthesis of phenolics in oregano (*Origanum vulgare*) shoot cultures inoculated with *Pseudomonas* species. *Process Biochemistry*, 35(3), 227-235.

- Kovačević, I. (2015). Prirodni stiril-laktoni, njihovi derivati i analozi kao potencijalni antitumorski agensi: dizajn, sinteza i sar ispitivanja. Doktorska disertacija, Prirodno matematički fakultet, Novi Sad, Univerzite u Novom Sadu.
- Krstić, B., Marjanović, N. (1998): Instrumentalne metode u biološkim istraživanjima. Univerzitet u Novom Sadu. Tehnološki i Prirodno-matematički fakultet. Novi Sad. 74-77.
- Lam, S. K., Ng, T. B. (2001a). Hypsin, a novel thermostable ribosome-inactivating protein with antifungal and antiproliferative activities from fruiting bodies of the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*. *Biochemical and biophysical research communications*, 285(4), 1071-1075.
- Lam, S. K., Ng, T. B. (2001b). First simultaneous isolation of a ribosome inactivating protein and an antifungal protein from a mushroom (*Lyophyllum shimeji*) together with evidence for synergism of their antifungal effects. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 393(2), 271-280.
- Laranjinha, J. A., Almeida, L. M., Madeira, V. M. (1994). Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochemical pharmacology*, 48(3), 487-494.
- Leal, A. R., Barros, L., Barreira, J. C., Sousa, M. J., Martins, A., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. (2013). Portuguese wild mushrooms at the "pharma-nutrition" interface: Nutritional characterization and antioxidant properties. *Food Research International*, 50(1), 1-9.
- Lee, J. S., Lee, M. S., Oh, W. K., Sul, J. Y. (2009). Fatty acid synthase inhibition by amentoflavone induces apoptosis and antiproliferation in human breast cancer cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(8), 1427-1432.
- Lee, S. J., Yeo, W. H., Yun, B. S., Yoo, I. D. (1999). Isolation and sequence analysis of new peptaibol, boletusin, from *Boletus* spp. *Journal of Peptide Science*, 5(8), 374-378.
- León-Guzmán, M. F., Silva, I., Lopez, M. G. (1997). Proximate chemical composition, free amino acid contents, and free fatty acid contents of some wild edible mushrooms from Querétaro, México. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(11), 4329-4332.
- Li, C. H., Chen, P. Y., Chang, U. M., Kan, L. S., Fang, W. H., Tsai, K. S., Lin, S. B. (2005). Ganoderic acid X, a lanostanoid triterpene, inhibits topoisomerases and induces apoptosis of cancer cells. *Life sciences*, 77(3), 252-265.
- Li, F., Wen, H., Zhang, Y., Aa, M., i Liu, X. (2011). Purification and characterization of a novel immunomodulatory protein from the medicinal mushroom *Trametes versicolor*. *Science China Life Sciences*, 54(4), 379-385.
- Li, Y. P., Wu, K. F., Liu, Y. (2005). [Protective effect of *Armillaria mellea* polysaccharide on mice bone marrow cell damage caused by cyclophosphamide]. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*, 30(4), 283-286.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T. H., Jülich, W. D. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(3), 285-299.
- Liu, F., Fung, M. C., Ooi, V. E. C., Chang, S. T. (1996). Induction in the mouse of gene expression of immunomodulating cytokines by mushroom polysaccharide-protein complexes. *Life sciences*, 58(21), 1795-1803.
- Liu, F., Ooi, V. E. C., Chang, S. T. (1995). Anti-tumour components of the culture filtrates from *Tricholoma* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(5), 486-490.
- Longvah, T., Deosthale, Y. G. (1998). Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. *Food chemistry*, 63(3), 331-334.
- Lou, Z., Wang, H., Rao, S., Sun, J., Ma, C., Li, J. (2012). p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control*, 25(2), 550-554.
- Lowe, S. W., Lin, A. W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3), 485-495.
- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2046-2056.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
- Manjunathan, J., Kaviyaran, V. (2011). Nutrient composition in wild and cultivated edible mushroom, *Lentinus tuberregium* (Fr.) Tamil Nadu., India. *International Food Research Journal*, 18(2).
- Manzi, P., Aguzzi, A., Pizzoferrato, L. (2001). Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food chemistry*, 73(3), 321-325.

- Mattila, P., Lampi, A. M., Ronkainen, R., Toivo, J., Piironen, V. (2002). Sterol and vitamin D<sub>2</sub> contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, 76(3), 293-298.
- Mena, S., Ortega, A., Estrela, J. M. (2009). Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1), 36-44.
- Mendil, D., Uluözlü, O. D., Hasdemir, E., Caglar, A. (2004). Determination of trace elements on some wild edible mushroom samples from Kastamonu, Turkey. *Food Chemistry*, 88(2), 281-285.
- Mendil, D., Uluözlü, Ö. D., Tüzen, M., Hasdemir, E., Sarı, H. (2005). Trace metal levels in mushroom samples from Ordu, Turkey. *Food Chemistry*, 91(3), 463-467.
- Merlini, L., Nasini, G., Scaglioni, L., Cassinelli, G., Lanzi, C. (2000). Structure elucidation of clavilactone D: an inhibitor of protein tyrosine kinases. *Phytochemistry*, 53(8), 1039-1041.
- Miles, P. G., & Chang, S. T. (2004). *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. CRC press.
- Milovanovic, I., Misan, A., Saric, B., Kos, J., Mandic, A., Simeunovic, J., Kovac, 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, CEFood2012*.
- Misieki M, Williams J, Schmich K, Hüttel W, Merfort I, Salomon C, Aldrich CA, Hoffmeister D (2009) Structure and cytotoxicity of Arnaniol and related fungal sesquiterpene aryl esters. *Journal of natural products* 72:1888–1891
- Misieki, M., Hoffmeister, D. (2012). Sesquiterpene aryl ester natural products in North American *Armillaria* species. *Mycological Progress*, 11(1), 7-15.
- Mizuno, T. (1995). Bioactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushroom fungi. *Food Reviews International*, 11(1), 5-21.
- Mizuno, T. (1999). The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1(1).
- Mizuno, T. (2002). Medicinal properties and clinical effects of culinary-medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill (Agaricomycetidae)(review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4(4).
- Mizuno, T., Saito, H., Nishitoba, T., Kawagishi, H. (1995). Antitumor-active substances from mushrooms. *Food Reviews International*, 11(1), 23-61.
- Mizuno, T., Wang, G., Zhang, J., Kawagishi, H., Nishitoba, T., Li, J. (1995). Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: bioactive substances and medicinal effects. *Food Reviews International*, 11(1), 151-166.
- Mizushima, Y., Takahashi, N., Hanashima, L., Koshino, H., Esumi, Y., Uzawa, J., Sakaguchi, K. (1999). Lucidenic acid O and lactone, new terpene inhibitors of eukaryotic DNA polymerases from a basidiomycete, *Ganoderma lucidum*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 7(9), 2047-2052.
- Mlinarič, A., Kac, J., Fatur, T., Filipič, M. (2004). Anti-genotoxic activity of the mushroom *Lactarius vellereus* extract in bacteria and in mammalian cells in vitro. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59(3), 217-221.
- Moller, J. K., Madsen, H. L., Aaltonen, T., Skibsted, L. H. (1999). Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food Chemistry*, 64(2), 215-219.
- Moradali, M. F., Mostafavi, H., Ghods, S., Hedjaroude, G. A. (2007). Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *International Immunopharmacology*, 7(6), 701-724.
- Morishita, H., Ohnishi, M. (2001). Absorption, metabolism and biological activities of chlorogenic acids and related compounds. *Studies in natural products chemistry*, 25, 919-953.
- Mrđen, D. (2005): Ispitivanje antioksidantne aktivnosti odabranih lignikolnih gljiva – diplomski rad. Univerzitet u Novom Sadu. Prirodno – matematički fakultet. Departman za biologiju i ekologiju. Novi Sad.
- Mshandete, A. M., Cuff, J. (2008). Proximate and nutrient composition of three types of indigenous edible wild mushrooms grown in Tanzania and their utilization prospects.
- Muszynska, B., Sulkowska-Ziaja, K., Wolkowska, M., Ekiert, H. (2011). Chemical, pharmacological, and biological characterization of the culinary-medicinal honey mushroom, *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm.(Agaricomycetidae): a review. *International journal of medicinal mushrooms*, 13(2).
- Narbe, G., Lindequist, U., Teuscher, E., Franke, P., Vainiotalo, P., Basner, R. (1991). [The chemistry of immunosuppressive acting fractions of *Meripilus giganteus* (PERS ex. FR.) KARST., the giant spore]. *Die Pharmazie*, 46(10), 738-740.

- Ng, 1998 A review of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes: Polyporaceae). *General Pharmacology: The Vascular System*, 30(1), 1-4.
- Ng, T. B., Lam, Y. W., Wang, H. (2003). Calcaelin, a new protein with translation-inhibiting, antiproliferative and antimutagenic activities from the mosaic puffball mushroom *Calvatia caelata*. *Planta medica*, 69(3), 212-217.
- Ng, T. B., Wang, H. (2004a). Adustin, a small translation-inhibiting polypeptide from fruiting bodies of the wild mushroom *Polyporus adusta*. *Peptides*, 25(4), 689-692.
- Ng, T. B., Wang, H. X. (2004b). Flammin and velin: new ribosome inactivating polypeptides from the mushroom *Flammulina velutipes*. *Peptides*, 25(6), 929-933.
- Ngai, P. H., Ng, T. B. (2003a). Lentin, a novel and potent antifungal protein from shitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. *Life Sciences*, 73(26), 3363-3374.
- Ngai, P. H., Ng, T. B. (2004). A ribonuclease with antimicrobial, antimutagenic and antiproliferative activities from the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Peptides*, 25(1), 11-17.
- Ngai, P. H., Wang, H. X., Ng, T. B. (2003b). Purification and characterization of a ubiquitin-like peptide with macrophage stimulating, antiproliferative and ribonuclease activities from the mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Peptides*, 24(5), 639-645.
- Ngai, P. H., Zhao, Z., Ng, T. B. (2005). Agrocybin, an antifungal peptide from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Peptides*, 26(2), 191-196.
- Nishikimi, M., Rao, N. A., Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and biophysical research communications*, 46(2), 849-854.
- Novaković, A. R., Karaman, M. A., Milovanović, I. L., Belović, M. M., Rašeta, M. J., Radusin, T. I., & Ilić, N. M. (2015). Edible mycorrhizal species *Lactarius controversus* Pers. 1800 as a source of antioxidant and cytotoxic agents. *Hemijska industrija*, (00), 17-17.
- Nowacka, N., Nowak, R., Drozd, M., Olech, M., Los, R., Malm, A. (2014). Analysis of phenolic constituents, antiradical and antimicrobial activity of edible mushrooms growing wild in Poland. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 689-694.
- Nwachukwu, E., i Uzoeto, H. O. (2010). Antimicrobial activity of some local mushrooms on pathogenic isolates. *J Med Plants Res*, 4, 2460-2465.
- Obuchi, T., Kondoh, H., Watanabe, N. A. O. N. A. R. U., Tamai, M., Omura, S., Yang, J. S., & Liang, X. T. (1990). Armillaric acid, a new antibiotic produced by *Armillaria mellea*. *Planta medica*, 56(2), 198-201.
- Ochoa-Zarzosa, A., Vázquez-Garciduenas, M. S., Robinson-Fuentes, V. A., Vázquez-Marrufo, G. (2011). Antibacterial and cytotoxic activity from basidiocarp extracts of the edible mushroom *Lactarius indigo* (Schw.) Fr. (Russulaceae). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(2), 281-288.
- Ojemann, L. M., Nelson, W. L., Shin, D. S., Rowe, A. O., Buchanan, R. A. (2006). Tian ma, an ancient Chinese herb, offers new options for the treatment of epilepsy and other conditions. *Epilepsy & Behavior*, 8(2), 376-383.
- Oke, F., Aslim, B. (2011). Protective effect of two edible mushrooms against oxidative cell damage and their phenolic composition. *Food Chemistry*, 128(3), 613-619.
- Olennikov, D. N., Tankhaeva, L. M., Agafonova, S. V. (2011). Antioxidant components of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. fruit bodies. *Applied biochemistry and microbiology*, 47(4), 419-425.
- Orčić, D (2010). Vrste tribusa Scandiceae (Apiaceae Lindley 1836, subfam. Apioideae) potencijalni izvor biološki i farmakološki aktivnih sekundarnih biomolekula. Doktorska disertacija, Prirodno matematički fakultet, Novi Sad, Univerzite u Novom Sadu.
- Orčić, D., Francisković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., i Mimica-Dukić, N. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food chemistry*, 143, 48-53.
- Ouzouni, P. K., Petridis, D., Koller, W. D., Riganakos, K. A. (2009). Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chemistry*, 115(4), 1575-1580.
- Ouzouni, P., Riganakos, K. (2007). Nutritional value and metal content profile of Greek wild edible fungi. *Acta Alimentaria*, 36(1), 99-110.

- Ozen, T., Darcan, C., Aktop, O., Turkecul, I. (2011). Screening of antioxidant, antimicrobial activities and chemical contents of edible mushrooms wildy grown in the Black Sea region of Turkey. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 14(2), 72-84.
- Ozturk, M., Duru, M. E., Kivrak, S., Mercan-Dogan, N., Turkoglu, A., Ozler, M. A. (2011). In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1353-1360.
- Pandey, M., Verma, R. K., Saraf, S. A. (2010). Nutraceuticals: new era of medicine and health. *Asian J Pharm Clin Res*, 3(1), 11-15.
- Park, B. T., Na, K. H., Jung, E. C., Park, J. W., Kim, H. H. (2009). Antifungal and anticancer activities of a protein from the mushroom *Cordyceps militaris*. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 13(1), 49-54.
- Park, S. W., Vepachedu, R., Sharma, N., Vivanco, J. M. (2004). Ribosome-inactivating proteins in plant biology. *Planta*, 219(6), 1093-1096.
- Patel, S., Goyal, A. (2012). Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech*, 2(1), 1-15.
- Paterson, R. R. M. (2006). Ganoderma—a therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 67(18), 1985-2001.
- Pereira, E., Barros, L., Martins, A., Ferreira, I. C. (2012). Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats. *Food Chemistry*, 130(2), 394-403.
- Petrova, R. D. (2012). New scientific approaches to cancer treatment: can medicinal mushrooms defeat the curse of the century? *International journal of medicinal mushrooms*, 14(1).
- Petrova, R. D., Mahajna, J. A., Denchev, C. M. (2005). Potential role of medicinal mushrooms in breast cancer treatment: current knowledge and future perspectives. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 7(1&2).
- Petrović, J., Glamočlija, J., Stojković, D. S., Ćirić, A., Nikolić, M., Bukvički, D., Soković, M. D. (2013). *Laetiporus sulphureus*, edible mushroom from Serbia: Investigation on volatile compounds, in vitro antimicrobial activity and in situ control of *Aspergillus flavus* in tomato paste. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 297-302.
- Petrović, J., Stojković, D., Reis, F. S., Barros, L., Glamočlija, J., Ćirić, A., Soković, M. (2014). Study on chemical, bioactive and food preserving properties of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. *Food & function*, 5(7), 1441-1451.
- Petrovska, B. B. (2001). Protein fraction in edible Macedonian mushrooms. *European Food Research and Technology*, 212(4), 469-472.
- Piazzon, A., Vrhovsek, U., Masuero, D., Mattivi, F., Mandoj, F., i Nardini, M. (2012). Antioxidant activity of phenolic acids and their metabolites: synthesis and antioxidant properties of the sulfate derivatives of ferulic and caffeic acids and of the acyl glucuronide of ferulic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(50), 12312-12323.
- Pilz, S., Dobnig, H., Fischer, J. E., Wellnitz, B., Seelhorst, U., Boehm, B. O., arz, W. (2008). Low vitamin D levels predict stroke in patients referred to coronary angiography. *Stroke*, 39(9), 2611-2613.
- Pohleven, J., Obermajer, N., Sabotič, J., Anžlovar, S., Sepčić, K., Kos, J., Brzin, J. (2009). Purification, characterization and cloning of a ricin B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis* with antiproliferative activity against human leukemic T cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790(3), 173-181.
- Poucheret, P., Fons, F., Rapior, S. (2006). Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-Year retrospective analysis. *Cryptogamie Mycologie*, 27(4), 311.
- Pugazhendhi, D., Pope, G. S., Darbre, P. D. (2005). Oestrogenic activity of p-hydroxybenzoic acid (common metabolite of paraben esters) and methylparaben in human breast cancer cell lines. *Journal of Applied Toxicology*, 25(4), 301-309.
- Puttaraju, N. G., Venkateshaiah, S. U., Dharmesh, S. M., Urs, S. M. N., Somasundaram, R. (2006). Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(26), 9764-9772.
- Quarcoo, A., Adotey, G., Gordon, A. (2014). Detection and quantification of trace elements (Chromium, Vanadium, Selenium) in some Ghanaian mushrooms using atomic absorption spectrometry. *Current Research in Environmental Applied Mycology*, 4(1), 142-148.
- Quereshi, S., Pandey, A. K., Sandhu, S. S. (2010). Evaluation of antibacterial activity of different ganoderma *lucidum* extracts.
- Radnović, D.; Matavulj, M.; Karaman, M. (2007): *Mikologija*. Novi Sad.



- Rai, M., Sen, S., Acharya, K. (2013). Antimicrobial activity of four wild edible mushrooms from Darjeeling Hills, West Bengal, India. *International Journal of PharmTech Research*, 5(3), 949-956.
- Rai, M., Tidke, G., Wasser, S. P. (2005). Therapeutic potential of mushrooms. *Natural Product Radiance*, 4(4), 246-257.
- Ramesh, C., Pattar, M. G. (2010). Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India. *Pharmacognosy research*, 2(2), 107.
- Ramesh, C., Pattar, M. G. (2010). Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India. *Pharmacognosy Research*, 2(2), 107.
- Reis, F. S., Heleno, S. A., Barros, L., Sousa, M. J., Martins, A., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. (2011). Toward the antioxidant and chemical characterization of mycorrhizal mushrooms from Northeast Portugal. *Journal of food science*, 76(6), C824-C830.
- Reza, A., Choi, M. J., Damte, D., Jo, W. S., Lee, S. J., Lee, J. S., Park, S. C. (2011). Comparative antitumor activity of different solvent fractions from an *Auricularia auricula-judae* ethanol extract in P388D1 and sarcoma 180 cells. *Toxicological research*, 27(2), 77.
- Reza, M. A., Jo, W. S., Park, S. C. (2012). Comparative antitumor activity of jelly ear culinary-medicinal mushroom, *Auricularia auricula-judae* (Bull.) J. Schrot.(higher basidiomycetes) extracts against tumor cells in vitro. *International journal of medicinal mushrooms*, 14
- Ribeiro, B., de Pinho, P. G., Andrade, P. B., Baptista, P., i Valentao, P. (2009). Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: A comparative study. *Microchemical Journal*, 93(1), 29-35.
- Ribeiro, B., Rangel, J., Valentao, P., Baptista, P., Seabra, R. M., Andrade, P. B. (2006). Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried Portuguese wild edible mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(22), 8530-8537.
- Ribeiro, B., Valentao, P., Baptista, P., Seabra, R. M., Andrade, P. B. (2007). Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). *Food and Chemical Toxicology*, 45(10), 1805-1813.
- Ribeiro, B., Valentao, P., Baptista, P., Seabra, R. M., Andrade, P. B. (2007). Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). *Food and Chemical Toxicology*, 45(10), 1805-1813.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., i Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.
- Rosa, L. H., Machado, K. M. G., Jacob, C. C., Capelari, M., Rosa, C. A., Zani, C. L. (2003). Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(7), 967-974.
- Rossi, M., McLaughlin, J. K., Lagiou, P., Bosetti, C., Talamini, R., Lipworth, L., La Vecchia, C. (2008). Vitamin D intake and breast cancer risk: a case-control study in Italy. *Annals of oncology*, mdn550.
- Rudawska, M., Leski, T. (2005). Macro- and microelement contents in fruiting bodies of wild mushrooms from the Notecka forest in west-central Poland. *Food chemistry*, 92(3), 499-506.
- Russo, A., Piovano, M., Clericuzio, M., Lombardo, L., Tabasso, S., Chamy, M. C., Garbarino, J. A. (2007). Putrescine-1, 4-dicinnamide from *Pholiota spumosa* (Basidiomycetes) inhibits cell growth of human prostate cancer cells. *Phytomedicine*, 14(2), 185-191.
- Saeidnia, S. (2015). *New Approaches to Natural Anticancer Drugs*. Springer.
- Samorini, G. Mushroom effigies in world archaeology: from rock art to mushroom-stones.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121-137.
- Sanmee, R., Dell, B., Lumyong, P., Izumori, K., Lumyong, S. (2003). Nutritive value of popular wild edible mushrooms from northern Thailand. *Food Chemistry*, 82(4), 527-532.
- Scalbert, A., Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.
- Schellmann, B., Hilz, M. J., Opitz, O. (1980). Cadmium- und Kupferausscheidung nach Aufnahme von Champignon-Mahlzeiten. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 171(3), 189-192.
- Sesli, E., Tuzen, M., Soylak, M. (2008). Evaluation of trace metal contents of some wild edible mushrooms from Black sea region, Turkey. *Journal of Hazardous Materials*, 160(2), 462-467.
- Shao, S., Hernandez, M., Kramer, J. K., Rinker, D. L., Tsao, R. (2010). Ergosterol profiles, fatty acid composition, and antioxidant activities of button mushrooms as affected by tissue part and developmental stage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(22), 11616-11625.

- Sheena, N., Ajith, T. A., Mathew, A., Janardhanan, K. K. (2003). Antibacterial activity of three macrofungi, *Ganoderma lucidum*, *Navesporus floccosa* and *Phellinus rimosus* occurring in South India. *Pharmaceutical biology*, 41(8), 564-567.
- Sherr, C. J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell*, 116(2), 235-246.
- Sheu, F., Chien, P. J., Hsieh, K. Y., Chin, K. L., Huang, W. T., Tsao, C. Y., Chang, H. H. (2009). Purification, cloning, and functional characterization of a novel immunomodulatory protein from *Antrodia camphorata* (bitter mushroom) that exhibits TLR2-dependent NF- $\kappa$ B activation and M1 polarization within murine macrophages. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(10), 4130-4141.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(6), 945-948.
- Sies, H., & Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American journal of clinical nutrition*, 62(6), 1315S-1321S.
- Signoretto, C., Burlacchini, G., Marchi, A., Grillenzoni, M., Cavalleri, G., Ciric, L., Canepari, P. (2011). Testing a low molecular mass fraction of a mushroom (*Lentinus edodes*) extract formulated as an oral rinse in a cohort of volunteers. *BioMed Research International*, 2011.
- Silberborth, S., Stumpf, A., Erkel, G., Anke, T., Sterner, O. (2002). Gerronemins A–F, cytotoxic biscatechols from a *Gerronema* species. *Phytochemistry*, 59(6), 643-648.
- Šiljegović, J. D., Stojković, D. S., Nikolić, M. M., Glamočlija, J. M., Soković, M. D., & Ćirić, A. M. (2011). Antimicrobial activity of aqueous extract of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murill. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, (120), 299-305.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, (299C), 152-178.
- Slominski, A., Semak, I., Zjawiony, J., Wortsman, J., Gandy, M. N., Li, J., Tuckey, R. C. (2005). Enzymatic metabolism of ergosterol by cytochrome P450<sub>sc</sub> to biologically active 17 $\alpha$ , 24-dihydroxyergosterol. *Chemistry & biology*, 12(8), 931-939.
- Solak, M. H., Kalmis, E., Saglam, H., Kalyoncu, F. (2006). Antimicrobial activity of two wild mushrooms *Clitocybe alexandri* (Gill.) Konr. and *Rhizopogon roseolus* (Corda) TM Fries collected from Turkey. *Phytotherapy Research*, 20(12), 1085-1087.
- Soler-Rivas, C., Espín, J. C., Wichers, H. J. (2000). An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*, 11(5), 330-338.
- Soylak, M., Saraçoğlu, S., Tüzen, M., Mendil, D. (2005). Determination of trace metals in mushroom samples from Kayseri, Turkey. *Food Chemistry*, 92(4), 649-652.
- Stajic, M., Vukojevic, J., Knezevic, A., Duletic Lausevic, S., Milovanovic, I. (2013). Antioxidant protective effects of mushroom metabolites. *Current topics in medicinal chemistry*, 13(21), 2660-2676.
- Stojković, D., Reis, F. S., Barros, L., Glamočlija, J., Ćirić, A., Van Griensven, L. J., Ferreira, I. C. (2013). Nutrients and non-nutrients composition and bioactivity of wild and cultivated *Coprinus comatus* (OF Müll.) Pers. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 289-296.
- Suay, I., Arenal, F., Asensio, F. J., Basilio, A., Cabello, M. A., Díez, M. T., Vicente, M. F. (2000). Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78(2), 129-140.
- Sun, J., Wang, H., Ng, T. B. (2011a). Isolation of a laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from fresh fruiting bodies of the *Lentinus edodes* (Shiitake mushroom).
- Sun, J., Zhao, Y., Chai, H., Wang, H., Ng, T. B. (2011b). A novel alkaline protease with antiproliferative activity from fresh fruiting bodies of the toxic wild mushroom *Amanita farinosa*. *Acta Biochim Pol*, 58, 567-572.
- Suzuki, T., Umehara, K., Tashiro, A., Kobayashi, Y., Dohra, H., Hirai, H., Kawagishi, H. (2011). An Antifungal Protein from the Culinary-Medicinal Beech Mushroom, *Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigel.(Agaricomycetidae). *International journal of medicinal mushrooms*, 13(1).
- Szumny, A., Adamski, M., Winska, K., Maczka, W. (2010). Identification of steroid compounds and essential oils from *Lycoperdon perlatum*. *Przemysł Chemiczny*, 89(4), 550-553.
- Taguchi, T. (1983). [Effects of lentinan in advanced or recurrent cases of gastric, colorectal, and breast cancer]. *Gan to kagaku ryoho. Cancer i chemotherapy*, 10(2 Pt 2), 387-393.
- Takaku, T., Kimura, Y., Okuda, H. (2001). Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *The Journal of nutrition*, 131(5), 1409-1413.
- Tambekar, D. H., Sonar, T. P., Khodke, M. V., Khante, B. S. (2006). The novel antibacterials from two edible mushrooms: *Agaricus bisporus* and *Pleurotus sajor caju*. *Int. J. Pharmacol*, 2, 584-87.

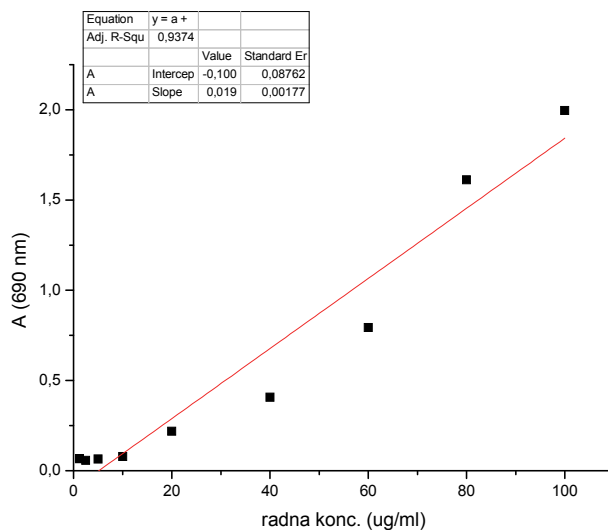
- Tanaka, M., Kuei, C.W., Nagashima, Y. and Taguchi, T. (1998) Application of Antioxidative Maillard Reaction Products from Histidine and Glucose to Sardine Products. *Nippon Suisan Gakkaishil*, 54, 1409-1414.
- Tang, W., Liu, J. W., Zhao, W. M., Wei, D. Z., Zhong, J. J. (2006). Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells. *Life sciences*, 80(3), 205-211.
- Tari, K., Satake, I., Nakagomi, K., Ozawa, K., Oowada, F., Higashi, Y., Yoshida, K. (1994). [Effect of lentinan for advanced prostate carcinoma]. *Hinyokika kiyo. Acta urologica Japonica*, 40(2), 119-123.
- Tiffany, S. M., Graham, D. G., Vogel, F. S., Cass, M. W., Jeffs, P. W. (1978). Investigation of structure-function relationships of cytotoxic quinones of natural and synthetic origin. *Cancer research*, 38(10), 3230-3235.
- Tomas-Barberan, F. A., Clifford, M. N. (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1024-1032.
- Tomasi, S., Lohezic-Le Devehat, F., Sauleau, P., Bezivin, C., & Boustie, J. (2004). Cytotoxic activity of methanol extracts from Basidiomycete mushrooms on murine cancer cell lines. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59(4), 290-293.
- Tsuda, T., Horio, F., Osawa, T. (1999). Absorption and metabolism of cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside in rats. *FEBS letters*, 449(2), 179-182.
- Turkecul, I., Elmastas, M., Tüzen, M. (2004). Determination of iron, copper, manganese, zinc, lead, and cadmium in mushroom samples from Tokat, Turkey. *Food Chemistry*, 84(3), 389-392.
- Turkoglu, A., Duru, M. E., Mercan, N., Kivrak, I., Gezer, K. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 101(1), 267-273.
- Tuzen, M., Sesli, E., Soylak, M. (2007). Trace element levels of mushroom species from East Black Sea region of Turkey. *Food Control*, 18(7), 806-810.
- Uzun, Y., Gencecep, H., Tunctuerk, Y., i Demirel, K. (2009). Determination of protein and nitrogen fractions of wild edible mushrooms. *Asian Journal of Chemistry*, 21(4), 2769-2776.
- Valentao, P., Andrade, P. B., Rangel, J., Ribeiro, B., Silva, B. M., Baptista, P., Seabra, R. M. (2005). Effect of the conservation procedure on the contents of phenolic compounds and organic acids in chanterelle (*Cantharellus cibarius*) mushroom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 4925-4931.
- Vaupotic, T., Veranic, P., Jenoe, P., Plemenitas, A. (2008). Mitochondrial mediation of environmental osmolytes discrimination during osmoadaptation in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. *Fungal Genetics and Biology*, 45(6), 994-1007.
- Vaz, J. A., Almeida, G. M., Ferreira, I. C., Martins, A., Vasconcelos, M. H. (2012). *Clitocybe alexandri* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in a lung cancer cell line: identification of phenolic acids with cytotoxic potential. *Food Chemistry*, 132(1), 482-486.
- Vaz, J. A., Barros, L., Martins, A., Morais, J. S., Vasconcelos, M. H., Ferreira, I. C. (2011a). Phenolic profile of seventeen Portuguese wild mushrooms. *LWT-Food Science and Technology*, 44(1), 343-346
- Vaz, J. A., Barros, L., Martins, A., Santos-Buelga, C., Vasconcelos, M. H., Ferreira, I. C. (2011b). Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. *Food Chemistry*, 126(2), 610-616.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(10), 4113-4117.
- Vidović, S. (2011). Ekstrakcija, sastav, delovanje i moguće primene odabranih vrsta pečuraka. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu.
- Voigt, W. (2005). Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. In *Chemosensitivity* (pp. 39-48). Humana Press.
- Wang, H. X., Ng, T. B. (2000). Flammulin: a novel ribosome-inactivating protein from fruiting bodies of the winter mushroom *Flammulina velutipes*. *Biochemistry and Cell Biology*, 78(6), 699-702.
- Wang, H. X., Ng, T. B. (2001a). Isolation of pleuturegin, a novel ribosome-inactivating protein from fresh sclerotia of the edible mushroom *Pleurotus tuber-regium*. *Biochemical and biophysical research communications*, 288(3), 718-721.
- Wang, H. X., Ng, T. B. (2004b). Purification of a novel low-molecular-mass laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom *Tricholoma giganteum*. *Biochemical and biophysical research communications*, 315(2), 450-454.
- Wang, H. X., Ngai, H. K., Ng, T. B. (2003a). A ubiquitin-like peptide with ribonuclease activity against various polyhomoribonucleotides from the yellow mushroom *Cantharellus cibarius*. *Peptides*, 24(4), 509-513.
- Wang, H., Ng, T. B. (2004a). Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Peptides*, 25(1), 1-5.
- Wang, H., Ng, T. B., Liu, Q. (2004c). Alveolarin, a novel antifungal polypeptide from the wild mushroom *Polyporus alveolaris*. *Peptides*, 25(4), 693-696.

- Wang, H., Ng, T. B. (2006). Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides*, 27(1), 27-30.
- Wang, H., Ng, T. B., Ooi, V. E. (1998). Lectins from mushrooms. *Mycological Research*, 102(08), 897-906
- Wang, L., Folsom, A. R., Eckfeldt, J. H., ARIC Study Investigators. (2003). Plasma fatty acid composition and incidence of coronary heart disease in middle aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 13(5), 256-266
- Wang, S. X., Liu, Y., Zhang, G. Q., Zhao, S., Xu, F., Geng, X. L., Wang, H. X. (2012). Cordysobin, a novel alkaline serine protease with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the medicinal mushroom *Cordyceps sobolifera*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 113(1), 42-47.
- Wang, X. M., Zhang, J., Wu, L. H., Zhao, Y. L., Li, T., Li, J. Q., Liu, H. G. (2014). A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. *Food chemistry*, 151, 279-285.
- Wani, B. A., Bodha, R. H., Wani, A. H. (2010). Nutritional and medicinal importance of mushrooms. *J Med Plants Res*, 4(24), 2598-2604.
- Wasser, S. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(3), 258-274.
- Wasser, S. P. (2010). Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 12(1).
- Wasser, S. P. (2011). Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(5), 1323-1332.
- Wasser, S. P., Weis, A. L. (1999). Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical Reviews™ in Immunology*, 19(1).
- Watanabe, N., Obuchi, T., Tamai, M., Araki, H., Omura, S., Yang, J. S., Huan, J. H. (1990). A novel N6-substituted adenosine isolated from mi huan jun (*Armillaria mellea*) as a cerebral-protecting compound. *Planta medica*, 56(1), 48-52.
- Watanabe, T., Ogawa, K. (1995). Study on Preoperative Intratumor Administration of Lentinan for Gastric Cancer Cases-II. Antitumor Immune Response of Regional Lymph Nodes. *JOURNAL-JAPAN SOCIETY FOR CANCER THERAPY*, 30, 948-948.
- Weete, J. D., Abril, M., Blackwell, M. (2010). Phylogenetic distribution of fungal sterols. *PLoS One*, 5(5), e10899.
- Weete, J. D., Gandhi, S. R. (1997). Sterols of the phylum Zygomycota: phylogenetic implications. *Lipids*, 32(12), 1309-1316.
- Weinberg, R. A. (1996). How cancer arises. *Scientific American*, 275(3), 62-71.
- Wessels, J. G. H. (2000). Hydrophobins, unique fungal proteins. *Mycologist*, 14(4), 153-159.
- Whittaker, R. H. (1969). New concepts of kingdoms of organisms. *Science*, 163(3863), 150-160.
- Williams, C. A., Andersen, Ø. M., Markham, K. R. (2006). Flavone and flavonol O-glycosides. *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*, 749-856.
- Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576-4579.
- Wohlschlager, T., Butschli, A., Zurfluh, K., Vonesch, S. C., auf dem Keller, U., Gehrig, P., Künzler, M. (2011). Nematotoxicity of *Marasmius oreades* agglutinin (MOA) depends on glycolipid binding and cysteine protease activity. *Journal of Biological Chemistry*, 286(35), 30337-30343.
- Wong, J. H., Ng, T. B., Wang, H., Sze, S. C. W., Zhang, K. Y., Li, Q., Lu, X. (2011a). Cordymin, an antifungal peptide from the medicinal fungus *Cordyceps militaris*. *Phytomedicine*, 18(5), 387-392.
- Wong, J. H., Wang, H. X., Ng, T. B. (2008). Marmorin, a new ribosome inactivating protein with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the mushroom *Hypsizygus marmoratus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(4), 669-674.
- Wu Y, Wang H, Ng TB (2011b) Purification and characterization of a lectin with antiproliferative activity toward cancer cells from the dried fruit bodies of *Lactarius flavidulus*. *Carbohydr Res* 346:2576–2581
- Wu, J. Y., Chen, C. H., Chang, W. H., Chung, K. T., Liu, Y. W., Lu, F. J., Chen, C. H. (2011c). Anti-cancer effects of protein extracts from *Calvatia lilacina*, *Pleurotus ostreatus* and *Volvariella volvacea*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
- Wu, Y. Y., Ng, T. B. (2011a). A novel metalloprotease from the wild basidiomycete mushroom *Lepista nuda*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 21(3), 256-262.
- Xia, M., Huang, R., Witt, K. L., Southall, N., Fostel, J., Cho, M., Austin, C. P. (2008). Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening. *Environmental health perspectives*, 116(3), 284.

- Xu, X., Yan, H., Chen, J., Zhang, X. (2011). Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology advances*, 29(6), 667-674.
- Yaltirak, T., Aslim, B., Ozturk, S., Alli, H. (2009). Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 2052-2056.
- Yamac, M., Bilgili, F. (2006). Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharmaceutical Biology*, 44(9), 660-667.
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59(3), 113-122.
- Yilmaz, N., Solmaz, M., Türkekel, İ., Elmastaş, M. (2006). Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. *Food Chemistry*, 99(1), 168-174.
- Yin, M. C., Lin, C. C., Wu, H. C., Tsao, S. M., Hsu, C. K. (2009). Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix, and prostate cancer cells: potential mechanisms of action. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(14), 6468-6473.
- Yip, E. C. H., Chan, A. S. L., Pang, H., Tam, Y. K., Wong, Y. H. (2006). Protocatechuic acid induces cell death in HepG2 hepatocellular carcinoma cells through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Cell biology and toxicology*, 22(4), 293-302.
- Yokota, J. (2000). Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 21(3), 497-503.
- Yuspa, S. H. (2000). Overview of carcinogenesis: past, present and future. *Carcinogenesis*, 21(3), 341-344.
- Zahid, S., Udenigwe, C. C., Ata, A., Eze, M. O., Segstro, E. P., Holloway, P. (2006). New bioactive natural products from *Coprinus micaceus*. *Natural product research*, 20(14), 1283-1289.
- Zaidman, B. Z., Yassin, M., Mahajna, J., Wasser, S. P. (2005). Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(4), 453-468.
- Zhang, J., Wang, G., Li, H., Zhuang, C., Mizuno, T., Ito, H., Li, J. (1994). Antitumor polysaccharides from a Chinese mushroom, "yuhuangmo" the fruiting body of *Pleurotus citrinopileatus*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 58(7), 1195-1201.
- Zhang, M., Cui, S. W., Cheung, P. C. K., Wang, Q. (2007). Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*, 18(1), 4-19.
- Zhang, Y., Mills, G. L., Nair, M. G. (2002). Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the mycelia of the edible mushroom *Grifola frondosa*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(26), 7581-7585.
- Zhao, J. K., Zhao, Y. C., Li, S. H., Wang, H. X., Ng, T. B. (2011). Isolation and characterization of a novel thermostable lectin from the wild edible mushroom *Agaricus arvensis*. *Journal of basic microbiology*, 51(3), 304-311.
- Zhao, S., Rong, C., Liu, Y., Xu, F., Wang, S., Duan, C., Wu, X. (2015). Extraction of a soluble polysaccharide from *Auricularia polytricha* and evaluation of its anti-hypercholesterolemic effect in rats. *Carbohydrate Polymers*.
- Zhao, Y. C., Zhang, G. Q., Ng, T. B., Wang, H. X. (2011). A novel ribonuclease with potent HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from cultured mushroom *Schizophyllum commune*. *The Journal of Microbiology*, 49(5), 803-808.
- Zhou, K. S., Peng, J. F., Chang, N., Zhang, H. X., Gong, F., Zhang, C. K. (2003). Purification and crystallization of flammulin, a basic protein with anti-tumor activities from *Flammulina velutipes*. *Chinese Chemical Letters*, 14(7), 713-716.
- Zhu, T., Kim, S. H., Chen, C. Y. (2008). A medicinal mushroom: *Phellinus linteus*. *Current medicinal chemistry*, 15(13), 1330-1335.
- Zhuang, C., Wasser, S. P. (2004). Medicinal Value of Culinary-Medicinal Maitake Mushroom *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) SF Gray (Aphyllorphomycetidaeae). Review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 6(4).
- Zjawiony, J. K. (2004). Biologically Active Compounds from Aphyllorphorales (Polypore) Fungi. *Journal of Natural Products*, 67(2), 300-310.

## 8. PRILOZI

### PRILOG 8.1. Fenoli



#### Laetiporus sulphureus

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka
4000	97,87	24,4675	5000	122,2407	24,44815
2000	63,53	31,765	2500	110,6111	44,24444
1000	36,31	36,31	1250	82,33333	65,86667
500	25,05	50,1	625	48	76,8
250	16,45	65,8	312,5	30,25926	96,82963
			156,25	15,35185	98,25185
			78,125	8,685185	111,1704

#### Lactarius controversus

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka
4000	> GK		5000	73,03704	14,60741
2000	75,59	37,795	2500	40,11111	16,04444
1000	48,77	48,77	1250	21,5	17,2
500	30,02	60,04	625	11,2963	18,07407
250	19,31	77,24	312,5	7,092593	22,6963
			156,25	4,222222	27,02222
			78,125	1,111111	14,22222

**Macrolepiota procera**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka
500	14,06	28,12	1165,049	22,87831	19,6372134
250	8,22	32,88	776,699	7,86067	10,12061287
150	7,44	49,6	485,4369	5,850088	12,05118166
75	7,8	104	242,7184	1,828924	7,535167549
50	3,13	62,6	121,3592	0,153439	1,264338624
25	6,11	244,4			

**Auricularia auricula-judae**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka
4000	81,87	20,4675	2500	94,61111	37,84444
2000	52,16	26,08	1250	80,77778	64,62222
1000	31,55	31,55	625	51,83333	82,93333
500	17,44	34,88	312,5	31,36111	100,3556
250	10,36	41,44	156,25	17,75	113,6
			78,125	10,80556	138,3111

**Meripilus giganteus**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka
500	38,06	76,12	5000	102,7037	20,54074
250	22,16	88,64	2500	52,42593	20,97037
75	12,34	164,5333	1250	31,5	25,2
37,5	10,29	274,4	625	18,7963	30,07407
18,75	7,99	426,1333	312,5	9,796296	31,34815
			156,25	6,444444	41,24444
			78,125	3,833333	49,06667

**Armillaria mellea**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka
2000	64,31	32,155	5000	121,7037	24,34074
1000	42,42	42,42	2500	111,6111	44,64444
500	26,4	52,8	1250	91,66667	73,33333
250	18,43	73,72	625	54,81481	87,7037
			312,5	31,14815	99,67407
			156,25	19,07407	122,0741
			78,125	10,05556	128,7111

**Lycoperdon perlatum**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka
2000	96,43	48,215	5000	118,9444	23,78889
1000	63,25	63,25	2500	110,1944	44,07778
500	41,01	82,02	1250	87,83333	70,26667
250	30,06	120,24	625	53	84,8
150	20,01	133,4	312,5	33,59259	107,4963
			156,25	17,88889	114,4889
			78,125	9,740741	124,6815

**Coprinus disseminatus**

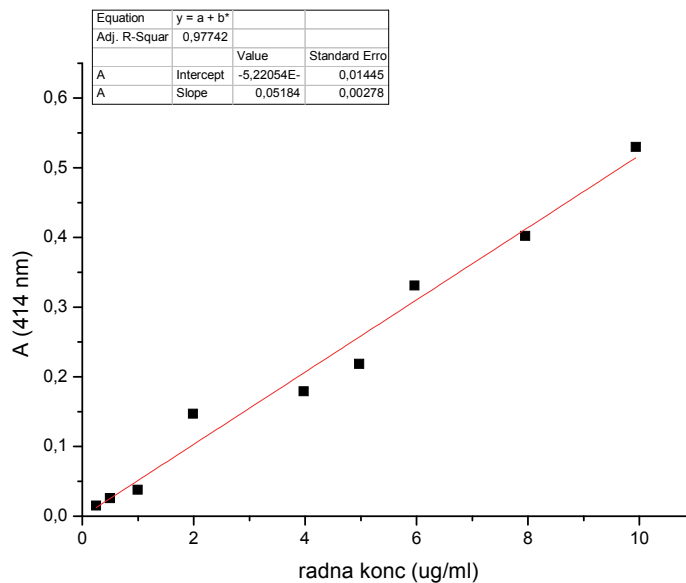
Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka
4000	> GK		5000	96,5	19,3
2000	84,95	42,475	2500	64,38889	25,75556
500	31,81	63,62	1250	45,51852	36,41481
250	18,43	73,72	625	18,61111	29,77778
			312,5	9,518519	30,45926
			156,25	5,592593	35,79259
			78,125	2,944444	37,68889

**Fistulina hepatica**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka
1000	72,3	72,3	5000	0,722222	0,144444
500	29,45	58,9	2500	99,27778	39,71111
250	19,09	76,36	1250	61,64815	49,31852
150	13,51	90,06667	625	34,59259	55,34815
75	10,92	145,6	312,5	17,96296	57,48148
50	9,52	190,4	156,25	10,5	67,2
25	6,22	248,8	78,125	5,240741	67,08148



## PRILOG 8.2. Flavonoidi

**Laetiporus sulphureus**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka
3973,51	6,98	1,756633	4966,887	4,70399	0,94707
1986,755	2,96	1,489867	2483,444	2,722008	1,096062
993,3775	0,68	0,684533	1241,722	1,833977	1,476963
496,6887	0,26	0,523467	620,8609	1,319176	2,124753
248,3444	1,59	6,4024	310,4305	1,235521	3,980026
			155,2152	1,061776	6,840669
			77,60762	0,135135	1,741261

**Lactarius controversus**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka
3973,51	> K	-	4966,887	3,590734	0,722934
1986,755	5,97	3,0049	2483,444	2,162162	0,870631
993,3775	4,91	4,942733	1241,722	1,480051	1,191935
496,6887	3,09	6,2212	620,8609	0,11583	0,186564
248,3444	0,7	2,818667	310,4305	0,096525	0,31094
			155,2152	0,057915	0,373127
			77,60762	0,34749	4,477529

**Macrolepiota procera**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka
496,6887	0,032	0,064427	4966,887	4,324324	0,870630631
248,3444	0,032	0,128853	2483,444	2,033462	0,818807379
149,0066	2,21	14,83156	1241,722	1,782497	1,435504076
74,50331	0,62	8,321778	620,8609	1,943372	3,13012441
49,66887	0,17	3,422667	310,4305	1,158301	3,731274131
24,83444	0,087	3,5032	155,2152	1,145431	7,37963106
			77,60762	1,003861	12,93508366

**Auricularia auricula-judae**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka
3973,51	> K	-	2483,444	18,19176	7,325217
1986,755	> K	-	1241,722	0,765766	0,308348
993,3775	> K	-	620,8609	0,675676	0,544144
496,6887	8,54	17,19387	310,4305	0,444015	0,715161
248,3444	4,67	18,80453	155,2152	0,11583	0,373127
			77,60762	0,096525	0,621879

**Meripilus giganteus**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka
496,6887	4,4	8,858667	4966,887	20,82046	4,191853
248,3444	3	12,08	2483,444	2,078507	0,836946
149,0066	1,84	12,34844	1241,722	1,492921	1,202299
74,50331	1,07	14,36178	620,8609	1,171171	1,886366
37,25166	0,65	17,44889	310,4305	1,113256	3,586169
18,62583	0,35	18,79111	155,2152	0,978121	6,301707
			77,60762	1,036036	13,34967

**Armillaria mellea**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka
1986,755	0,66	0,3322	4966,887	0,579151	0,116602
993,3775	0,33	0,3322	2483,444	0,083655	0,033685
496,6887	1,45	2,919333	1241,722	0,11583	0,093282
248,3444	0,59	2,375733	620,8609	0,225225	0,362763
149,0066	1,12	7,516444	310,4305	0,09009	0,29021
1986,755	0,66	0,3322	155,2152	0,032175	0,207293
			77,60762	0,06435	0,829172

**Lycoperdon perlatum**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka
1986,755	0,94	0,473133	4966,887	3,912484	0,787713
993,3775	1,36	1,369067	2483,444	2,290862	0,922454
496,6887	0,74	1,489867	1241,722	1,763192	1,419957
248,3444	0,33	1,3288	620,8609	1,280566	2,062565
149,0066	0,28	1,879111	310,4305	1,093951	3,523981
			155,2152	1,402831	9,037975
			77,60762	0,933076	12,02299

**Coprinus disseminatus**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka
3973,51	> K	-	4966,887	0,057915	0,01166
1986,755	> K	-	2483,444	0,30888	0,124376
993,3775	> K	-	1241,722	0,29601	0,238387
496,6887	6,38	12,84507	620,8609	0,09009	0,145105
248,3444	2,46	9,9056	310,4305	0,534106	1,720532
			155,2152	0,199485	1,285217
			77,60762	0,05148	0,663338

**Fistulina hepatica**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. GK (µg/ml)	mg ekv. GK/g suvog ostatka
993,3775	3,64	3,664267	4966,887	5,06435	1,019622
496,6887	1,79	3,603867	2483,444	1,763192	0,709979
248,3444	1,4	5,637333	1241,722	0,965251	0,777349
149,0066	1,64	11,00622	620,8609	0,341055	0,549326
74,50331	1,6	21,47556	310,4305	0,34749	1,119382
49,66887	1,18	23,75733	155,2152	0,225225	1,451051
24,83444	1,05	42,28	77,60762	0,045045	0,58042

**PRILOG 8.3. Parametri za kvantifikaciju standardnih fenolnih jedinjenja**

Jedinjenje	Retenciono vreme (min)	Napon fragmentora (V)	Jon prekursor (m/z)	Jon proizvod (m/z)	Koliziona energija (V)
galna kiselina	0.58	90	169	125	10
katehin	0.74	150	289	245	10
protokatehinska kiselina	0.79	105	153	109	9
hlorogenska kiselina	0.80	100	353	191	10
epigalokatehin galat	0.81	165	457	169	16
epikatehin	0.95	150	289	245	10
2,5-dihidroksibenzoeva kiselina	1.03	100	153	109	9
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	1.08	80	137	93	10
eskuletin	1.13	105	177	133	15
kafena kiselina	1.18	100	179	135	10
vanilinska kiselina	1.24	100	167	108	15
siringinska kiselina	1.31	90	197	182	7
<i>p</i> -kumarinska kiselina	1.69	90	163	119	9
umbeliferon	1.73	120	161	133	19
skopoletin	1.77	80	191	176	8
ferulna kiselina	1.90	90	193	134	11
viteksin	1.90	200	431	311	22
sinapinska kiselina	1.92	100	223	193	17
luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	2.13	230	447	285	30
hiperozid	2.16	200	463	300	30
kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	2.25	210	463	300	30
rutin	2.33	135	609	300	42
apiin	2.60	250	563	269	36
<i>o</i> -kumarinska kiselina	2.62	100	163	119	5
miricetin	2.67	150	317	179	20
kvercitrin	2.75	190	447	300	27
kemferol-3- <i>O</i> -glukozid	2.80	190	447	284	30
apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	2.81	135	431	268	41
sekoizolaricirezinol	2.90	130	361	165	26
3,4-dimetoksicimetna kiselina	2.99	110	207	103	7
bajkalin	3.40	140	445	269	22
daidzein	3.43	145	253	208	31
matairezinol	3.66	130	357	122	24
kvercetin	3.74	130	301	151	15
naringenin	3.87	130	271	151	16
cimetna kiselina	3.91	100	147	103	5
luteolin	4.03	135	285	133	25
genistein	4.12	145	269	133	32
kemferol	4.55	130	285	285	0
apigenin	4.71	130	269	117	25
izoramnetin	4.79	160	315	300	21
krizoeriol	4.82	125	299	284	20
bajkalein	5.15	165	269	269	0
amentoflavon	5.78	220	537	375	35

## Prilog 8.4. Frakcije proteina po molekularnim masama

### A. auricula-judae

kDa <sub>sr</sub>	Rel. conc. <sub>sr</sub>	Ckor/kal	%
10,2	34,5	19,17	2,73
13,0	22,6	12,56	1,79
15,7	49,45	27,47	3,91
8,8	68,4	38,00	5,41
9,8	50,25	27,92	3,97
22,5	47,4	26,33	3,75
23,1	38,8	21,56	3,07
24,6	76,9	42,72	6,08
27,6	628,75	349,31	49,69
29,2	112,65	62,58	8,90
31,5	73,05	40,58	5,77
36,4	9,2	5,11	0,73
37,9	6,2	3,44	0,49
42,0	34,85	19,36	2,75
44,1	7,1	3,94	0,56
6,1	3,35	1,86	0,26
50,8	2	1,11	0,16

### M. procera

kDa <sub>sr</sub>	Rel. conc. <sub>sr</sub>	Ckor/kal	%
5,2	765,4	425,22	22,60
8,9	3,5	1,94	0,10
12,5	103,45	57,47	3,05
14,9	121,05	67,25	3,57
16,5	41,95	23,31	1,24
18,2	117,4	65,22	3,47
20,5	380,85	211,58	11,24
22,8	176,55	98,08	5,21
23,6	536,9	298,28	15,85
27,1	138,65	77,03	4,09
28,9	147,7	82,06	4,36
29,7	94,2	52,33	2,78
32,3	28,85	16,03	0,85
33,5	14,65	8,14	0,43
36,7	92,95	51,64	2,74
38,3	95,85	53,25	2,83
40,2	113,1	62,83	3,34
43,0	70,45	39,14	2,08
45,2	54,85	30,47	1,62
47,4	104,4	58,00	3,08
49,3	65,05	36,14	1,92
55,0	44,65	24,81	1,32
59,6	29,2	16,22	0,86
61,8	45,4	25,22	1,34

### L. sulphureus

kDa <sub>sr</sub>	Rel. conc. <sub>sr</sub>	Ckor/kal	%
6,4	71,35	39,64	6,14
8,7	24,45	13,58	2,10
10,9	49,05	27,25	4,22
13,3	7,6	4,22	0,65
13,8	33	18,33	2,84
14,3	44,8	24,89	3,85
17,4	24,65	13,69	2,12
19,3	155,85	86,58	13,41
20,7	64,15	35,64	5,52
23,6	37,9	21,06	3,26
24,8	57,85	32,14	4,98
25,1	64,6	35,89	5,56
27,9	340,85	189,36	29,32
32,6	6,95	3,86	0,60
33,4	11,6	6,44	1,00
36,5	26,5	14,72	2,28
37,2	20	11,11	1,72
38,9	13,05	7,25	1,12
40,7	37,5	20,83	3,23
43,7	37,85	21,03	3,26
45,9	2,4	1,33	0,21
48,8	0,35	0,19	0,03

51,8	2,65	1,47	0,23
59,7	27,55	15,31	2,37

38,5	2,6	1,44	0,30
39,9	0,2	0,11	0,02
42,4	2,5	1,39	0,29
43,3	1	0,56	0,12
45,5	1,3	0,72	0,15
45,9	1,2	0,67	0,14
62,6	2,6	1,44	0,30

**C. disseminatus**

kDa <sub>sr</sub>	Rel. conc. <sub>sr</sub>	Ckor/kal	%
63,3	2,65	1,47	0,31
65,6	0,9	0,50	0,11
88,7	0,3	0,17	0,04

27,6	30,4	16,89	3,44
30,2	19,55	10,86	2,21
32,0	11,45	6,36	1,30
35,5	75,95	42,19	8,60
39,3	63,4	35,22	7,18
46,6	26,05	14,47	2,95
47,9	9,4	5,22	1,06
50,6	26,35	14,64	2,98
52,2	5,9	3,28	0,67
54,1	1,2	0,67	0,14

**A. mellea**

kDa <sub>sr</sub>	Rel. conc. <sub>sr</sub>	Ckor/kal	%
54,8	1,75	0,97	0,20
55,2	3,7	2,06	0,42
63,3	3,2	1,78	0,36

**A. mellea**

kDa <sub>sr</sub>	Rel. conc. <sub>sr</sub>	Ckor/kal	%
6,0	10,9	6,06	1,23
10,2	3,8	2,11	0,43
12,8	7,95	4,42	0,90
16,9	7	3,89	0,79
17,5	13,1	7,28	1,48
19,0	266,5	148,06	30,19
20,6	89,2	49,56	10,10
22,5	69,7	38,72	7,90
23,5	41,5	23,06	4,70
24,3	21,1	11,72	2,39
25,4	73,75	40,97	8,35

**L. perlatum**

kDa <sub>sr</sub>	Rel. conc. <sub>sr</sub>	Ckor/kal	%
9,0	30,15	16,75	1,16
14,1	1093,45	607,47	42,17
15,5	416,1	231,17	16,05
17,0	276,45	153,58	10,66
20,2	124,4	69,11	4,80
22,0	33,6	18,67	1,30
23,5	150	83,33	5,78
24,2	78,05	43,36	3,01
27,0	142,5	79,17	5,50

28,6	14,45	8,03	0,56	26,1	77,65	43,14	4,65	72,9	3,9	2,17	0,23
30,3	15,25	8,47	0,59	29,0	100,45	55,81	6,01	75,0	2,2	1,22	0,13
33,6	1,1	0,61	0,04	32,7	152,85	84,92	9,15	76,9	2,6	1,44	0,16
37,6	102,55	56,97	3,95	34,2	238,65	132,58	14,29	79,4	8,2	4,56	0,49
42,8	53,95	29,97	2,08	39,0	9,2	5,11	0,55	80,6	11,05	6,14	0,66
44,8	10,7	5,94	0,41	40,3	1,95	1,08	0,12	81,3	20,45	11,36	1,22
45,9	5,55	3,08	0,21	42,7	1,4	0,78	0,08	85,9	6,7	3,72	0,40
48,9	23,35	12,97	0,90	45,8	1,6	0,89	0,10	89,0	4,15	2,31	0,25
50,0	6,55	3,64	0,25	47,6	3,6	2,00	0,22	90,9	1,85	1,03	0,11
50,7	6,55	3,64	0,25	48,9	5,2	2,89	0,31				
52,1	2,4	1,33	0,09	49,8	10,5	5,83	0,63				
53,9	5,9	3,28	0,23	50,5	5,3	2,94	0,32				
				52,0	3,5	1,94	0,21				
				53,5	4,5	2,50	0,27				

**M. giganteus**

kDa <sub>sr</sub>	Rel. conc. <sub>sr</sub>	Ckor/kal	%
-------------------	--------------------------	----------	---

5,4	259,3	144,06	24,34
5,9	21	11,67	1,97
13,2	2,65	1,47	0,25
15,8	184,45	102,47	17,32
19,8	27,7	15,39	2,60
20,9	185,5	103,06	17,41
22,8	84,75	47,08	7,96
23,5	39,8	22,11	3,74
24,2	33,6	18,67	3,15
25,4	47,55	26,42	4,46
26,3	19,8	11,00	1,86
28,2	40,15	22,31	3,77
29,3	18,5	10,28	1,74
31,4	25,4	14,11	2,38

**F. hepatica**

kDa <sub>sr</sub>	Rel. conc. <sub>sr</sub>	Ckor/kal	%
-------------------	--------------------------	----------	---

7,3	223,85	124,36	13,40
8,7	70,6	39,22	4,23
9,7	100,05	55,58	5,99
11,5	63,25	35,14	3,79
12,5	33,2	18,44	1,99
12,8	31,4	17,44	1,88
13,6	30,85	17,14	1,85
16,2	36,25	20,14	2,17
17,8	45,5	25,28	2,72
19,7	44,7	24,83	2,68
20,3	90,1	50,06	5,39
22,2	164,45	91,36	9,84

**F. hepatica**

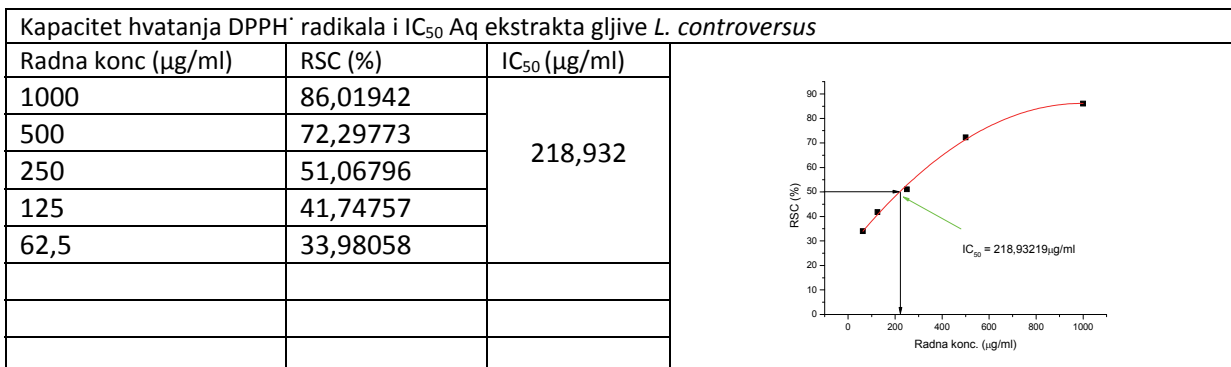
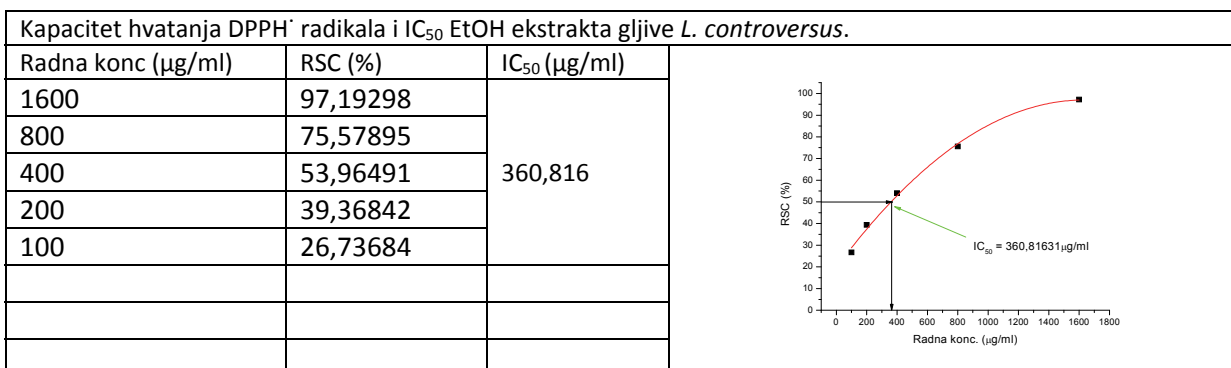
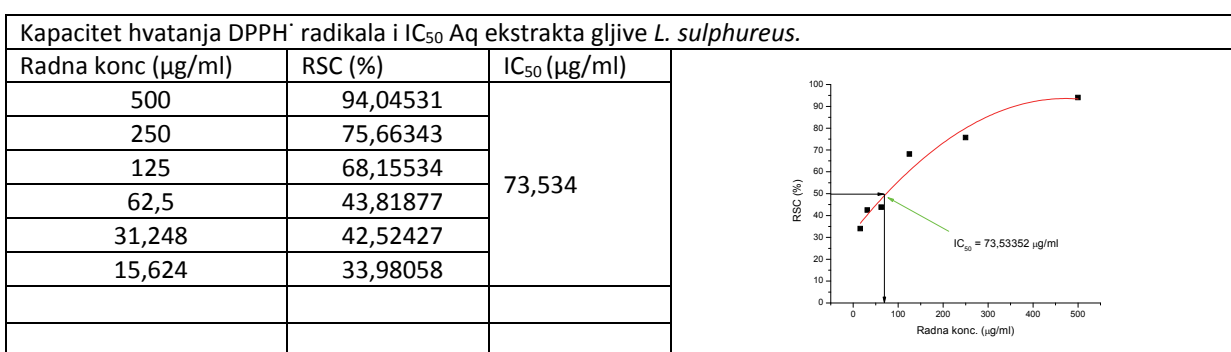
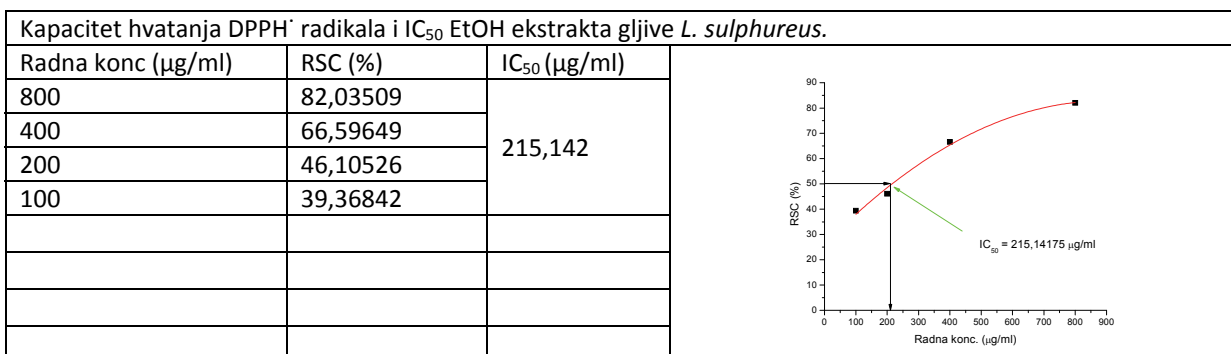
kDa <sub>sr</sub>	Rel. conc. <sub>sr</sub>	Ckor/kal	%
-------------------	--------------------------	----------	---

55,4	3,9	2,17	0,23
56,5	4,7	2,61	0,28
57,6	5,3	2,94	0,32
59,2	5,6	3,11	0,34
60,0	4,3	2,39	0,26
60,7	8	4,44	0,48
62,8	9,1	5,06	0,54
65,0	5,2	2,89	0,31
67,0	5,4	3,00	0,32
68,2	3,1	1,72	0,19
70,6	4,2	2,33	0,25

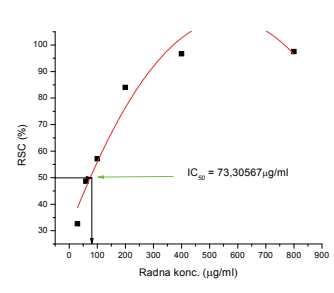
32,7	8,05	4,47	0,76
35,6	8,15	4,53	0,77
38,8	17,55	9,75	1,65
41,2	4,65	2,58	0,44
44,9	14,8	8,22	1,39
45,5	6,45	3,58	0,61
46,5	3,15	1,75	0,30
58,6	12,25	6,81	1,15



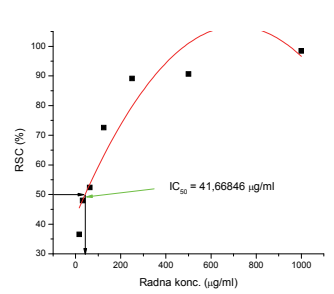
## PRILOG 8.5. Antioksidativni testovi



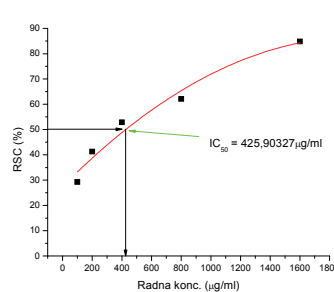
Kapacitet hvatanja DPPH <sup>•</sup> radikala i IC <sub>50</sub> EtOH ekstrakta gljive <i>M. procera</i>		
Radna konc (µg/ml)	RSC (%)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
800	98,03509	73,306
400	92,98246	
200	84,2807	
100	54,80702	
60	50,59649	
30	33,47368	



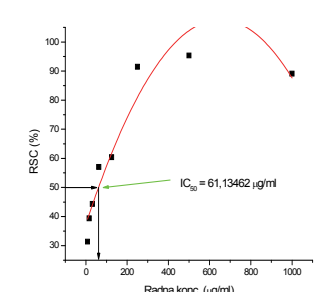
Kapacitet hvatanja DPPH <sup>•</sup> radikala i IC <sub>50</sub> Aq ekstrakta gljive <i>M. procera</i> .		
Radna konc (µg/ml)	RSC (%)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
1000	98,4466	41,668
500	90,67961	
250	89,12621	
125	72,55663	
62,5	52,36246	
31,248	47,96117	
15,624	36,56958	



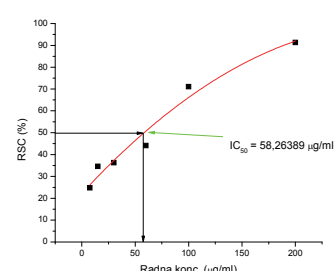
Kapacitet hvatanja DPPH <sup>•</sup> radikala i IC <sub>50</sub> EtOH ekstrakta gljive <i>A. auricula-judae</i>		
Radna konc (µg/ml)	RSC (%)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
1600	84,84211	425,903
800	62,10526	
400	52,84211	
200	41,33333	
100	29,26316	



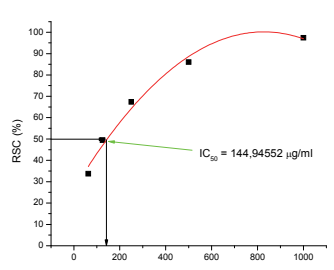
Kapacitet hvatanja DPPH <sup>•</sup> radikala i IC <sub>50</sub> Aq ekstrakta gljive <i>A. auricula-judae</i>		
Radna konc (µg/ml)	RSC (%)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
1000	89,12621	61,135
500	95,33981	
250	91,45631	
125	60,38835	
62,5	57,02265	
31,248	44,33657	
15,624	39,41748	
7,812	31,39159	



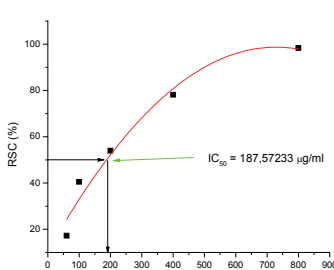
Kapacitet hvatanja DPPH <sup>•</sup> radikala i IC <sub>50</sub> EtOH ekstrakta gljive <i>M. giganteus</i> .		
Radna konc (µg/ml)	RSC (%)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
200	91,29825	58,264
100	71,08772	
60	44,14035	
30	36,2807	
15	34,59649	
7,5	24,77193	



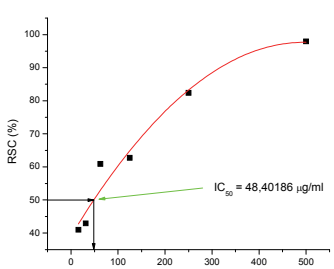
Kapacitet hvatanja DPPH <sup>•</sup> radikala i IC <sub>50</sub> Aq ekstrakta gljive <i>M. giganteus</i> .		
Radna konc (µg/ml)	RSC (%)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
1000	97,411	144,946
500	86,01942	
250	67,37864	
125	49,51456	
62,5	33,72168	

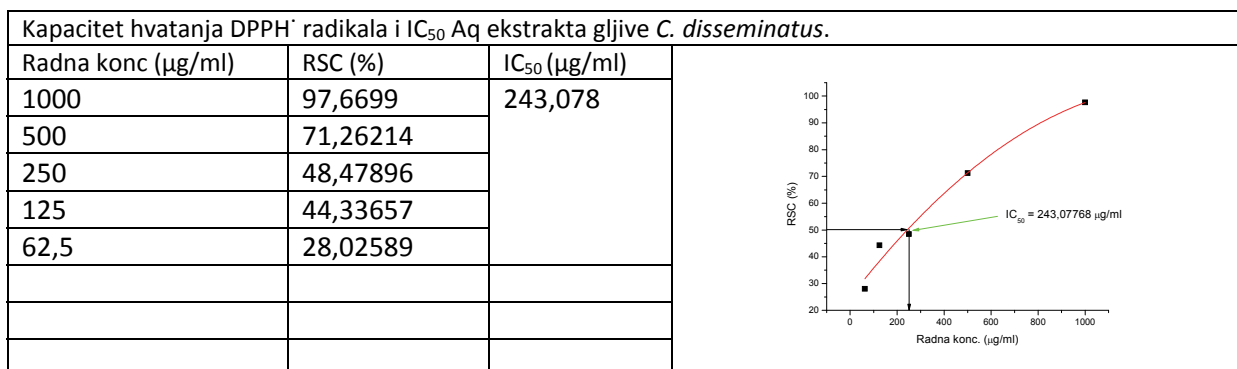
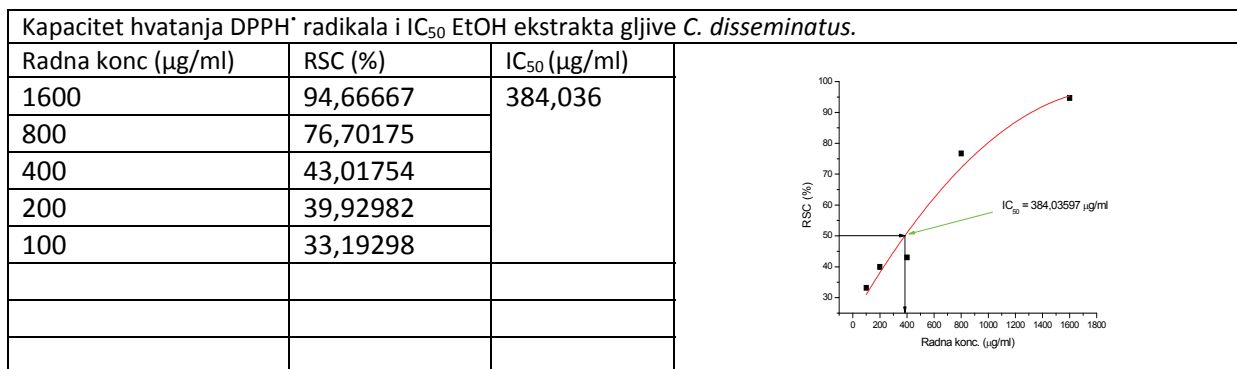
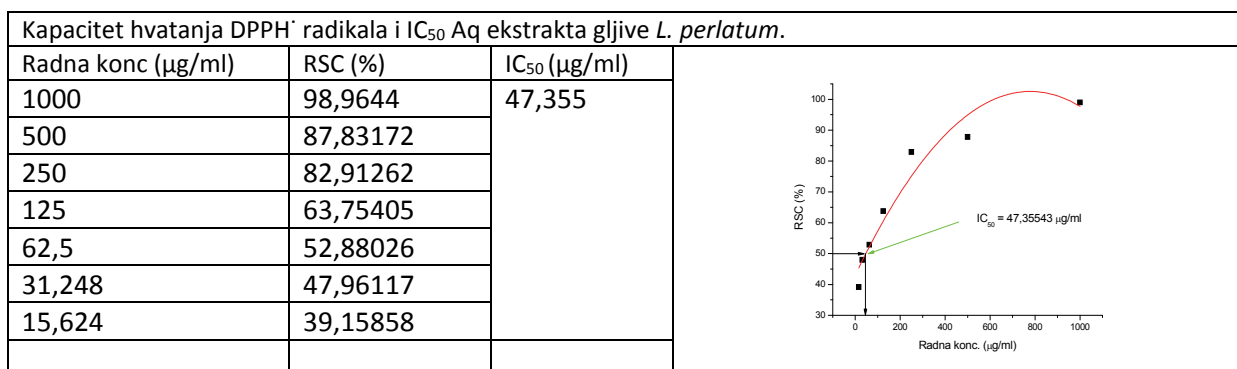
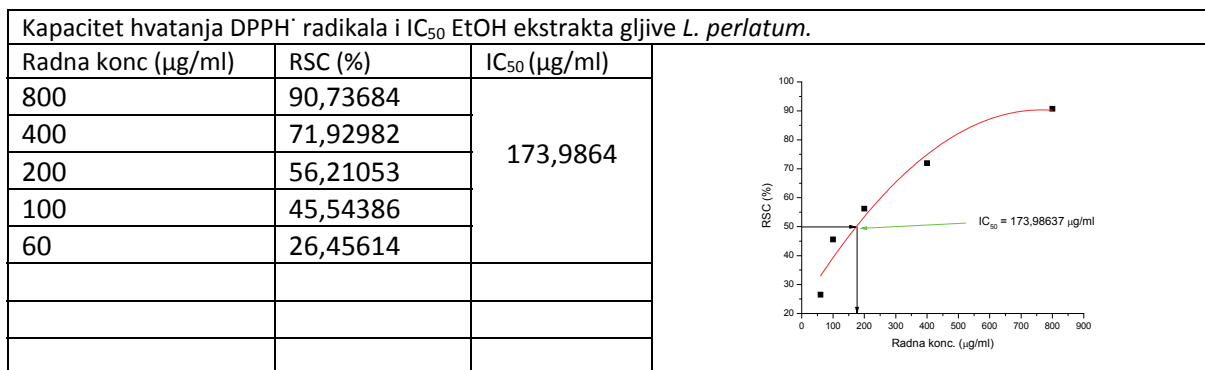


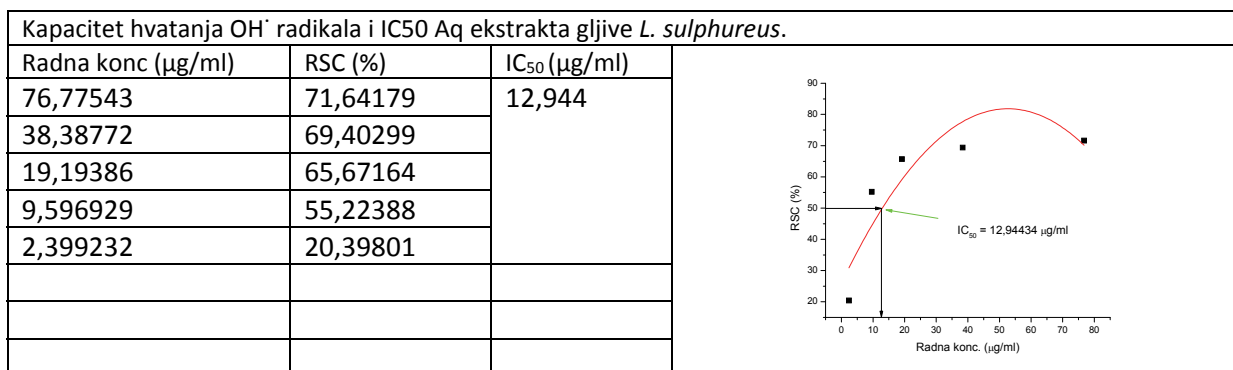
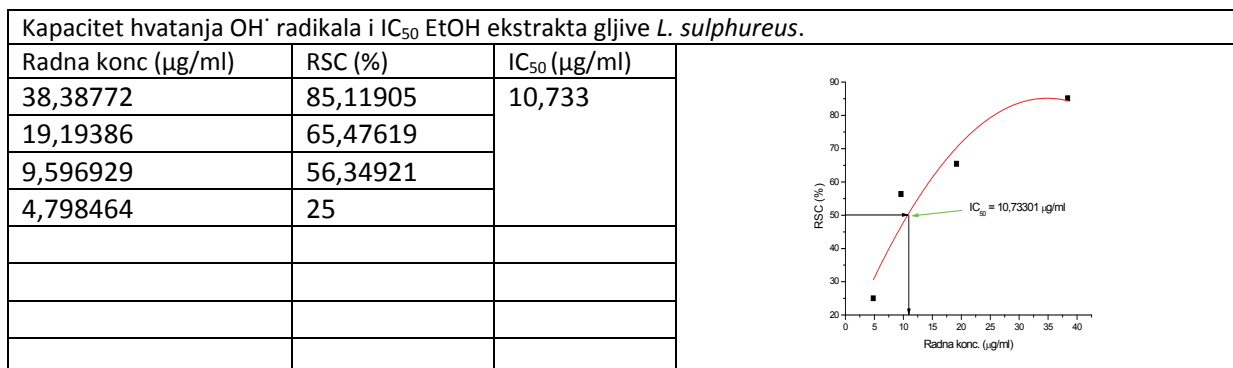
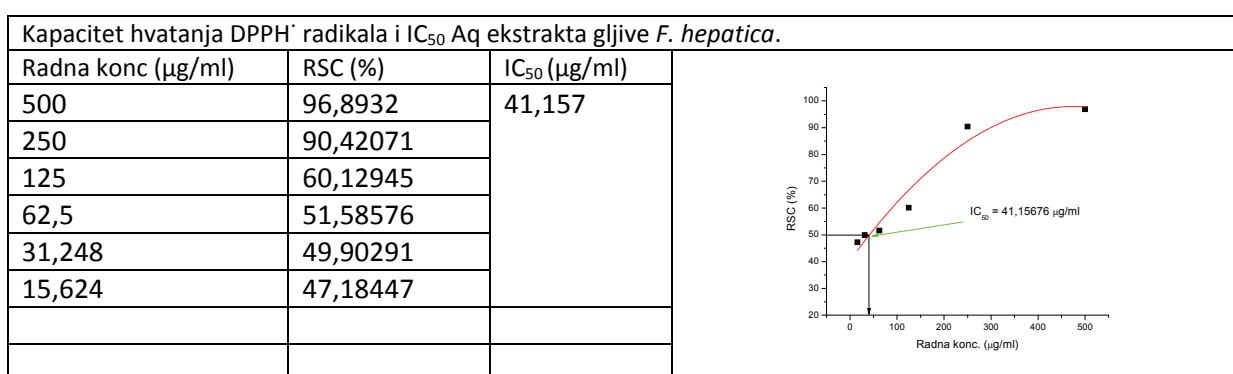
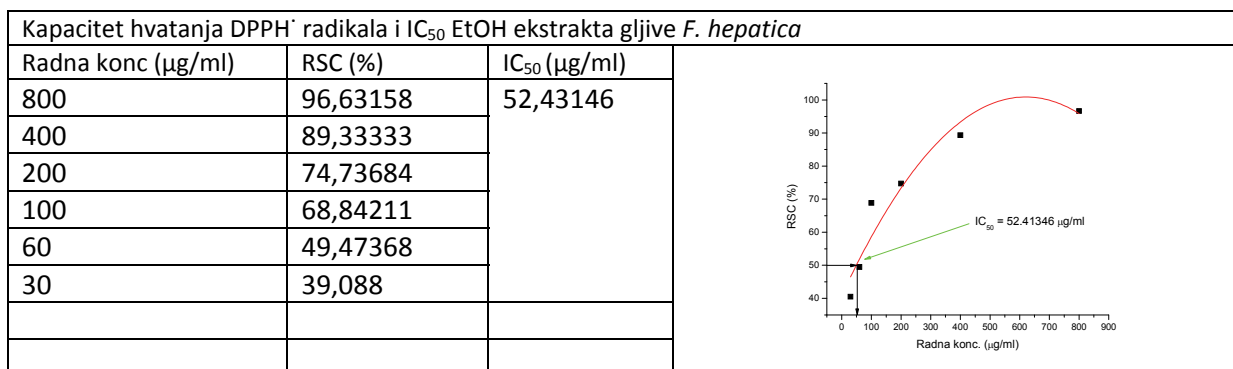
Kapacitet hvatanja DPPH <sup>•</sup> radikala i IC <sub>50</sub> EtOH ekstrakta gljive <i>A. mellea</i> .		
Radna konc (µg/ml)	RSC (%)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
800	98,31579	187,5723
400	78,10526	
200	53,96491	
100	40,49123	
60	17,19298	

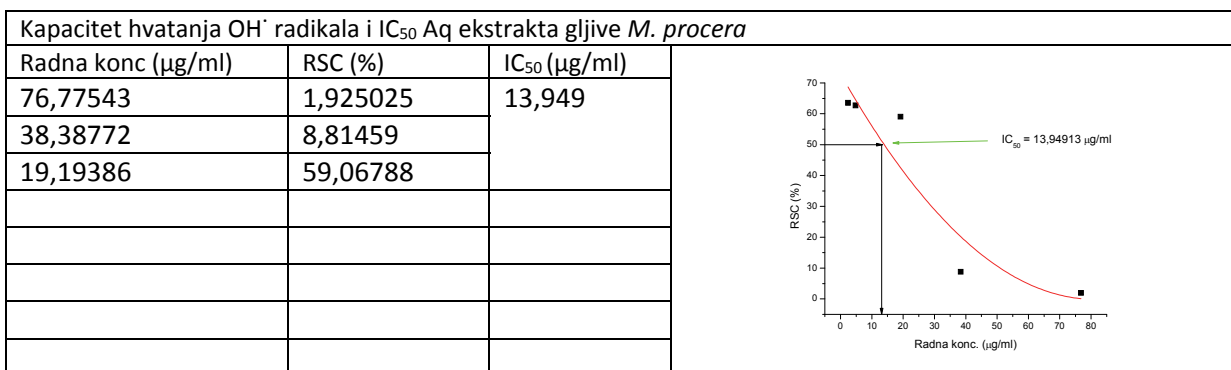
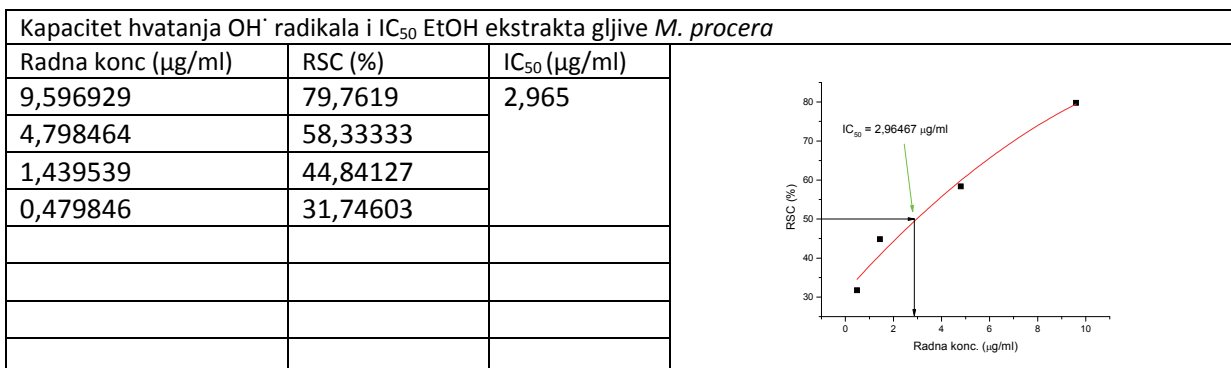
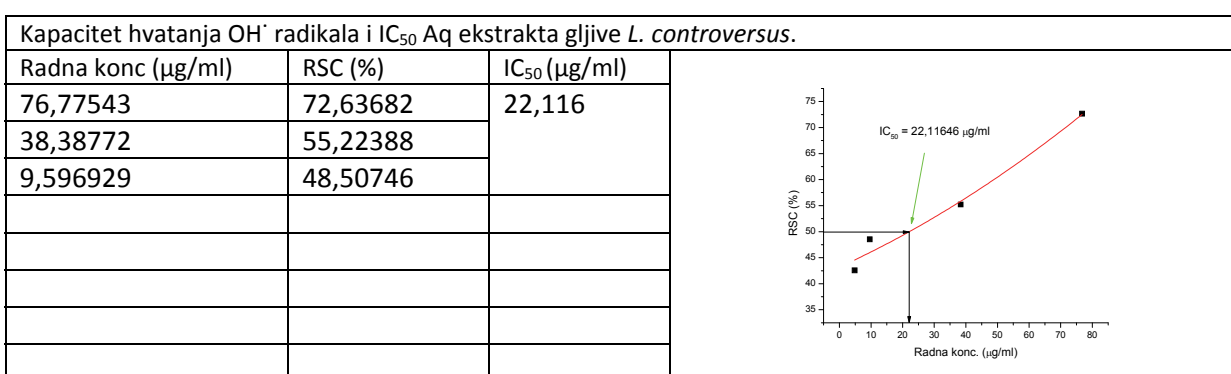
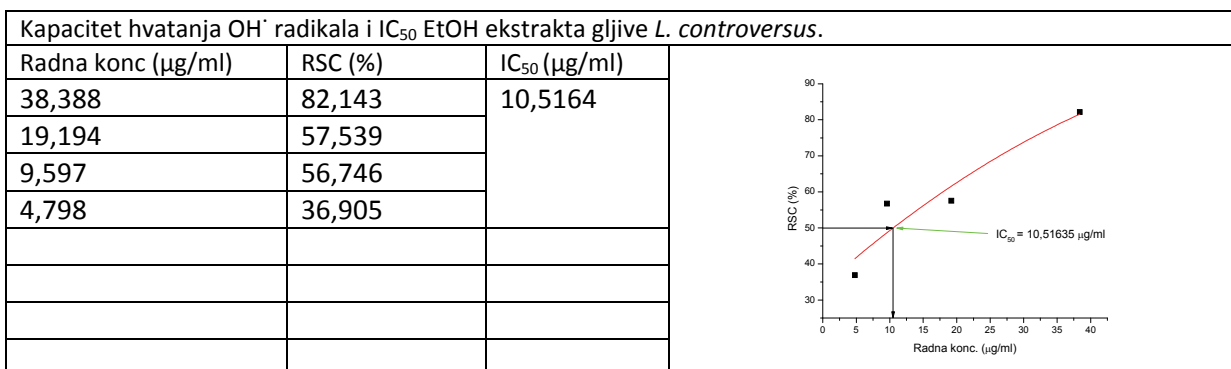


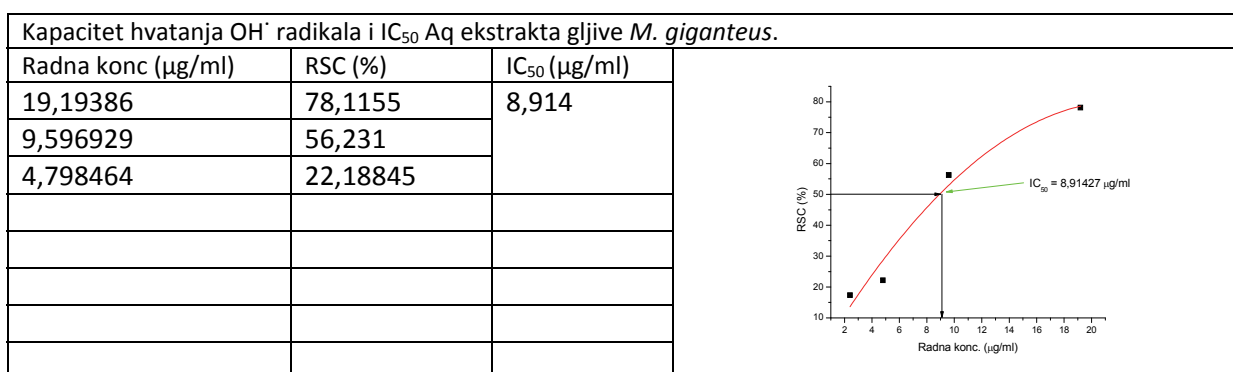
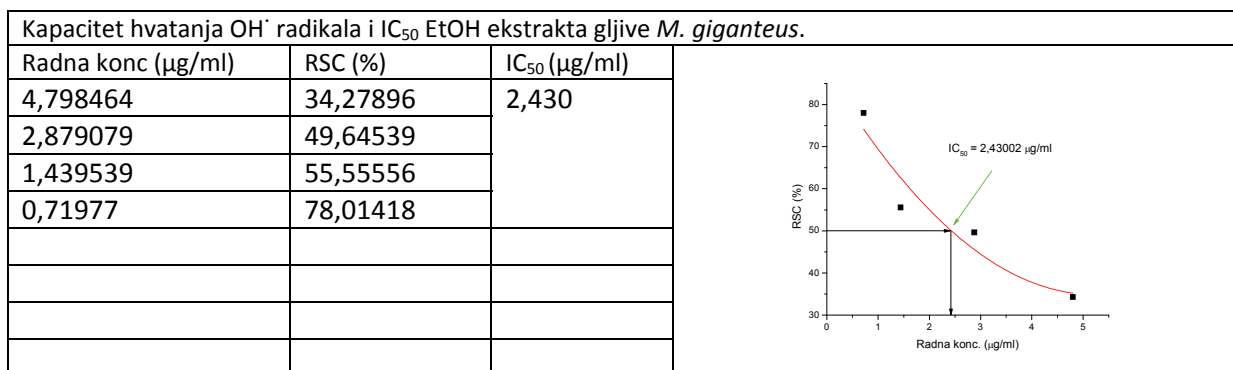
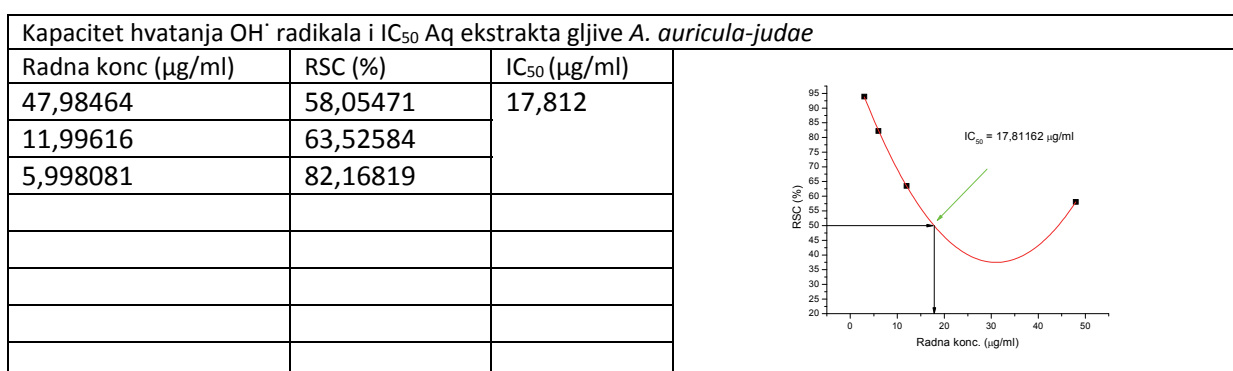
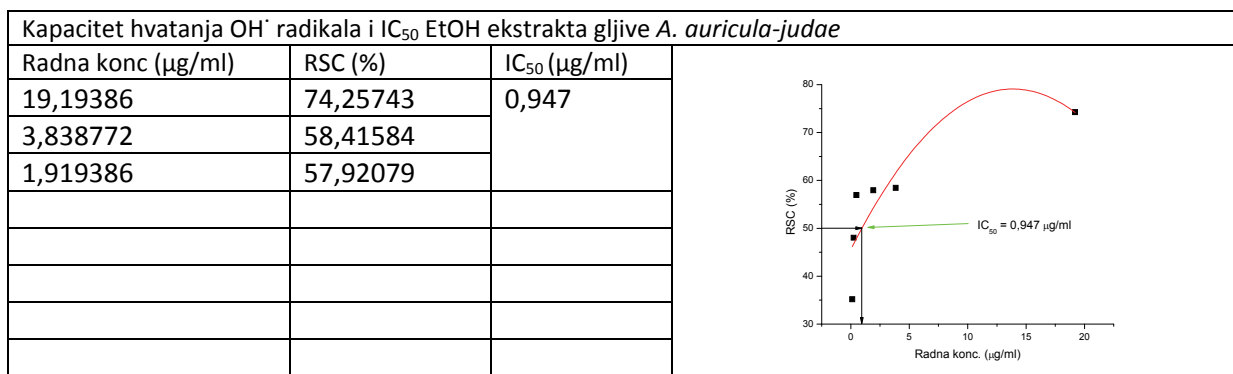
Kapacitet hvatanja DPPH <sup>•</sup> radikala i IC <sub>50</sub> Aq ekstrakta gljive <i>A. mellea</i> .		
Radna konc (µg/ml)	RSC (%)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
500	97,9288	48,402
250	82,39482	
125	62,71845	
62,5	60,90615	
31,248	42,91262	
15,624	40,97087	

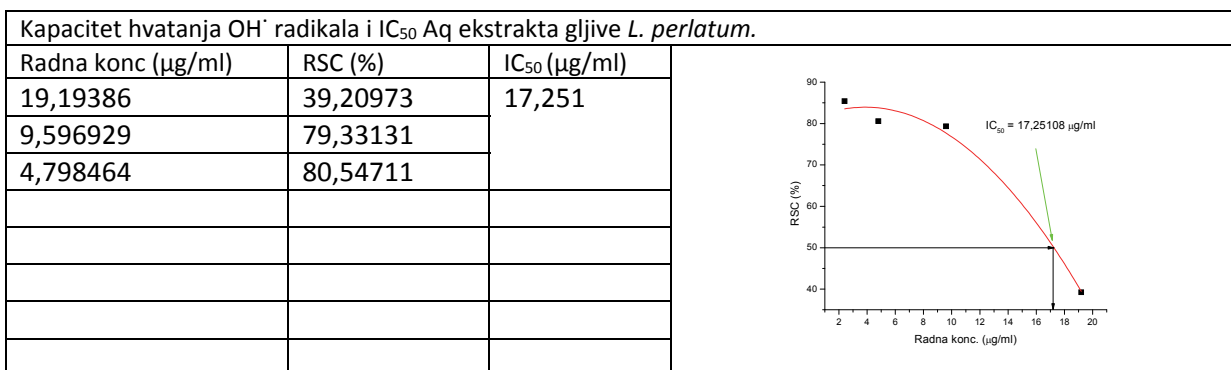
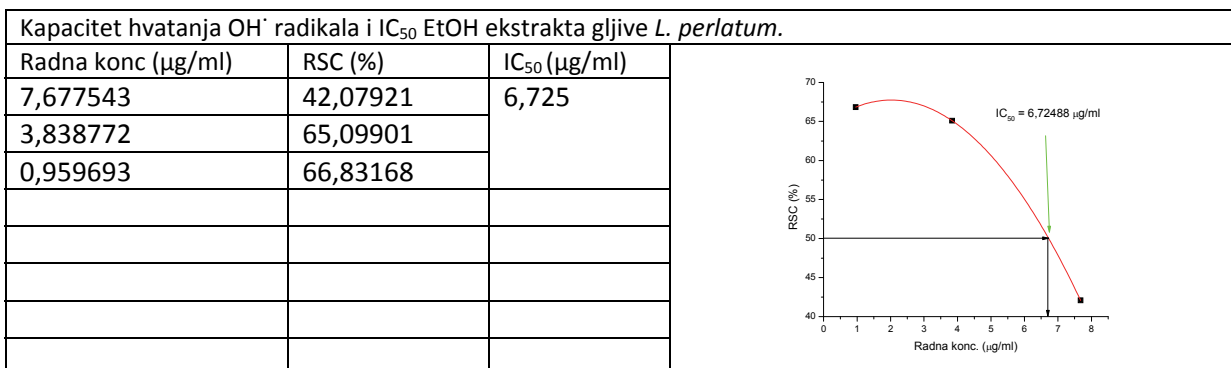
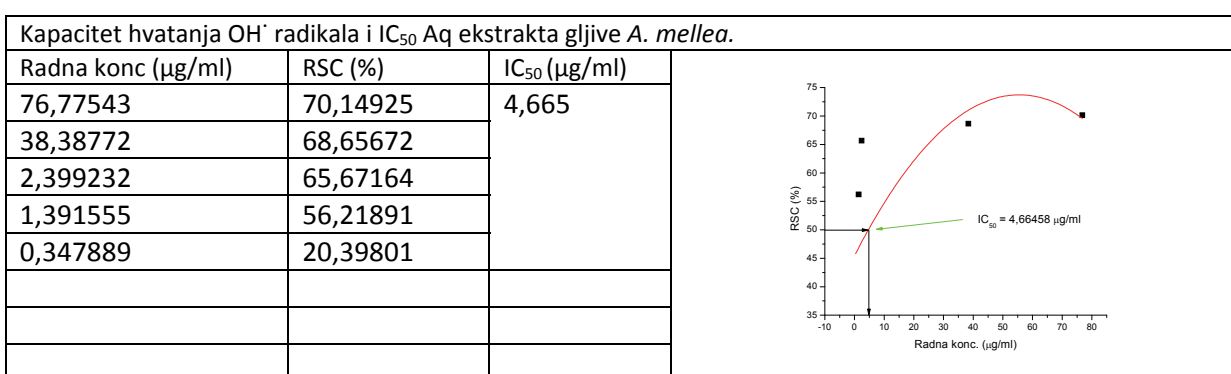
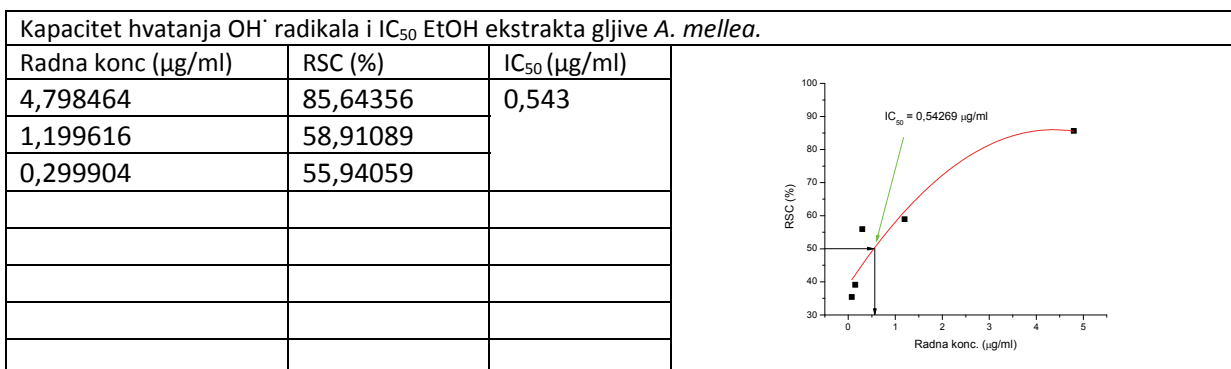




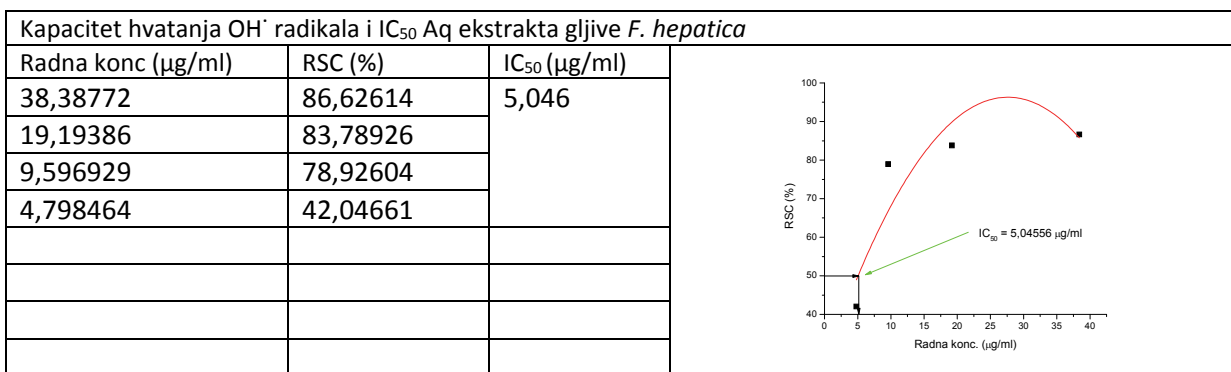
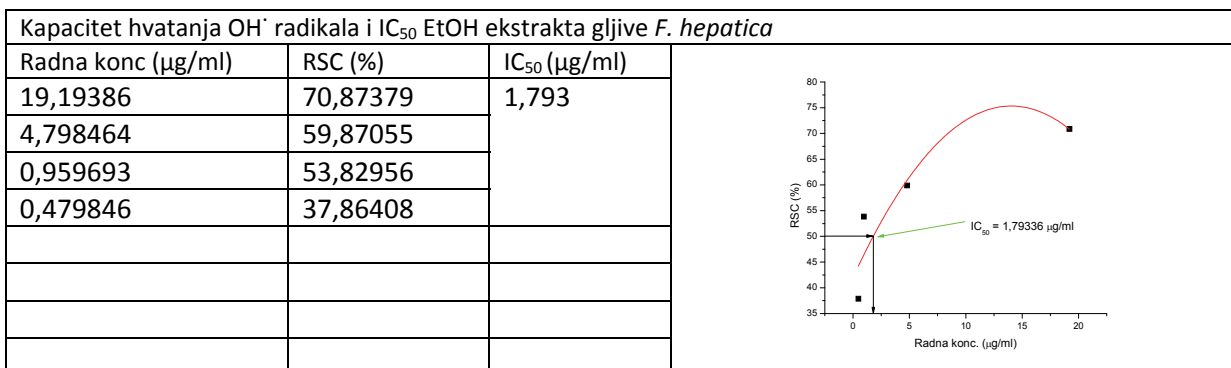
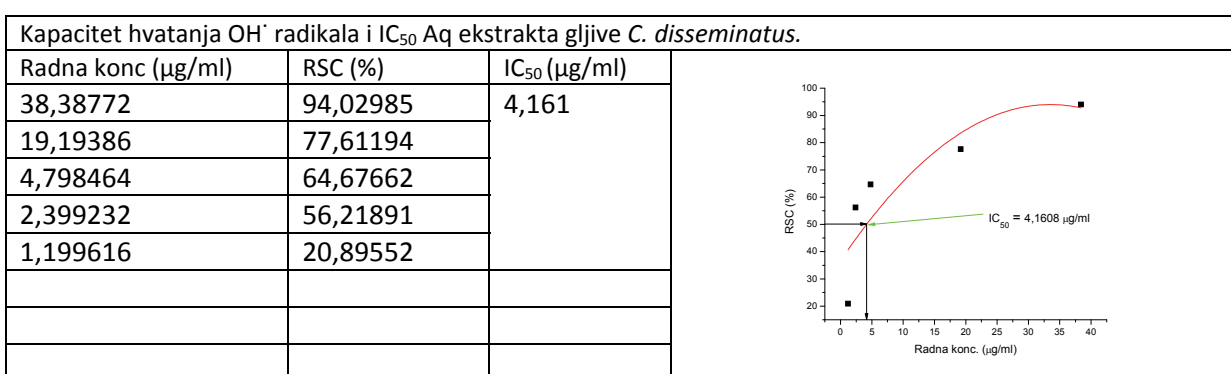
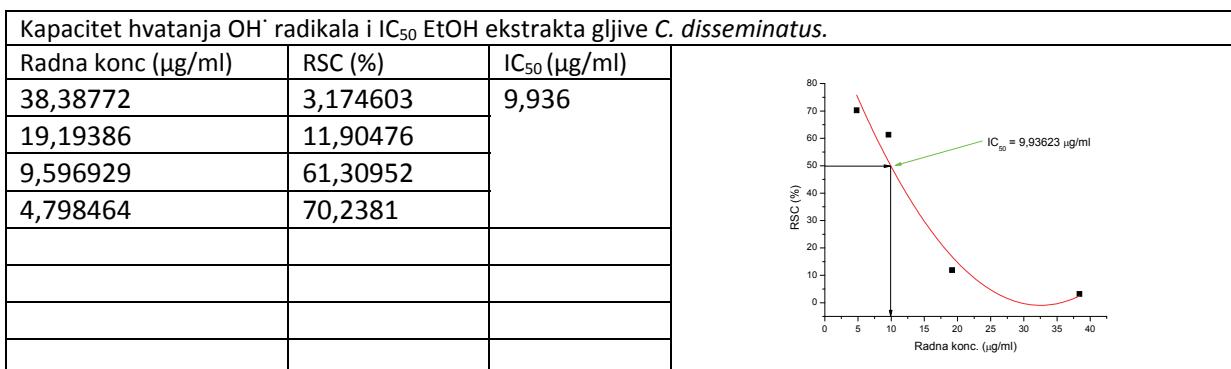


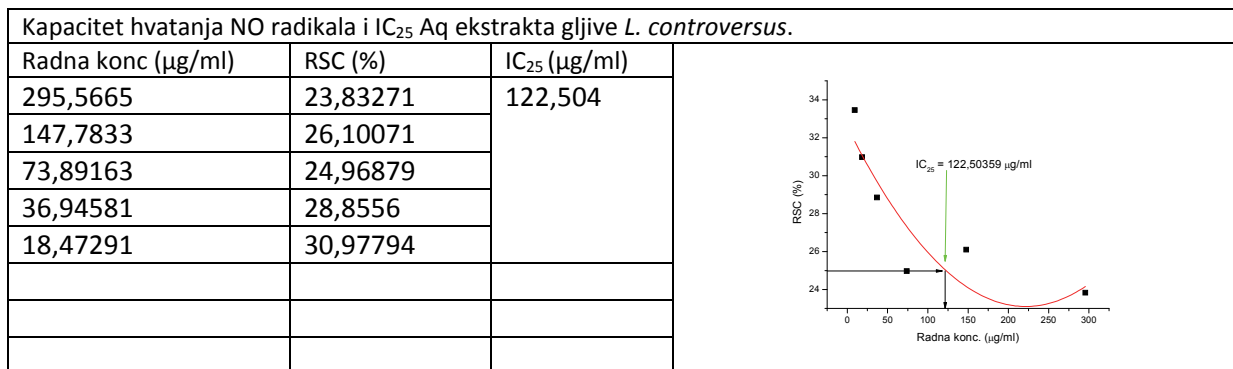
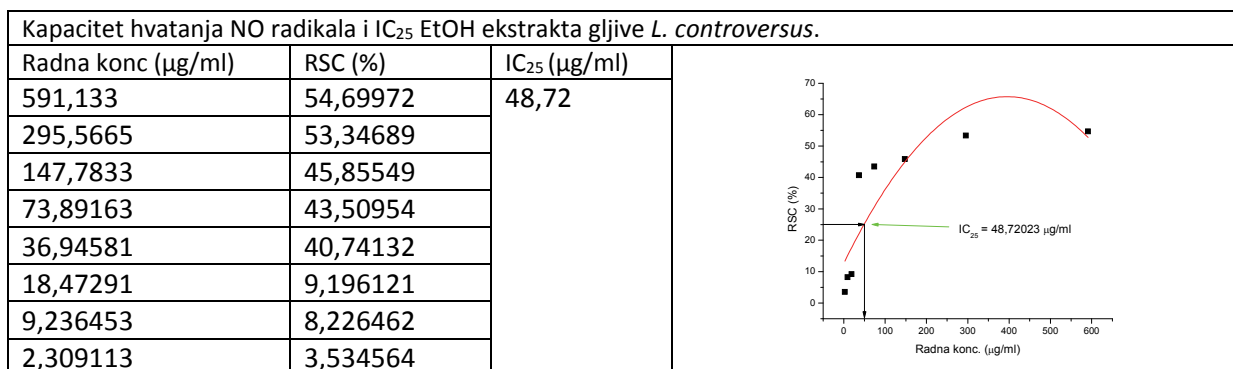
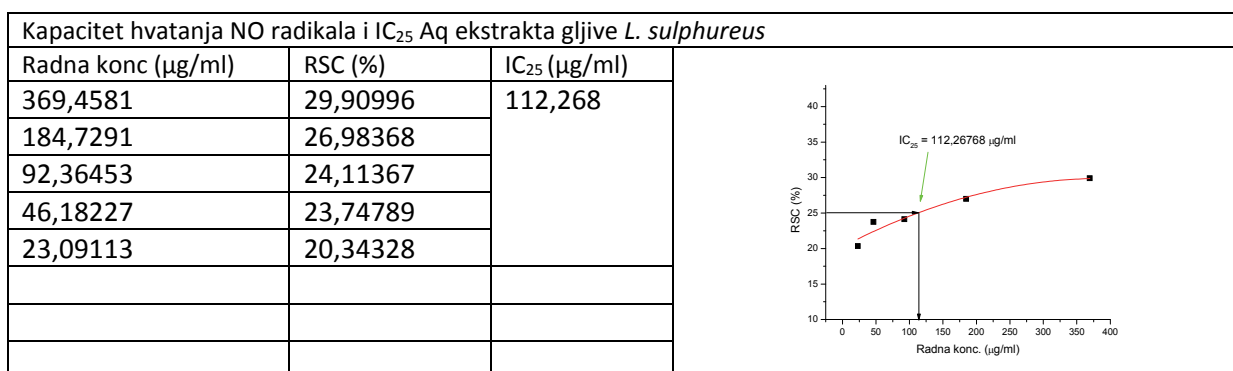
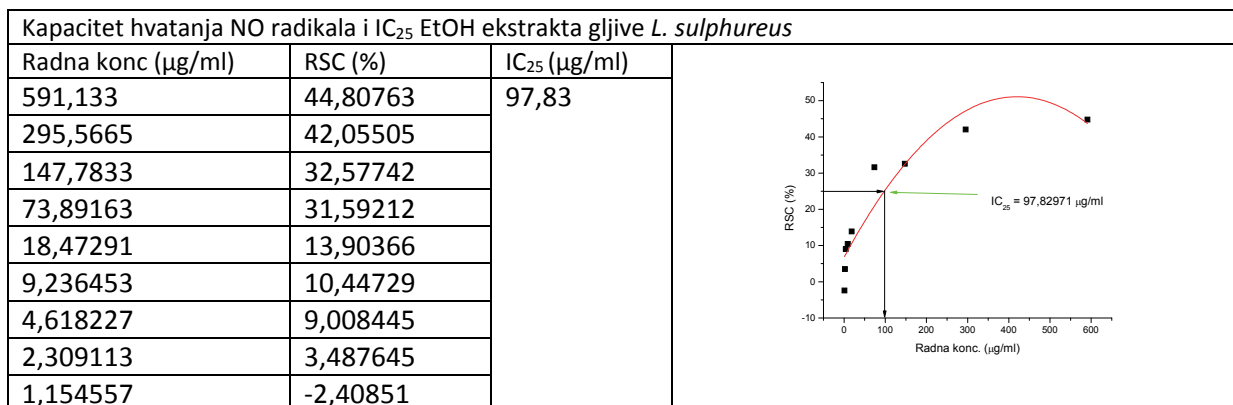


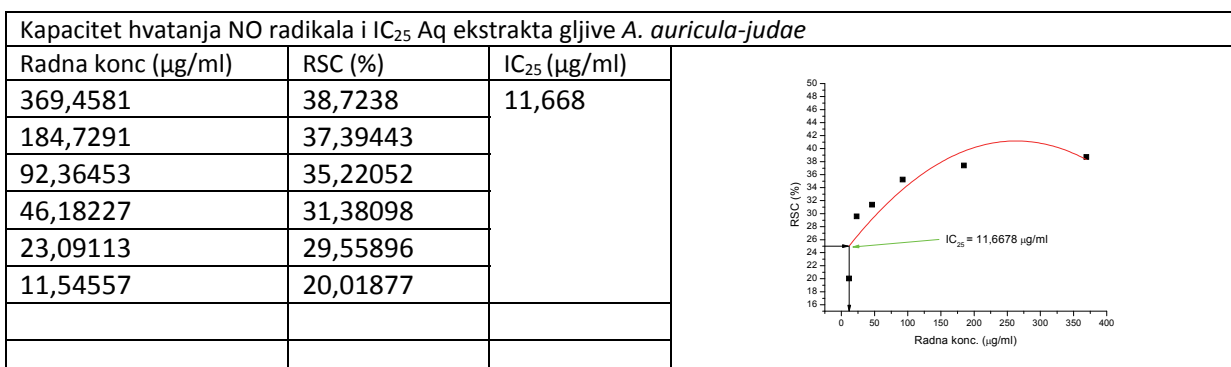
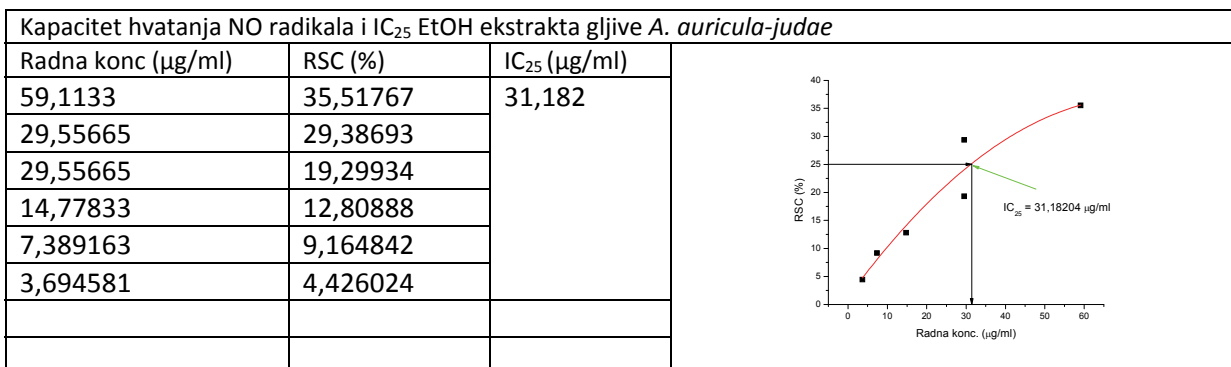
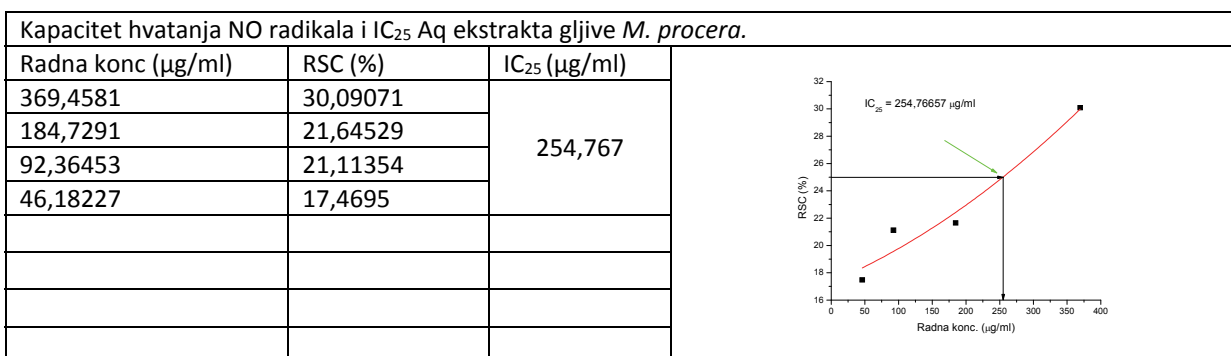
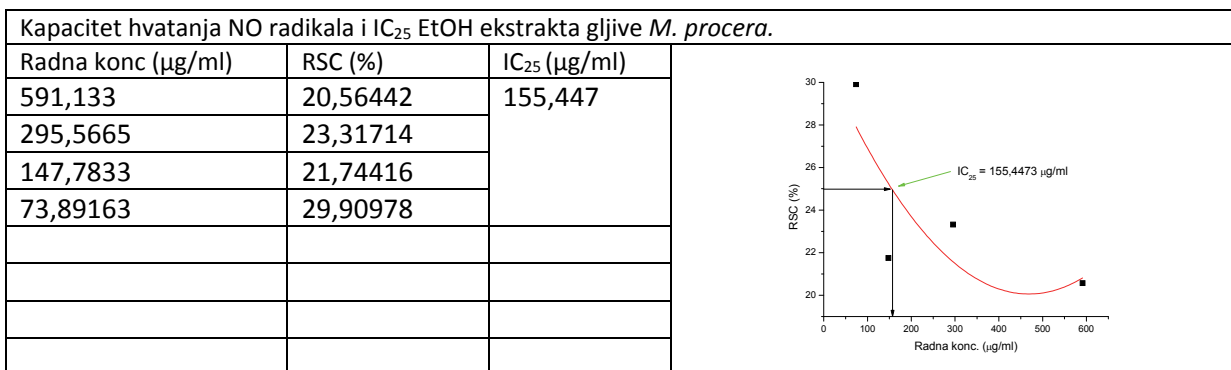


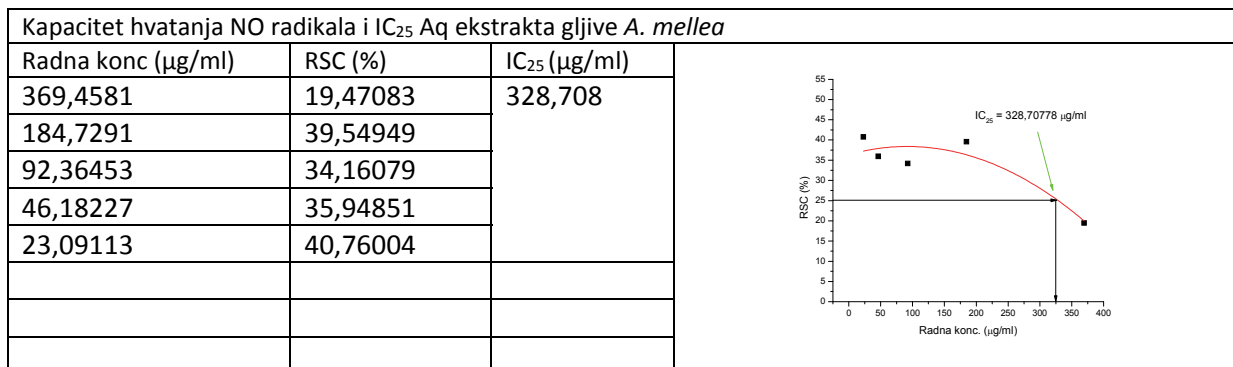
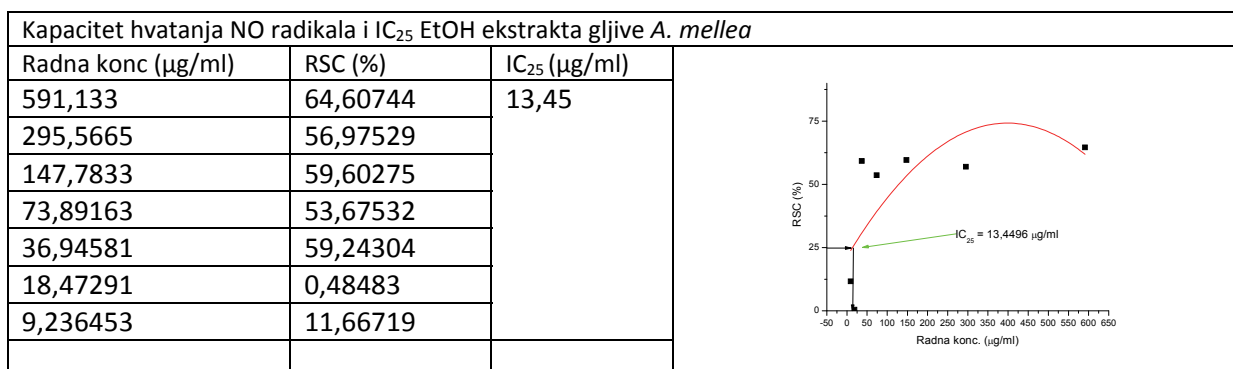
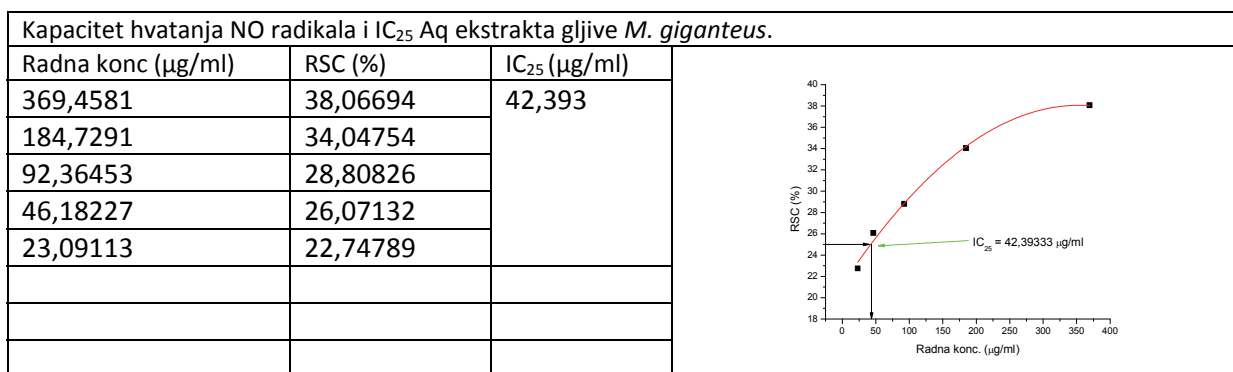
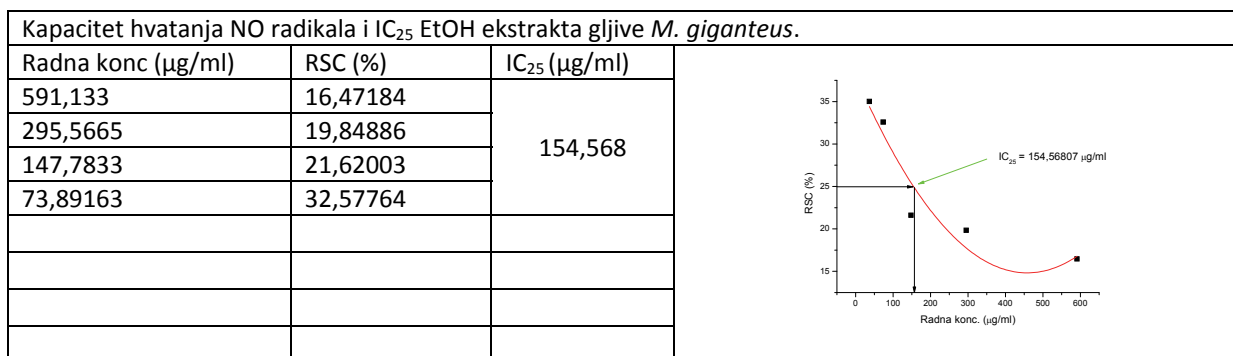


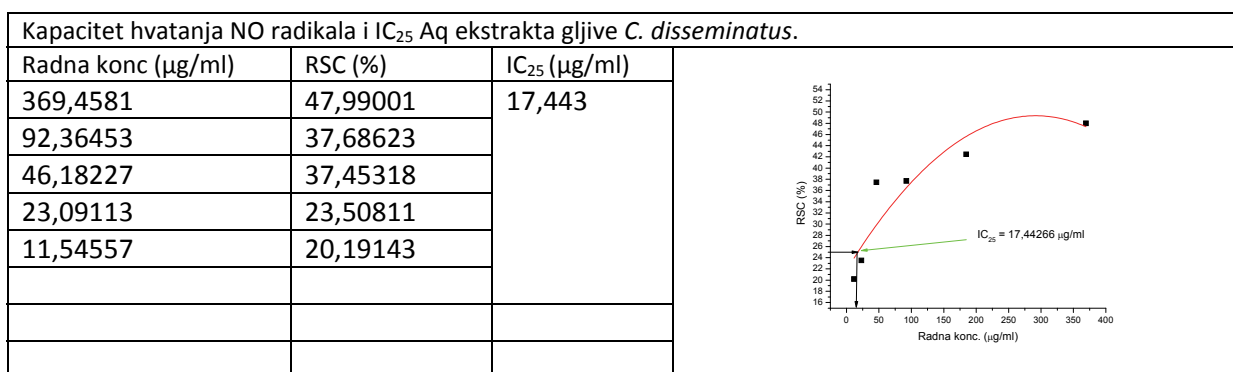
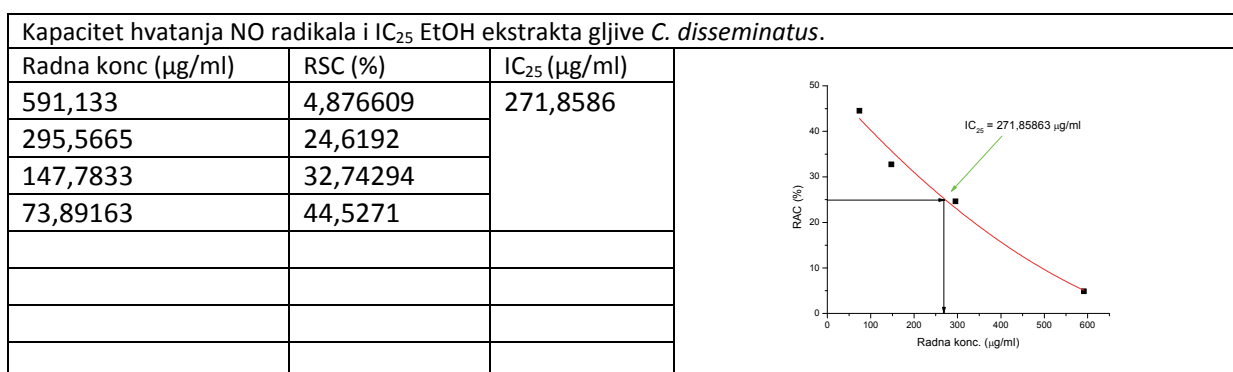
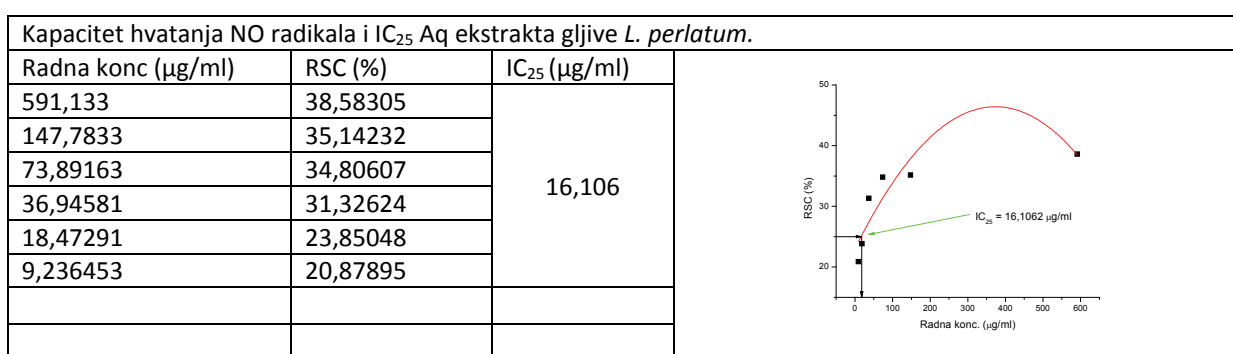
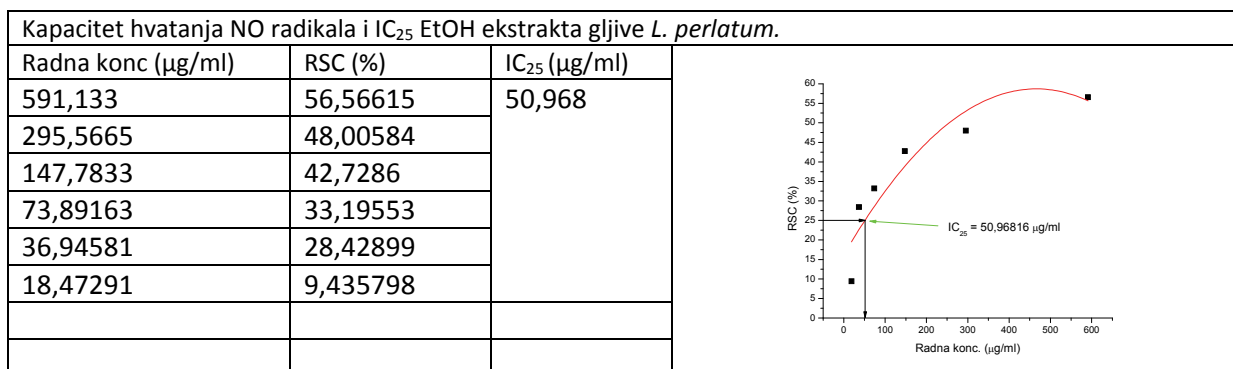


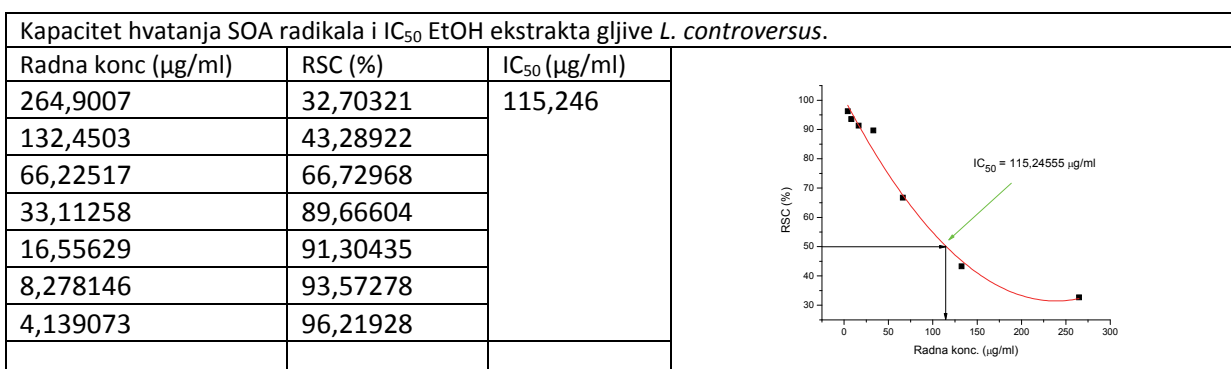
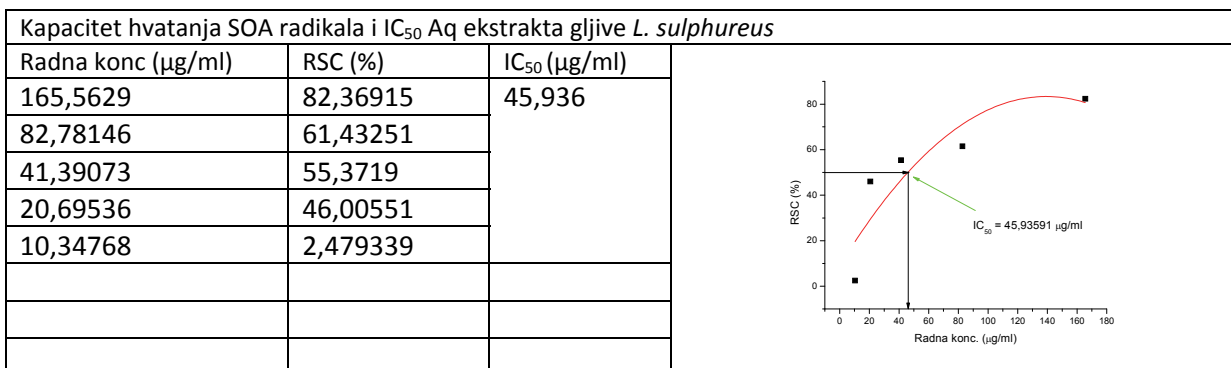
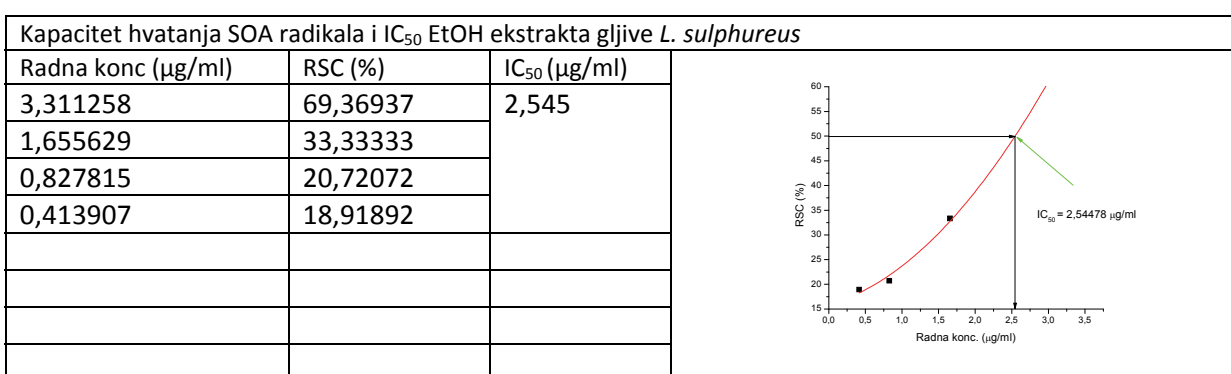
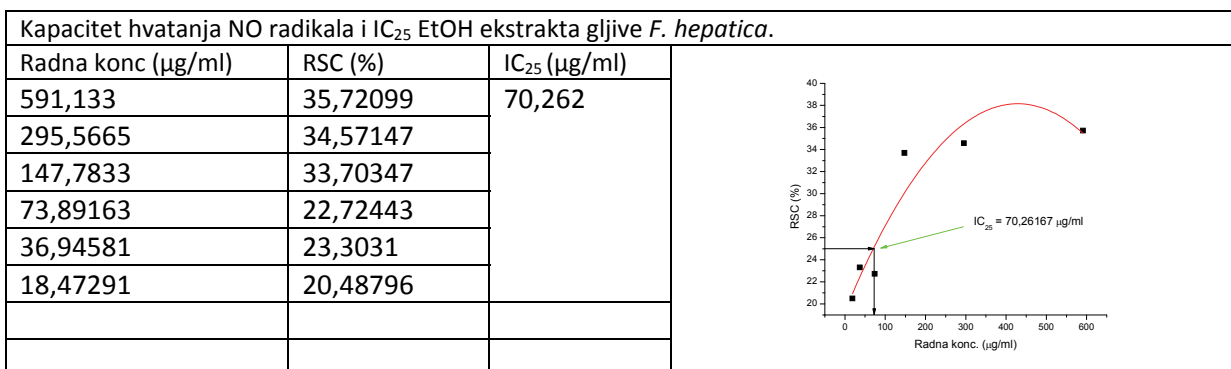




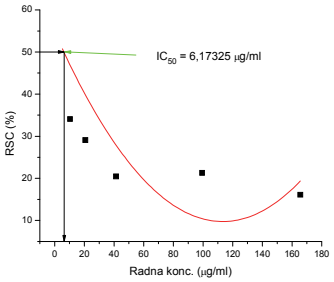




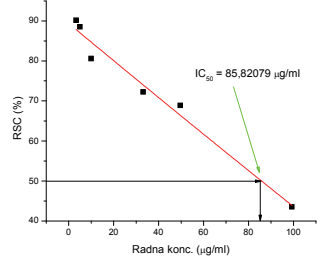




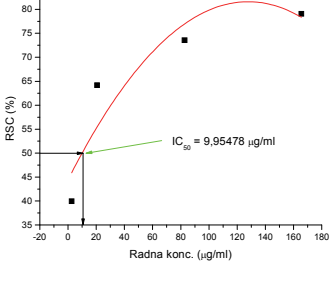
Kapacitet hvatanja SOA radikala i IC <sub>50</sub> Aq ekstrakta gljive <i>L. controversus</i> .		
Radna konc (µg/ml)	RSC (%)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
165,5629	16,09276	6,173
99,33775	21,29304	
41,39073	20,44975	
20,69536	29,07004	
10,34768	34,08292	
5,173841	74,13914	



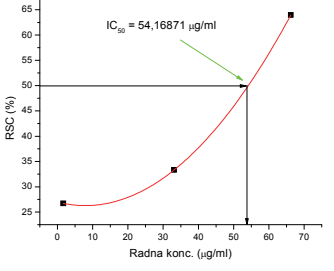
Kapacitet hvatanja SOA radikala i IC <sub>50</sub> EtOH ekstrakta gljive <i>M. procera</i> .		
Radna konc (µg/ml)	RSC (%)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
99,33775	43,54127	85,82079
49,66887	68,87209	
33,11258	72,27473	
9,933775	80,59231	
4,966887	88,53182	
3,311258	90,17013	

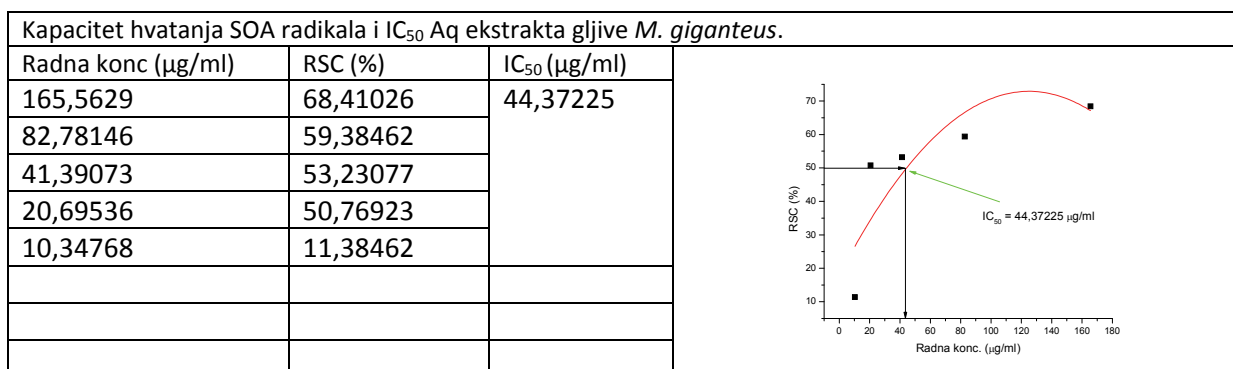
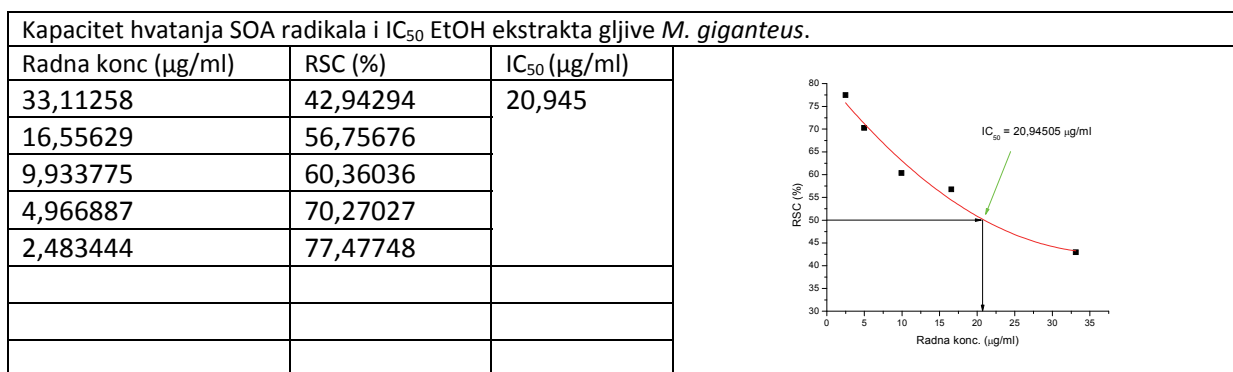
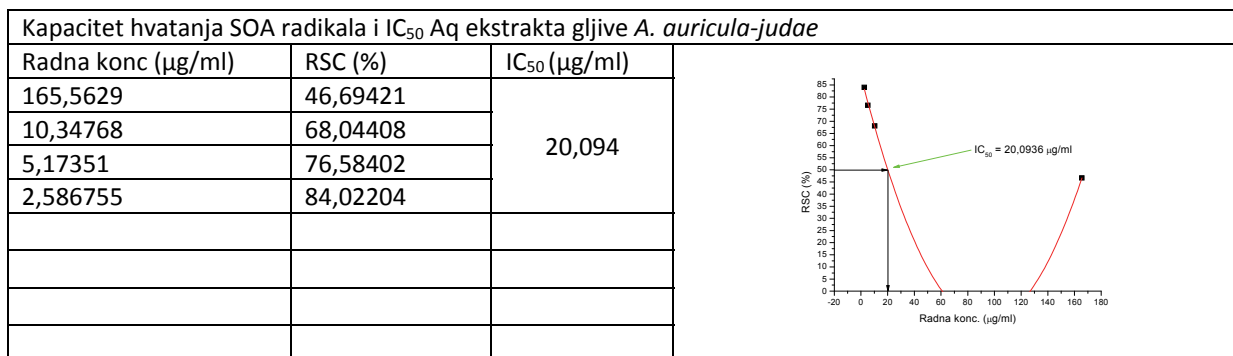


Kapacitet hvatanja SOA radikala i IC <sub>50</sub> Aq ekstrakta gljive <i>M. procera</i> .		
Radna konc (µg/ml)	RSC (%)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
165,5629	79,06336	9,955
82,78146	73,55372	
20,69536	64,18733	
2,586755	39,9449	

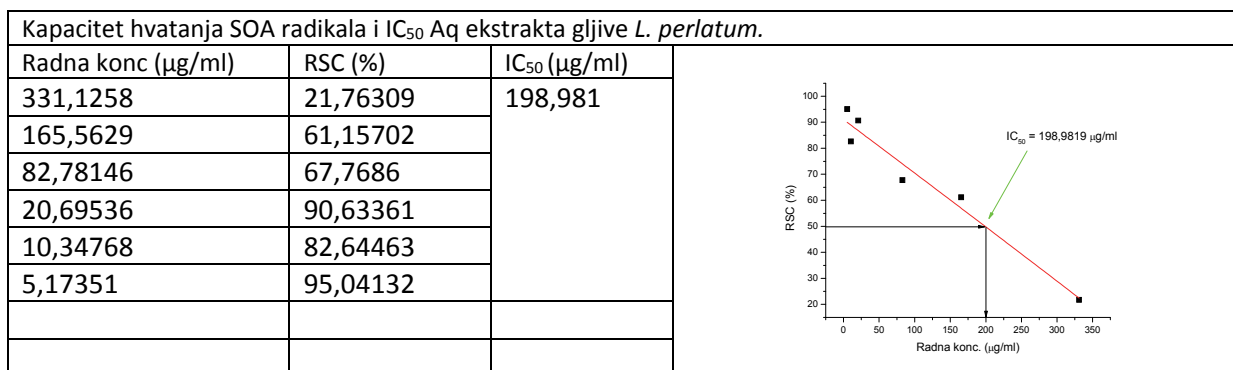
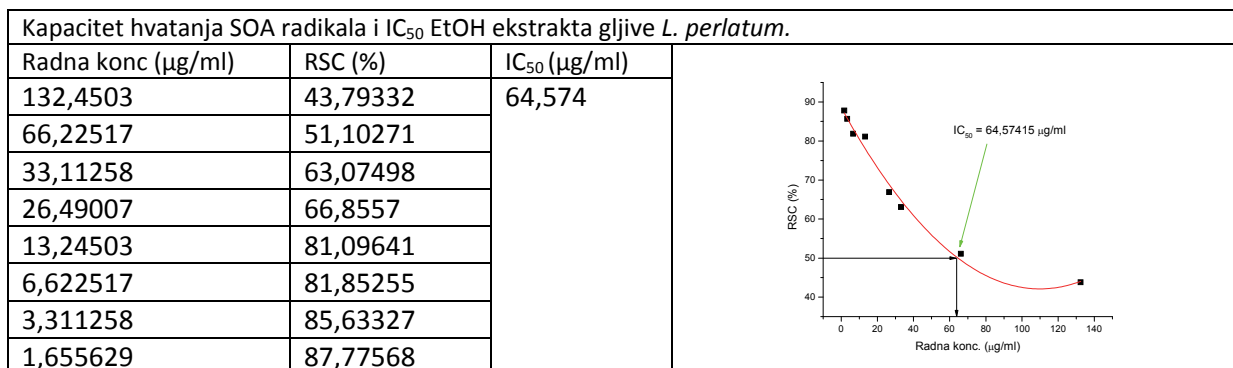
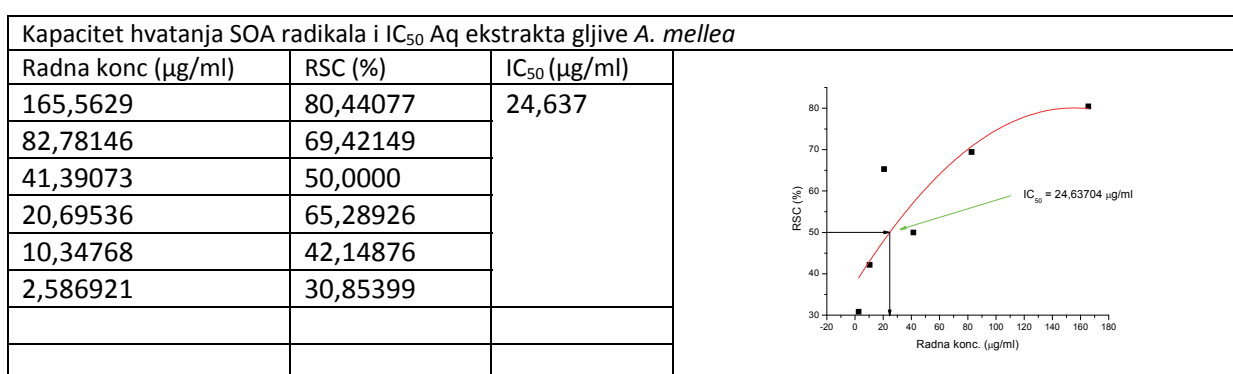
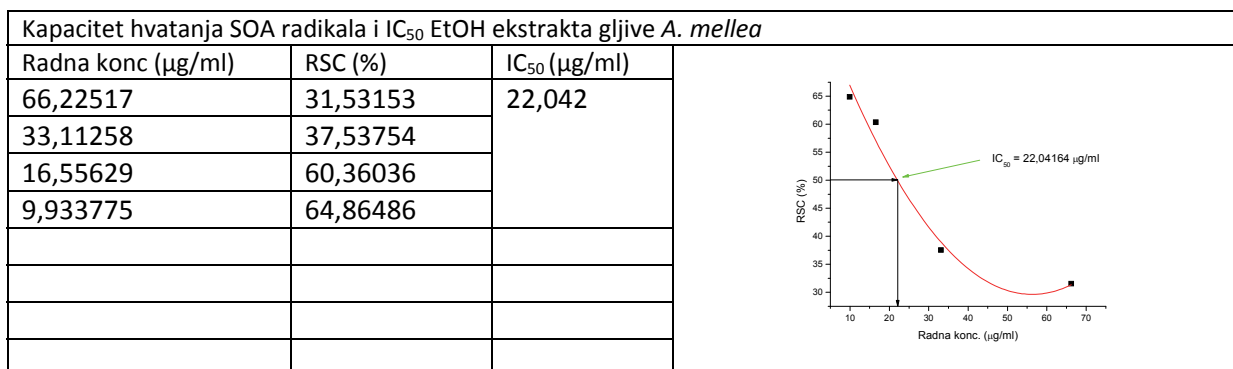


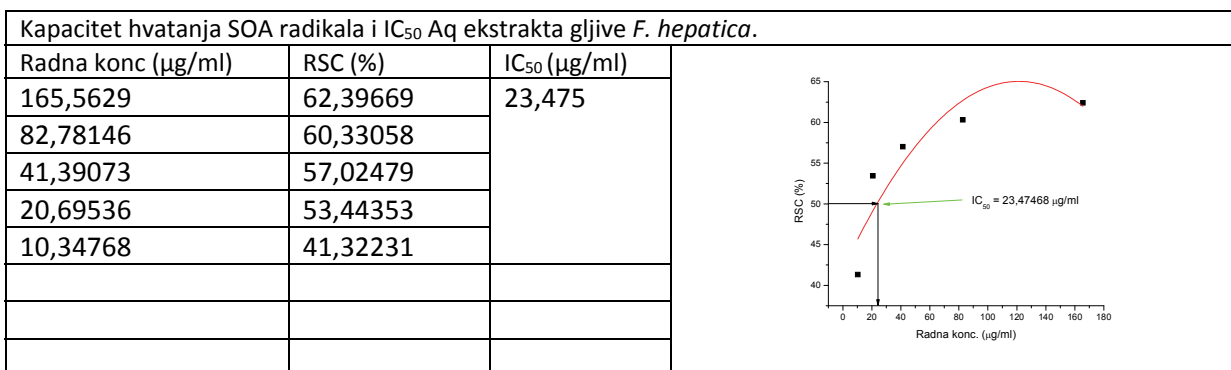
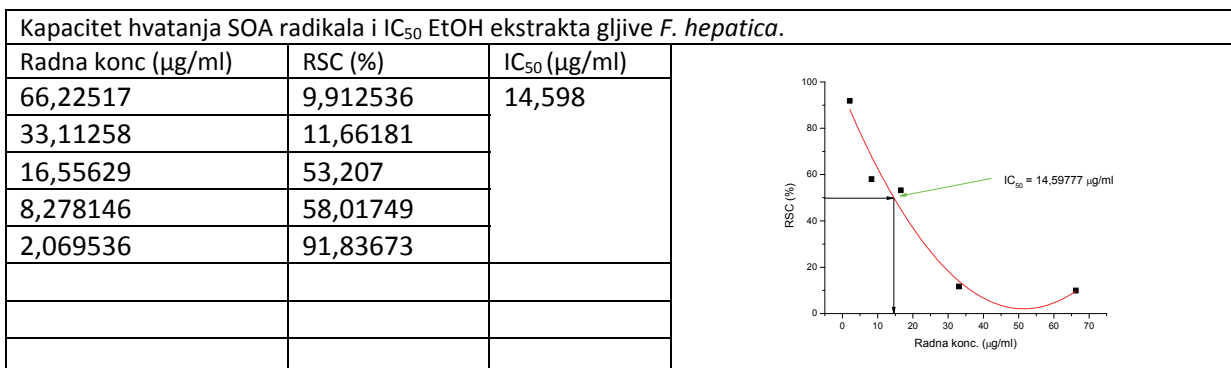
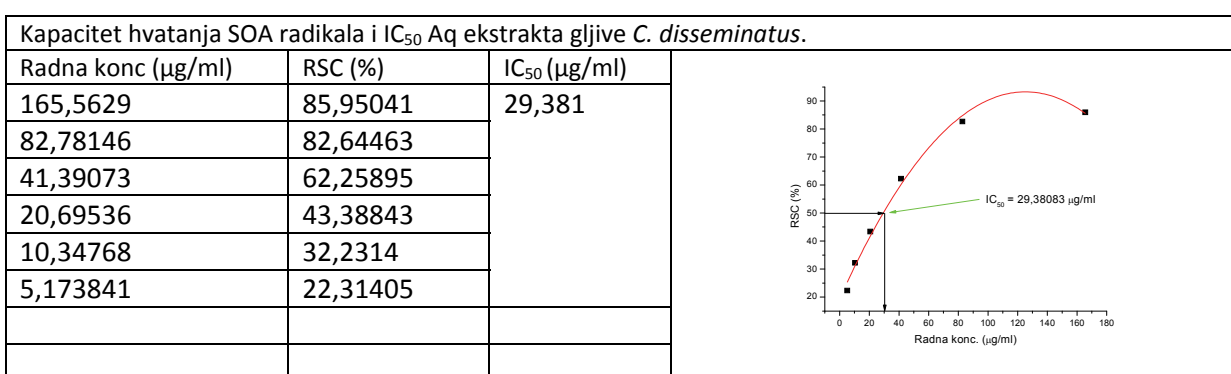
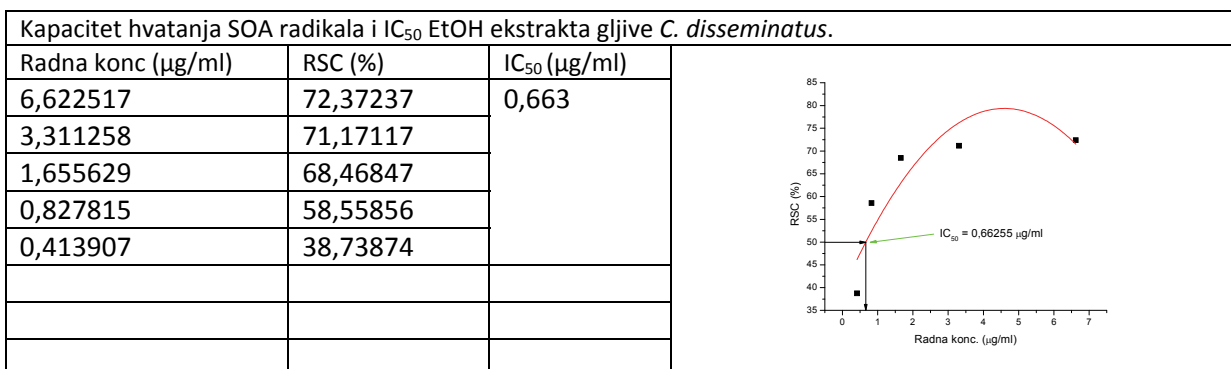
Kapacitet hvatanja SOA radikala i IC <sub>50</sub> EtOH ekstrakta gljive <i>A. auricula-judae</i>		
Radna konc (µg/ml)	RSC (%)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
66,22517	63,96396	54,169
33,11258	33,33333	
1,655629	26,72673	



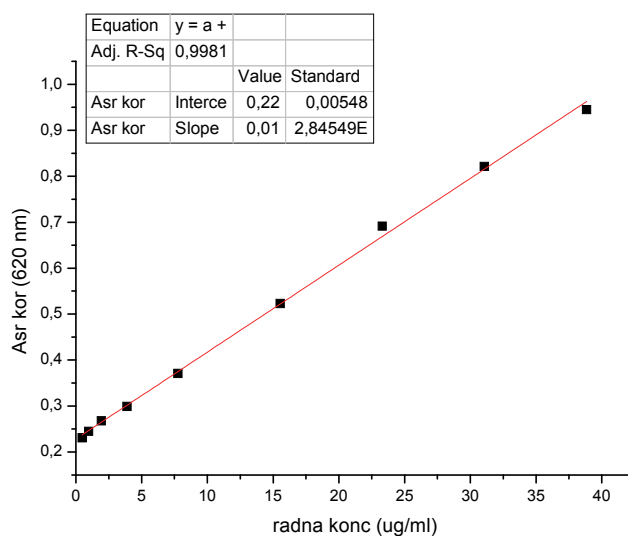








## PRILOG 8.6. Askorbinska kiselina



### Laetiporus sulphureus

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. AK (ug/ml)	mg ekv. AK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. AK (µg/ml)	mg ekv. AK/g suvog ostatka
1553,398	17,10924	11,01407	970,8738	14,27111	14,69924
776,699	9,08875	11,70177	485,4369	6,46233	13,3124
388,3495	4,54098	11,69302	242,7184	2,37285	9,776142
194,1748	1,12116	5,773974	121,3592	0,25761	2,122706
97,08738	0,24016	2,473648			
Srednja vrednost za etanolni ekstrakt gljive <i>L. contraversus</i> iznosi 10,935 mg ekvivalenta AK/ g suvog ekstrakta.			Srednja vrednost za vodeni ekstrakt gljive <i>L. sulphureus</i> iznosi 9,978 mg ekvivalenta AK/ g suvog ekstrakta.		

### Lactarius controversus

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. AK (ug/ml)	mg ekv. AK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. AK (µg/ml)	mg ekv. AK/g suvog ostatka
1553,398	22,34447	14,38425	1941,748	14,66771	7,553871
776,699	9,52925	12,26891	1165,049	2,84878	2,445203
388,3495	3,16607	8,15263	970,8738	4,06505	4,187002
194,1748	1,79116	9,224474	485,4369	0,4515	0,93009
97,08738	1,03337	10,64371			
Srednja vrednost za etanolni ekstrakt gljive <i>L. contraversus</i> iznosi 10,935 mg ekvivalenta AK/ g suvog ekstrakta.			Srednja vrednost za vodeni ekstrakt gljive <i>L. contraversus</i> iznosi 3,779 mg ekvivalenta AK/ g suvog ekstrakta.		

**Macrolepiota procera**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. AK (ug/ml)	mg ekv. AK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. AK (µg/ml)	mg ekv. AK/g suvog ostatka
776,699	17,19702	22,14116	1165,049	22,86429	19,62518
388,3495	9,58214	24,67401	776,699	7,85486	10,11313
194,1748	4,85826	25,02004	485,4369	5,84538	12,04148
97,08738	1,08625	11,18837	242,7184	1,82641	7,524809
58,25243	0,53946	9,26073	121,3592	0,15184	1,251162
29,12621	0,20473	7,029064			
Srednja vrednost za etanolni ekstrakt gljive <i>M. procera</i> iznosi 16,552 mg ekvivalenta AK/ g suvog ekstrakta.			Srednja vrednost za vodeni ekstrakt gljive <i>M. procera</i> iznosi 10,111 mg ekvivalenta AK/ g suvog ekstrakta.		

**Auriculaia auricula-judae**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. AK (ug/ml)	mg ekv. AK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. AK (µg/ml)	mg ekv. AK/g suvog ostatka
1553,398	46,84588	30,15704	970,8738	20,19379	20,7996
776,699	25,86952	33,30701	485,4369	9,86434	20,32054
388,3495	13,84806	35,65875	242,7184	3,61556	14,89611
194,1748	6,0391	31,10136	121,3592	1,26235	10,40176
97,08738	1,98523	20,44787			
Srednja vrednost za etanolni ekstrakt gljive <i>A. auricula-judae</i> iznosi 30,134 mg ekvivalenta AK/ g suvog ekstrakta.			Srednja vrednost za vodeni ekstrakt gljive <i>A. auricula-judae</i> iznosi 16,605 mg ekvivalenta AK/ g suvog ekstrakta.		

**Meripilus giganteus**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. AK (ug/ml)	mg ekv. AK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. AK (µg/ml)	mg ekv. AK/g suvog ostatka
194,1748	0,354	1,8231	1941,748	23,2609	11,97936
97,08738	0,285	2,9355	1553,398	17,9199	11,53594
58,25243	0,253	4,343166	970,8738	10,27858	10,58694
29,12621	0,232333	7,976779	776,699	7,79317	10,03371
14,56311	0,232333	15,95355	485,4369	4,4881	9,245486
7,28155	0,232333	31,90713			
Srednja vrednost za etanolni ekstrakt gljive <i>M. giganteus</i> iznosi 10,823 mg ekvivalenta AK/ g suvog ekstrakta			Srednja vrednost za vodeni ekstrakt gljive <i>M. giganteus</i> iznosi 10,676 mg ekvivalenta AK/ g suvog ekstrakta.		

**Armillaria mellea**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. AK (ug/ml)	mg ekv. AK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. AK (µg/ml)	mg ekv. AK/g suvog ostatka
776,699	16,50956	21,25606	485,4369	16,45686	33,90113
388,3495	5,42251	13,96296	242,7184	7,39656	30,47383
194,1748	1,9498	10,04147	121,3592	2,35522	19,40701
97,08738	1,36811	14,09153	60,67961	0,04608	0,759398
58,25243	0,13439	2,307028			
Srednja vrednost za etanolni ekstrakt gljive <i>A. mellea</i> iznosi 12,332 mg ekvivalenta AK/ g suvog ekstrakta.			Srednja vrednost za vodeni ekstrakt gljive <i>A. mellea</i> iznosi 21,135 mg ekvivalenta AK/ g suvog ekstrakta.		

**Lycoperdon perlatum**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µmg/ml)	Očitana konc. AK (ug/ml)	mg ekv. AK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. AK (µg/ml)	mg ekv. AK/g suvog ostatka
776,699	17,86702	23,00379	1165,049	32,7795	28,13574
388,3495	9,01842	23,22243	970,8738	25,61411	26,38253
194,1748	3,27183	16,84992	485,4369	11,53891	23,77015
97,08738	2,21421	22,80636	242,7184	5,03453	20,74226
58,25243	1,36811	23,48589	121,3592	1,9498	16,06635
			60,67961	0,04608	60,67961
Srednja vrednost za etanolni ekstrakt gljive L. perlatum iznosi 21,874 mg ekvivalenta AK/ g suvog ekstrakta.			Srednja vrednost za vodeni ekstrakt gljive L. perlatum iznosi 19,309 mg ekvivalenta AK/ g suvog ekstrakta.		

**Coprinus disseminatus**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µmg/ml)	Očitana konc. AK (ug/ml)	mg ekv. AK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. AK (µg/ml)	mg ekv. AK/g suvog ostatka
1553,398	29,35968	18,90029	1941,748	9,14164	4,707945
776,699	11,39807	14,67502	1553,398	7,18503	4,625363
388,3495	3,60657	9,286918	776,699	1,73828	2,238036
194,1748	1,61506	8,317559			
97,08738	-0,23577	-2,42843			
Srednja vrednost za etanolni ekstrakt gljive C. disseminatus iznosi 9,75 mg ekvivalenta AK/ g suvog ekstrakta.			Srednja vrednost za vodeni ekstrakt gljive C. disseminatus iznosi 3,857 mg ekvivalenta AK/ g suvog ekstrakta.		

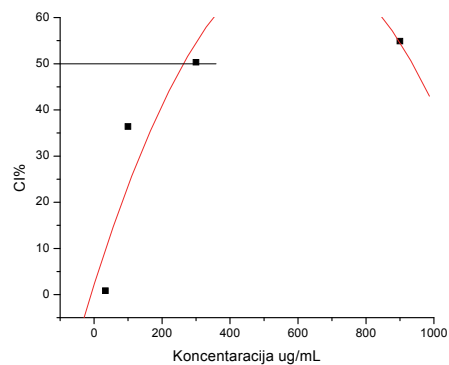
**Fistulina hepatica**

Etanolni ekstrakt			Vodeni ekstrakt		
Radna konc. (µmg/ml)	Očitana konc. AK (ug/ml)	mg ekv. AK/g suvog ostatka	Radna konc. (µg/ml)	Očitana konc. AK (µg/ml)	mg ekv. AK/g suvog ostatka
776,699	35,52932	45,744	485,4369	21,35718	43,99579
388,3495	17,74381	45,69031	242,7184	10,12875	41,73045
194,1748	10,60486	54,61503	121,3592	3,58912	29,57435
97,08738	3,94183	40,60085	60,67961	0,50438	8,312182
58,25243	3,97674	68,26737			
29,12621	1,80861	62,09562			
Srednja vrednost za etanolni ekstrakt gljive F. hepatica iznosi 52,836 mg ekvivalenta AK/ g suvog ekstrakta.			Srednja vrednost za vodeni ekstrakt gljive F. hepatica iznosi 30,903 mg ekvivalenta AK/ g suvog ekstrakta.		

## PRILOG 8.7. Antiproliferativna aktivnosti

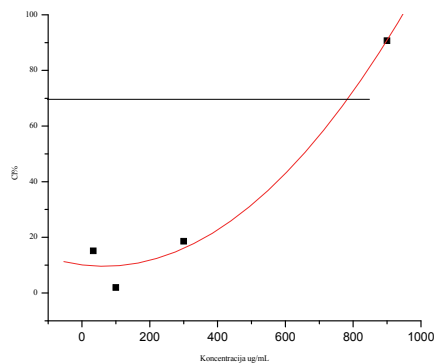
LSZAqMTT 24 h

C µg/mL	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	54,88572	55,28321	55,48195	55,21696
300	50,31467	47,33355	46,33985	47,99603
100	36,40	33,42	30,64	33,48791
33,3	0,83	2,42	2,82	2,020537
$r^2$				
IC <sub>50</sub>	260,582			



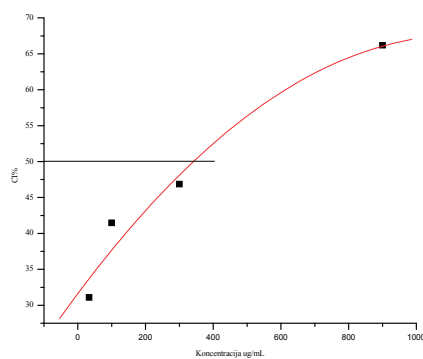
LSZEtOH MTT 24h

C µg/mL	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	90,37199	92,12254	89,49672	90,66375
300	23,8512	21,22538	10,7221	18,59956
100	2,844639	1,094092	1,969365	1,969365
33,3	13,34792	20,35011	11,59737	15,09847
$r^2$				0,9336
IC <sub>50</sub>	607,407	648,677	697,089	660,317



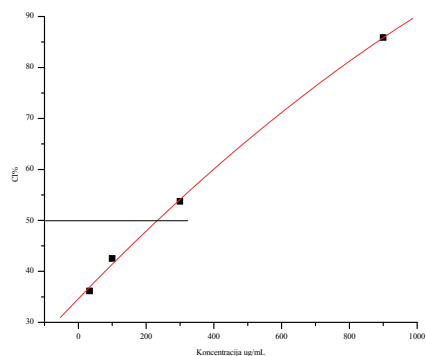
LSZAq MTT 72h

C µg/mL	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	73,01267	62,87865	62,65834	66,18322
300	41,72939	48,8893	49,99082	46,86984
100	45,14412	37,87406	41,39894	41,47237
33,3	31,70553	32,03598	29,50248	31,08133
$r^2$				0,9453
IC <sub>50</sub>	460,317	322,222	277,153	347,089



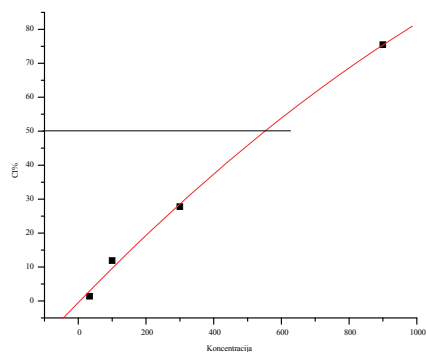
LSZEtOH MTT 72h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	84,24821	90,7472	82,59592	85,86378
300	59,02332	51,53295	50,65173	53,736
100	50,76189	38,31467	38,53497	42,53718
33,3	48,33853	25,64715	34,45934	36,14834
$r^2$				0,9966
IC <sub>50</sub>	78,306	265,343	297,883	238,624



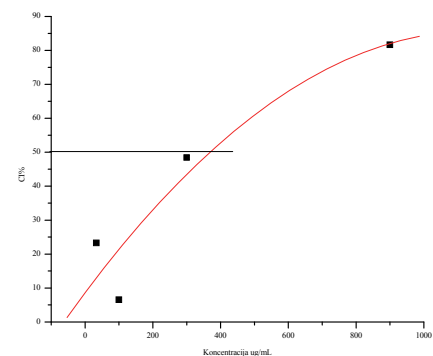
LSZAq SRB 24h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	78,33935	77,72047	70,29397	75,45126
300	13,3574	31,92367	38,11243	27,79783
100	35,01805	3,455389	-2,73337	11,91336
33,3	-4,58999	6,549768	2,217638	1,39247
$r^2$				0,9953
IC <sub>50</sub>	659,523	525,396	442,328	542,4157



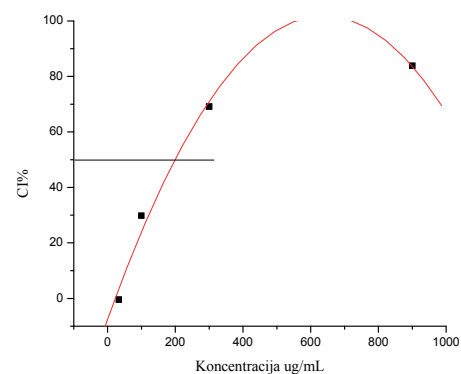
LSZEtOH SRB 24h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	78,95823	89,47911	76,48224	81,63986
300	74,00242	25,11604	46,15781	48,42542
100	-5,82775	-8,92212	34,39917	6,549768
33,3	-16,9675	40,58793	46,15781	23,25941
$r^2$				0,8763
IC <sub>50</sub>	228,835	688,624	689,417	371,693



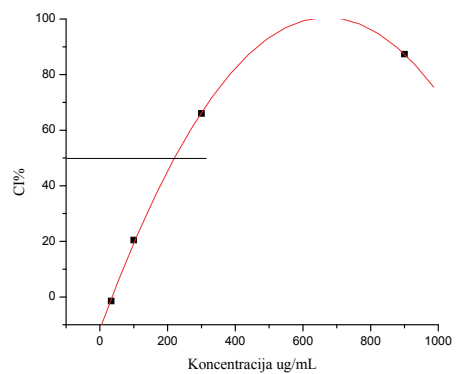
LSZAq SRB 72h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	81,687	86,477	83,237	83,800
300	68,863	68,306	70,27	69,151
100	28,160	36,330	24,920	29,803
33,3	3,8150	-0,575	3,0872	-0,434
$r^2$				0,9879
IC <sub>50</sub>	204,555	196,56	194,973	199,735



LSZEtOH SRB 72h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	89,04847397	85,27828	87,79174	87,37283
300	63,73429084	73,78815	60,50269	66,00838
100	17,59425494	24,59605	19,21005	20,46679
33,3	8,438061041	-0,5386	-12,3878	-1,49611
$r^2$				0,9771
$IC_{50}$	227,513	192,857	236,772	236,776





Mer Aq MTT 24h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	26,13636	12,87879	12,5	17,17172
300	12,5	9,848485	3,787879	8,712121
100	20,07576	1,136364	1,893939	7,70202
33,3	10,22727	-2,2E-14	-6,81818	1,136364
$r^2$				
$IC_{50}$				

MerEtOH MTT 24h

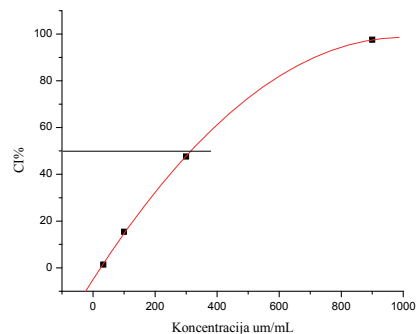
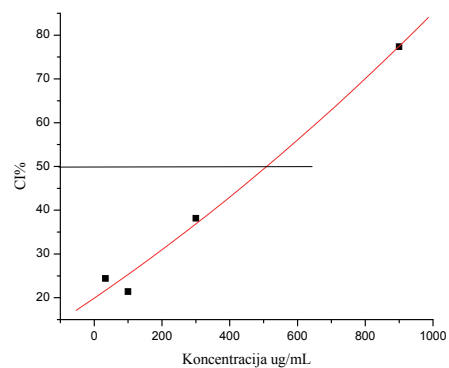
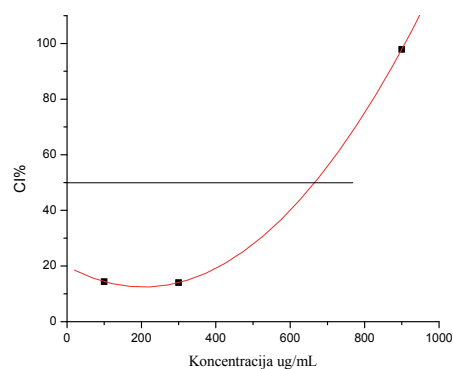
C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	99,24242	98,86364	95,45455	97,85354
300	6,439394	17,80303	17,80303	14,01515
100	-18,5606	-15,9091	-8,71212	-14,3939
33,3	-15,9091	-8,6364	-16,2879	-40,2778
$r^2$				1,00
$IC_{50}$	629,894	390,74	554,497	667,86

MerAq MTT 72h

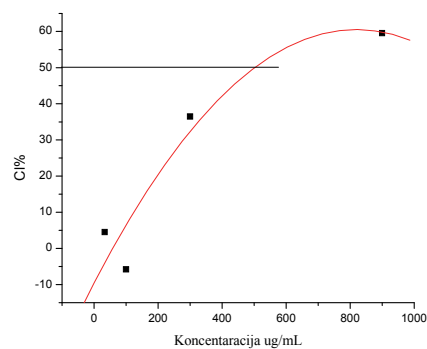
C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	85,07246	72,75362	74,2029	77,343
300	41,30435	42,31884	30,86957	38,16425
100	29,27536	17,53623	17,3913	21,40097
33,3	9,565217	39,27536	24,34783	24,39614
$r^2$				0,9865
$IC_{50}$	366,93	562,69	631,21	505,82

MerEtOH MTT 72h

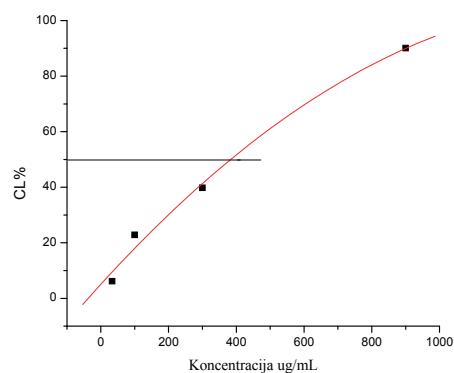
C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	97,3913	98,11594	97,10145	97,53623
300	52,02899	45,07246	45,65217	47,58454
100	21,73913	10,0021	14,49275	15,41133
33,3	0,289855	1,594203	2,173913	1,352657
$r^2$				0,9678
$IC_{50}$	273,54	337,83	330,42	313,49



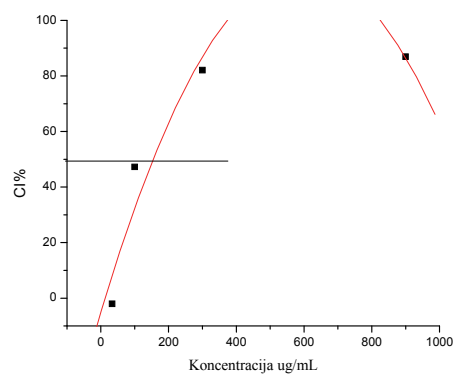
Mer Aq SRB 24h				
C $\mu\text{g/mL}$	Cl%	Cl%	Cl%	Srednja vrednost
900	66,61608	58,11836	53,8695	59,53465
300	30,19727	48,40668	30,80425	36,4694
100	-8,04249	-6,22155	-3,18665	-5,81689
33,3	3,490137	4,097117	5,918058	4,50177
$r^2$	0,8001			
IC <sub>50</sub>	581,216	350,529	671,693	509,380



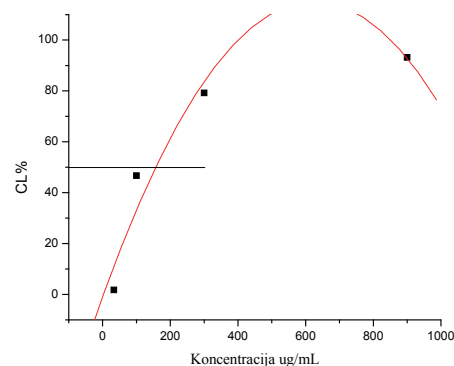
Mer EtOH SRB 24h				
C $\mu\text{g/mL}$	Cl%	Cl%	Cl%	Srednja vrednost
900	93,81124	90,71686	85,76586	90,09799
300	25,73491	34,39917	59,1542	39,76276
100	41,20681	13,97628	13,3574	22,84683
33,3	-0,87674	17,07065	2,3854	6,193105
$r^2$	0,9826			
IC <sub>50</sub>	497,708	497,619	218,941	358,73



Mer Aq SRB 72 h				
C $\mu\text{g/mL}$	Cl%	Cl%	Cl%	Srednja vrednost
900	86,19556286	86,75901	87,8859	86,94682
300	78,87075948	88,02676	79,29334	82,06362
100	47,74034511	47,1769	46,89518	47,27081
33,3	-0,2934	-5,08276	-0,71605	-2,03075
$r^2$	0,9002			
IC <sub>50</sub>	158,465	156,084	156,084	155,026



Mer EtOH SRB 72h				
C $\mu\text{g/mL}$	Cl%	Cl%	Cl%	Srednja vrednost
900	94,22467426	93,23864	91,97089	93,14474
300	77,88472825	79,57507	80,13851	79,19944
100	46,89517549	45,90914	47,1769	46,66041
33,3	1,115154361	-0,1526	4,354971	1,772509
$r^2$	0,9513			
IC <sub>50</sub>	160,317	164,285	147,354	155,555

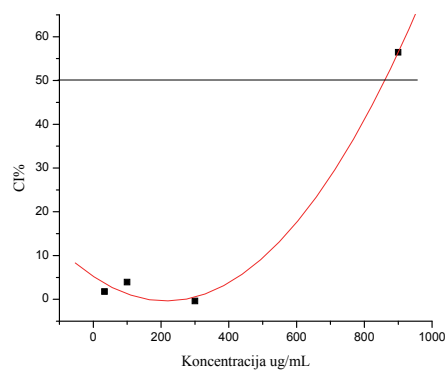


FH Aq MTT 24h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	49,24242	43,93939	45,83333	46,33838
300	16,28788	67,80303	21,59091	35,22727
100	12,5	19,69697	22,72727	18,30808
33,3	23,86364	14,77273	16,28788	18,30808
$r^2$				
IC <sub>50</sub>				

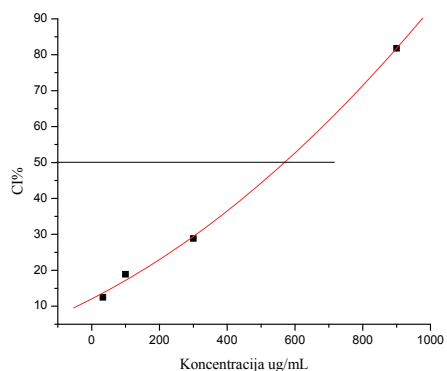
FH EtOH MTT 24h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	42,803	65,530	60,984	56,439
300	4,9242	-5,681	-0,378	-0,378
100	12,878	-4,545	3,4090	3,9141
33,3	3,0303	-9,848	12,121	1,7676
$r^2$				
0,8885				
IC <sub>50</sub>		814,021	843,65	863,492



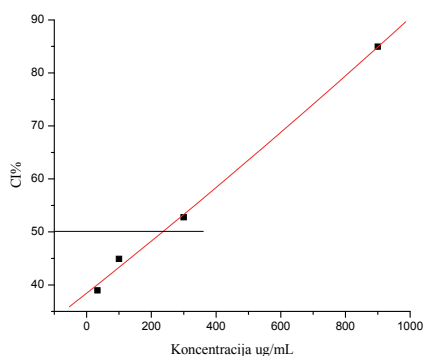
FH Aq MTT 72h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	83,47826	80,72464	82,89855	81,81159
300	38,11594	29,56522	28,11594	28,84058
100	17,82609	17,68116	20,14493	18,91304
33,3	11,44928	12,02899	12,89855	12,46377
$r^2$				
0,9926				
IC <sub>50</sub>		435,978	562,698	574,867



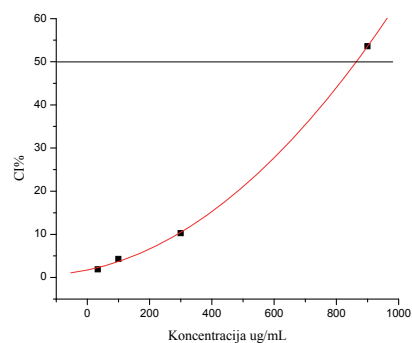
FH EtOH MTT 72h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	93,87	79,19	81,73	84,93
300	56,91	54,06	47,30	52,75
100	41,17	52,68	40,86	44,90
33,3	37,27	40,64	38,95	38,95
$r^2$				
0,9967				
IC <sub>50</sub>		208,46	159,52	366,93



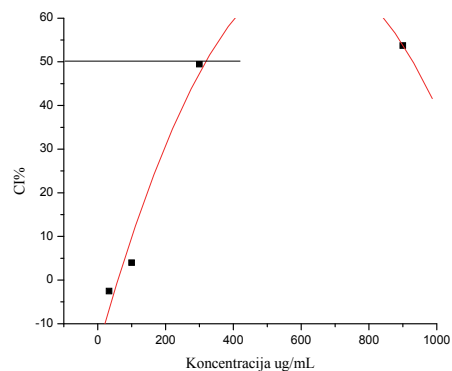
FH Aq SRB 24h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	50,49	47,40	56,68	53,59
300	4,537	-0,33	16,02	10,27
100	-1,65	2,76	10,27	4,30
33,3	-3,86	-5,63	7,62	1,87
$r^2$	0,9788			
IC <sub>50</sub>	891,26	827,51		863,49



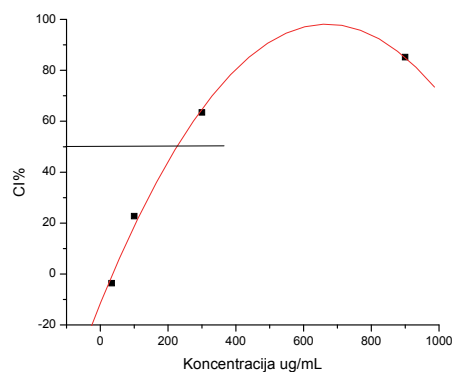
FH EtOH SRB 24h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	50,05	59,77	51,38	53,73
300	47,02	52,82	48,53	49,46
100	9,39	-1,21	3,64	3,98
33,3	-0,77	-2,54	-4,30	-2,54
$r^2$	0,876			
IC <sub>50</sub>	330,95	301,85	322,22	314,02



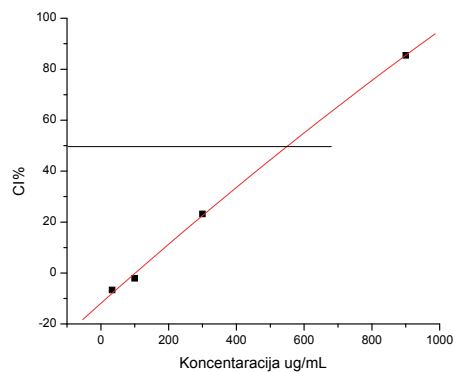
FH Aq SRB 72h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	85,74731974	84,99054	84,73828	85,15871
300	62,28715577	64,80975	63,2962	63,46437
100	16,75425688	33,02502	18,39395	22,72441
33,3	3,006096279	-8,85012	-4,94009	-3,5947
$r^2$	0,9871			
IC <sub>50</sub>	236,243	207,671	228,835	232,804



FH EtOH SRB 72h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	83,59	83,85	88,84	85,42
300	26,09	19,65	23,85	23,20
100	-6,99	1,67	-0,95	-2,08
33,3	-14,21	-19,33	13,48	-6,68
$r^2$	0,9986			
IC <sub>50</sub>	497,089	541,798	611,375	549,206

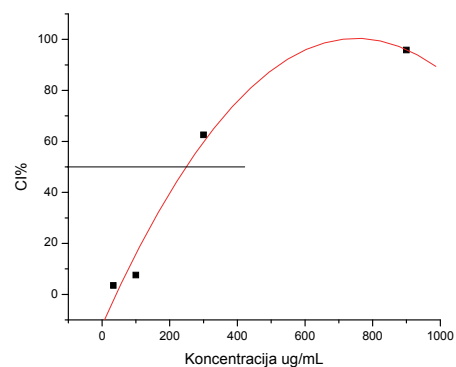


CD Aq MTT 24h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	27,97179	26,49429	27,23304	27,23304
300	10,24177	18,36803	6,548019	11,71927
100	11,3499	10,24177	5,809268	9,133647
33,3	4,331766	3,22364	3,962391	3,839266
$r^2$				
IC <sub>50</sub>				

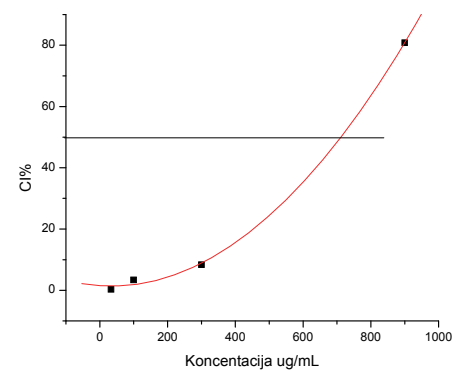
CD EtOH MTT 24h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	95,93687	96,30625	95,19812	95,81375
300	57,8912	67,12559	62,69308	62,56996
100	5,809268	8,764271	8,02552	7,53302
33,3	4,331766	2,484889	3,593015	3,46989
$r^2$				0,9202
IC <sub>50</sub>	269,312	229,365	249,735	249,735



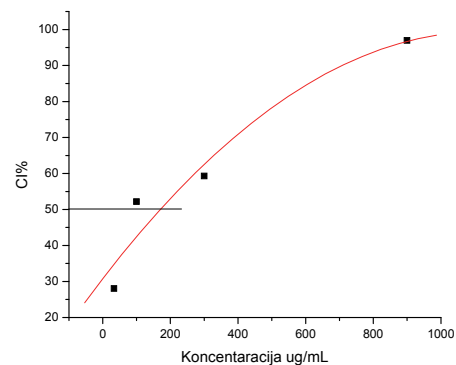
CD Aq MTT 72h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	89,29993	83,78777	69,35888	80,81552
300	11,48121	7,590273	5,969049	8,346844
100	4,509948	2,888725	2,726603	3,375092
33,3	0,132646	0,45689	0,294768	0,294768
$r^2$				0,9579
IC <sub>50</sub>	663,75	700,793	777,513	714,0187



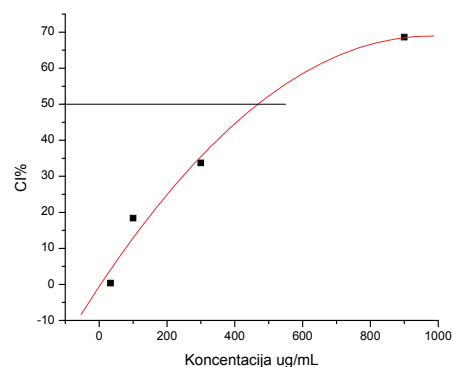
CD EtOH MTT 72h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	97,92961	96,03175	96,89441	96,95192
300	62,38785	63,25052	52,20842	59,28226
100	45,65217	71,70462	39,09593	52,15091
33,3	29,77916	23,39545	30,98689	28,05383
$r^2$				0,935
IC <sub>50</sub>	171,693	114,814	273,544	175,132



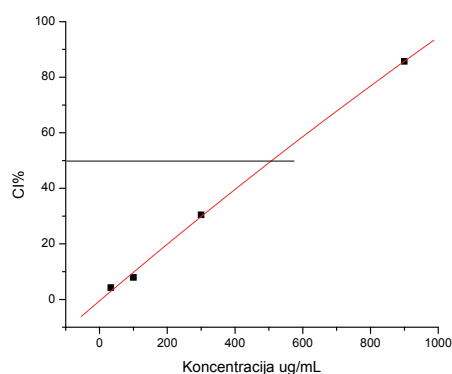
CD Aq SRB 24 h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	74,80663	73,48066	57,56906	68,61878
300	17,34807	62,43094	21,32597	33,70166
100	3,646409	13,81215	37,67956	18,37937
33,3	0,552486	0,110497	<del>18,895</del>	0,33149
$r^2$				0,947
$IC_{50}$	671,693	238,095	578,835	464,550



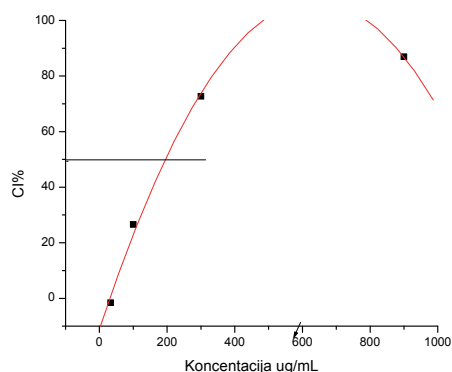
CD EtOH SRB 24 h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	85,85635	85,85635	85,41436	85,70902
300	23,09392	39,00552	29,28177	30,46041
100	8,950276	7,624309	7,18232	7,918969
33,3	0,994475	11,60221	0,110492	4,235726
$r^2$				0,9984
$IC_{50}$	574,86	432,01	501,058	513,227



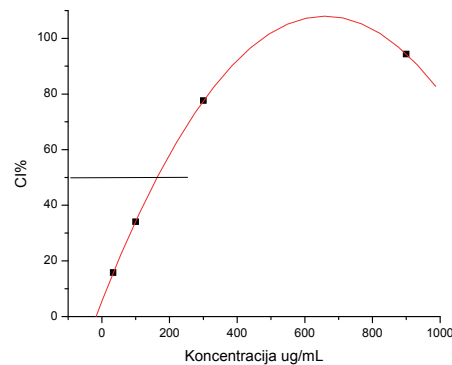
CD Aq SRB 72 h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	88,52217784	87,13475	85,11667	86,92453
300	69,09817112	89,27896	59,76456	72,7139
100	33,27727559	19,40299	26,97078	26,55035
33,3	4,645785159	-7,0843	-2,29136	-1,57662
$r^2$				0,9655
$IC_{50}$	183,862	175,925	232,804	192,063



CD EtOH SRB 72 h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	94,32415388	94,32415	94,45028	94,3662
300	77,54887534	79,44082	75,90919	77,63296
100	40,84507042	30,62855	30,75468	34,0761
33,3	12,46583982	19,40299	15,49296	15,78726
$r^2$				0,9662
$IC_{50}$	158,465	163,756	176,455	168,253

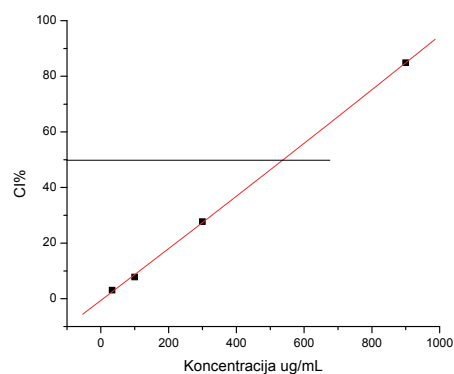


AUAq MTT 24 h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	32,77367	35,3593	37,57555	35,23618

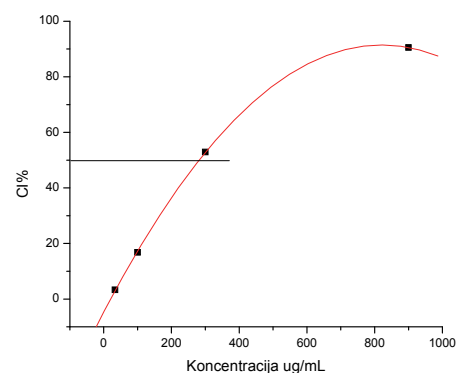
300	15,41303	15,04365	16,52116	15,65928
100	9,503022	5,070517	7,28677	7,28677
33,3	12,8274	19,10678	15,41303	15,7824
$r^2$				
IC <sub>50</sub>				

AU EtOH MTT 24 h				
C µg/mL	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	97,045	91,87374	65,64809	84,85561
300	28,71054	26,49429	27,97179	27,72554
100	12,45803	7,28677	3,593015	7,77927
33,3	4,701142	2,484889	2,115514	3,100515
$r^2$				0,9997
IC <sub>50</sub>				502,38    534,126    599,206    538,359



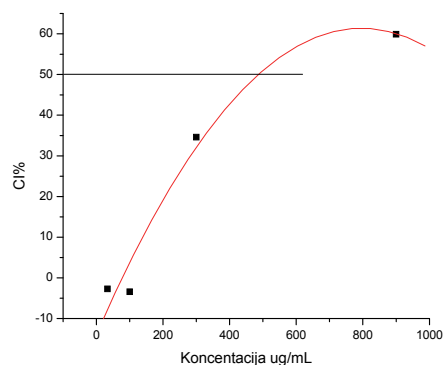
AU Aq MTT 72h				
C µg/mL	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	25,42373	35,63744	60,60427	40,55515
300	56,38909	60,28003	34,34046	50,33653
100	19,10096	19,74945	18,77671	19,20904
33,3	-7,16286	-0,35372	4,834193	-0,89413
$r^2$				
IC <sub>50</sub>				

AU EtOH MTT 72 h				
C µg/mL	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	91,73176	90,11054	89,78629	90,54286
300	49,9042	60,92852	47,95873	52,93048
100	23,15402	17,31761	10,02211	16,83125
33,3	2,888725	4,509948	2,56448	3,321051
$r^2$				0,9635
IC <sub>50</sub>				288,359    239,682    322,222    285,714



Au Aq SRB 24 h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	48,96203	74,48101	56,25316	59,89873
300	36,47738	55,06608	12,2467	34,59672
100	-3,0837	-3,0837	-4,14097	-3,43612
33,3	-0,96916	-0,96916	-6,25551	-2,73128
$r^2$				
IC <sub>50</sub>	484,92			

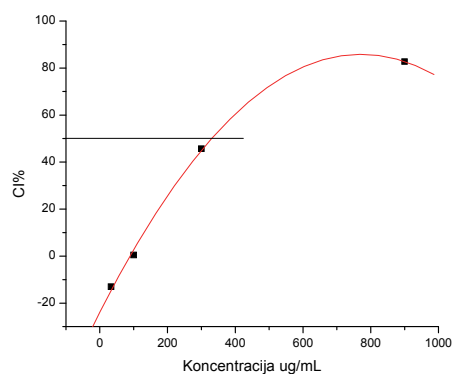


Au EtOH SRB 24 h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	39,26846	29,26156	47,8951	38,80837
300	21,32505	31,15942	17,3568	23,28042
100	13,90614	20,97999	13,73361	16,20658
33,3	13,21601	13,04348	12,00828	12,75592
$r^2$				
IC <sub>50</sub>				

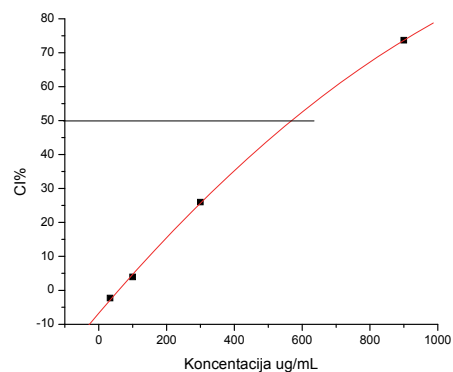
Au Aq SRB 72 h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	81,34787148	83,2966	83,57499	82,73982
300	46,82751421	45,82	44,322	45,65651
100	5,347407493	0,391645	-4,30809	0,476986
33,3	-8,98967	-14,8825	-15,2535	-13,0419
$r^2$	0,9014			
IC <sub>50</sub>	318,253	327,513	342,592	333,359



Au EtOH SRB 72 h

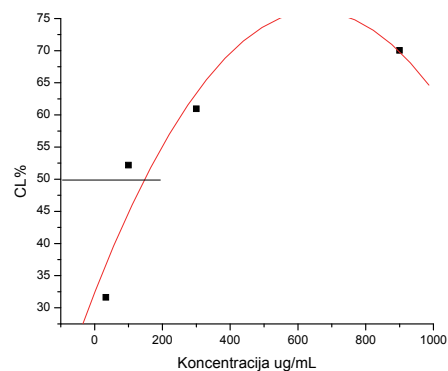
C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	75,84856397	75,45692	69,71279	73,67276
300	23,23759791	27,41514	27,2846	25,97911
100	5,483028721	1,958225	4,308094	3,916449
33,3	-1,95822	-6,65796	1,697128	-2,30635
$r^2$	0,9952			
IC <sub>50</sub>	590,476	523,809	587,037	567,46





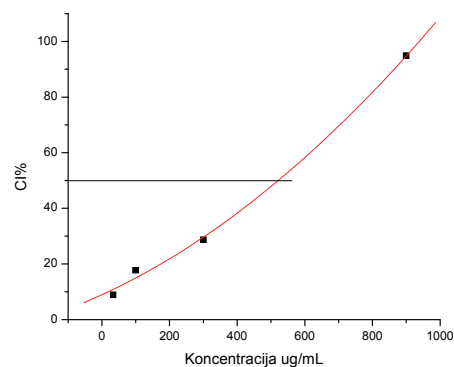
Map Aq MTT 24 h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	69,54813	71,51277	69,05697	70,03929
300	60,95285	63,8998	58,00589	60,95285
100	60,21611	60,95285	35,41257	52,19384
33,3	35,41257	31,021	28,459	31,63086
$r^2$	0,9503			
$IC_{50}$	105,555	110,846	217,195	144,532



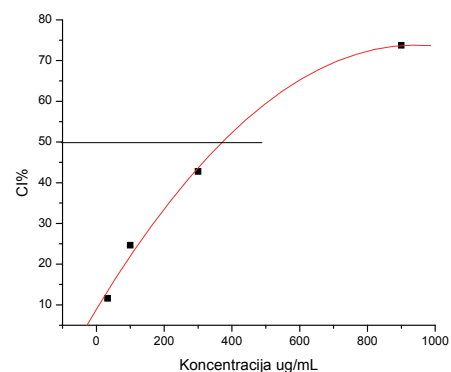
Map EtOH MTT 24 h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	94,10609	95,57957	94,84283	94,84283
300	30,50098	29,0275	26,57171	28,70007
100	20,18664	16,74853	16,25737	17,73084
33,3	9,381139	8,88998	8,398821	8,88998
$r^2$	0,9904			
$IC_{50}$	505,024	517,989	545,238	517,989



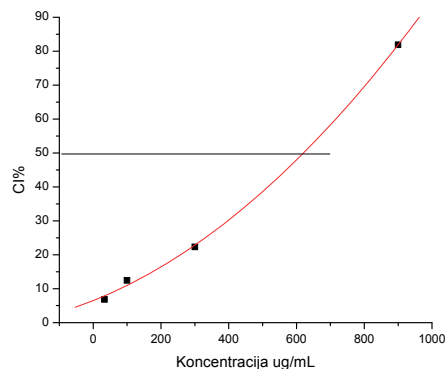
Map Aq MTT 72 h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	77,2402	77,78535	66,20102	73,74219
300	49,43782	41,53322	37,30835	42,7598
100	26,26917	23,27087	24,36116	24,63373
33,3	20,40886	-1,39693	15,77513	11,59568
$r^2$	0,9615			
$IC_{50}$	314,814	350,529	496,296	371,693



Map EtOH MTT 72 h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	86,50767	86,09881	73,01533	81,87394
300	26,26917	18,22828	22,45315	22,31687
100	13,73083	17,13799	6,507666	12,45883
33,3	10,18739	7,734242	2,555366	6,825667
$r^2$	0,9881			
$IC_{50}$	578,835	642,592	635,185	622,486

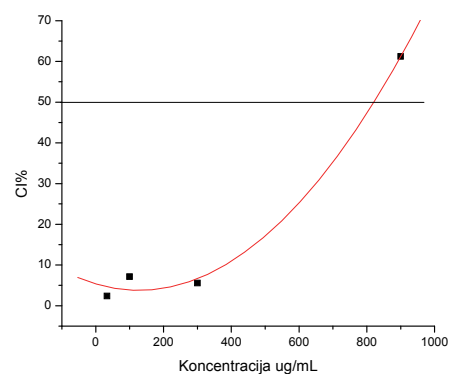


Map AqSRB 24 h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	50,30837	41,32159	41,32159	44,31718
300	12,77533	19,64758	5,374449	12,59912
100	1,145374	2,731278	-12,5991	-2,90749
33,3	9,07489	7,488987	-2,02643	4,845815
$r^2$				
IC <sub>50</sub>	899,264			

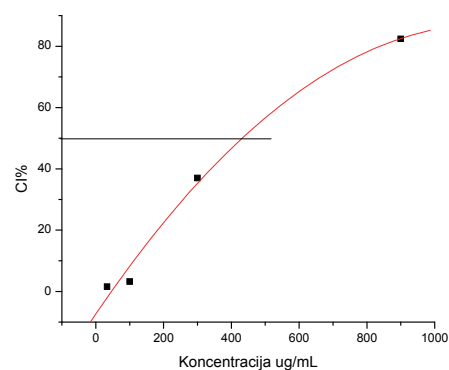
Map EtOHSRB 24 h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	66,1674	62,46696	55,06608	61,23348
300	6,960352	12,77533	-3,0837	5,550661
100	18,06167	-0,96916	4,317181	7,136564
33,3	-7,31278	7,488987	6,960352	2,378855
$r^2$				0,9292
IC <sub>50</sub>	773,28	793,65	875,661	817,989



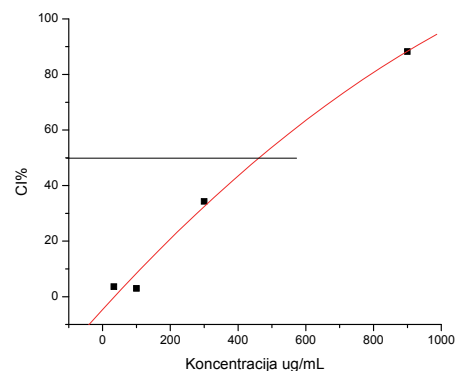
Map Aq SRB 72 h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	79,63446475	77,67624	89,94778	82,4195
300	37,59791123	36,55352	36,81462	36,98869
100	2,0023	3,785901	3,7989	3,1957
33,3	1,2358	1,5897	1,859	1,5615
$r^2$				0,9717
IC <sub>50</sub>	423,809	444,179	444,179	432,01



Map Aq SRB 72 h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	90,20887728	83,94256	90,60052	88,25065
300	34,85639687	33,02872	34,98695	34,29069
100	6,396866841	-1,69713	4,308094	3,002611
33,3	0,583	1,259	2,349869	3,589
$r^2$				0,9864
IC <sub>50</sub>	435,978	485,449	444,179	462,179



Lyc Aq MTT 24 h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	25,96154	29,80769	26,92308	27,5641
300	2,403846	0,961538	13,94231	5,769231
100	17,30769	0,1	-10,0962	2,437179
33,3	11,05769	-11,0577	3,365385	1,121795
$r^2$				
IC <sub>50</sub>				

Lyc EtOH MTT 24 h

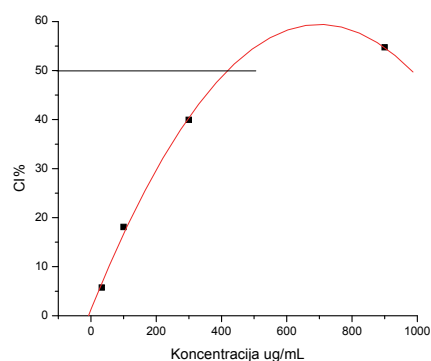
C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	43,0888	33,74517	49,88417	42,23938
300	21,00386	19,30502	-1,08108	13,07593
100	44,78764	48,18533	33,74517	42,23938
33,3	36,29344	27,79923	38,8417	34,31145
$r^2$				
IC <sub>50</sub>				

Lyc Aq MTT 72 h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	42,42902	46,52997	46,37224	45,11041
300	70,50473	21,29338	36,90852	42,90221
100	35,48896	24,44795	31,54574	30,49422
33,3	-9,46372	0,788644	2,996845	-1,89274
$r^2$				
IC <sub>50</sub>				

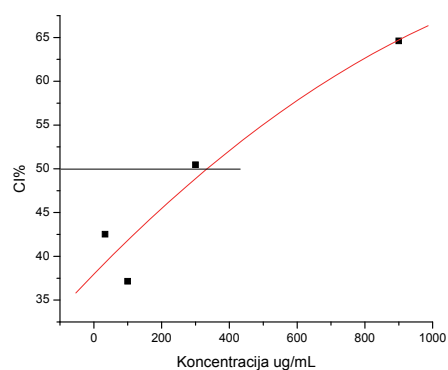
Lyc EtOH MTT 72 h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	52,52366	47,31861	64,35331	54,73186
300	46,05678	28,86435	44,95268	39,95794
100	16,56151	16,40379	21,29338	18,08623
33,3	3,62776	4,88959	8,675079	5,73081
$r^2$				0,9193
IC <sub>50</sub>	339,153	351,851	421,693	



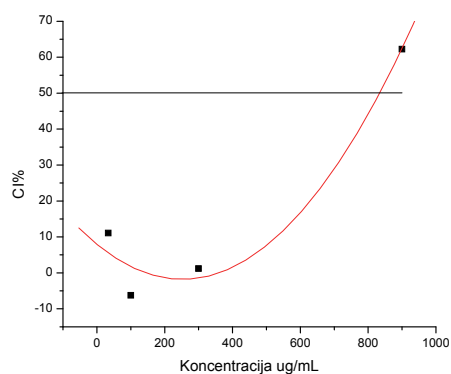
Lyc Aq SRB 24 h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	50,73359	69,42085	73,66795	64,60746
300	49,88417	49,03475	52,43243	50,45045
100	45,63707	32,89575	32,89575	37,14286
33,3	45,63707	35,44402	46,48649	42,52252
$r^2$	0,9136			
IC <sub>50</sub>	326,984	346,56	310,052	336,423



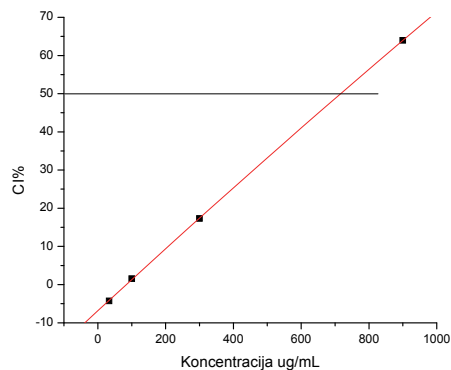
Lyc EtOH SRB 24h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	45,19231	63,46154	61,05769	62,25962
300	10,09615	-0,48077	2,884615	1,201923
100	4,326923	-6,73077	-5,76923	-6,25
33,3	5,769231	15,38462	6,730769	11,05769
$r^2$	0,8308			
IC <sub>50</sub>		834,92	829,629	834,391



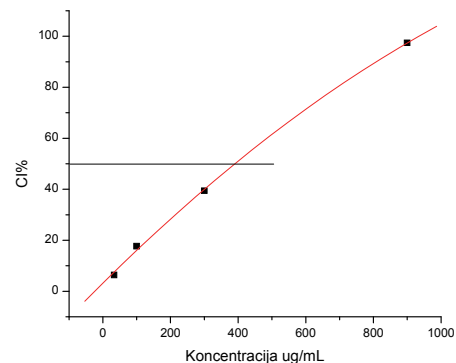
Lyc Aq SRB 72h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	64,95415001	61,33318	65,60075	63,96269
300	11,41547143	17,36421	23,18364	17,32111
100	2,233717376	2,492358	-0,09405	1,544008
33,3	0,164589701	-3,06842	-9,92241	-4,27541
$r^2$	0,9999			
IC <sub>50</sub>	773,28	736,243	598,677	717,195



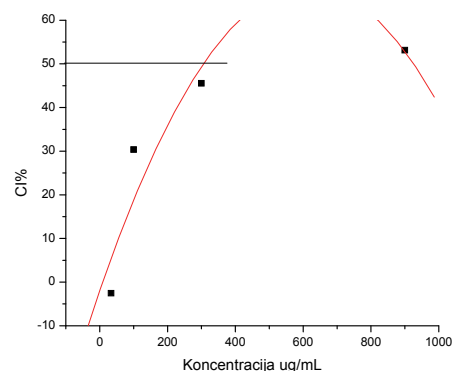
Lyc EtOH SRB 72h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	99,88035415	97,96602	94,37665	97,40767
300	39,45920077	43,40751	35,39124	39,41932
100	16,36755205	13,25676	23,42666	17,68366
33,3	3,445800431	6,91553	8,710218	6,357183
$r^2$	0,9961			
IC <sub>50</sub>	375,132	362,962	432,01	388,359



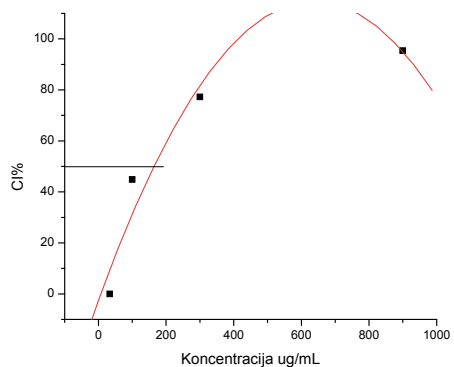
LCAq MTT 24h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	52,7772	53,19326	53,40129	53,12392
300	47,99251	44,87206	43,83191	45,56549
100	33,43041	30,30996	27,39755	30,37931
33,3	-3,80695	-2,14271	-1,72665	-2,55877
$r^2$	0,9092			
IC <sub>50</sub>	277,513	310,052	330,952	306,1723



LC EtOH MTT 24h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	95,42334	94,38319	96,25546	95,354
300	76,90867	78,36488	76,49261	77,25539
100	42,3757	47,78448	44,456	44,87206
33,3				
$r^2$	0,974			
IC <sub>50</sub>	170	160,223	169,04	163,756

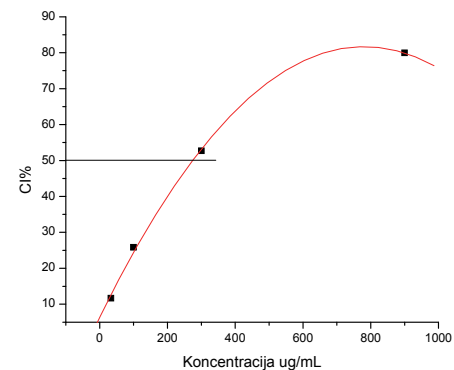


LC Aq MTT 72h

C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	34,28409	35,22066	36,15723	35,22066
300	21,64041	30,22563	28,82077	26,89561
100	0,723712	1,035902	6,811409	2,857008
33,3	0,099333	-1,46161	-1,14943	-0,83724
$r^2$				
IC <sub>50</sub>				

LC EtOH MTT 72h

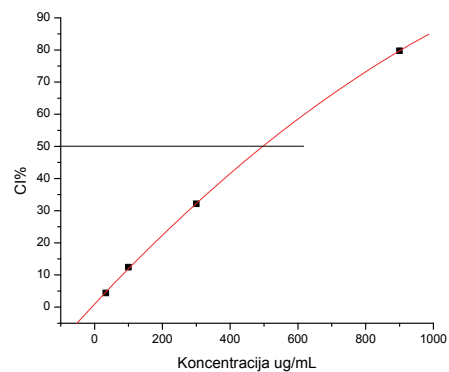
C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	54,65287	89,57133	95,66449	79,96289
300	48,32536	50,083	59,69144	52,69993
100	37,54516	18,91417	21,02334	25,82756
33,3	15,39889	15,51606	4,149985	11,68831
$r^2$	0,9814			
IC <sub>50</sub>	289,682	310,582	245,502	271,957



LC Aq SRB 24h

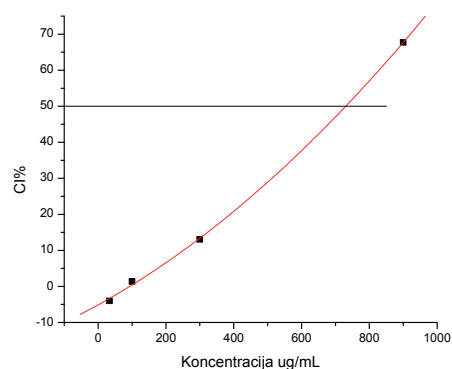
C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	20,38369	3,117506	34,13269	19,2113
300	5,355715	5,67546	-6,47482	1,518785
100	-1,35891	-9,99201	-6,15508	-5,83533
33,3	2,478018	-5,19584	-2,95763	-1,89182
$r^2$				
IC <sub>50</sub>				

LC EtOH SRB 24h				
C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	80,65064	77,59547	80,9901	79,7454
300	42,63083	29,73126	23,9604	32,1075
100	15,47383	9,70297	12,07921	12,41867
33,3	8,005658	1,895332	3,253182	4,384724
$r^2$				
0,9135				
IC <sub>50</sub>				
	372,222	521,428	591,005	497,089



LC Aq SRB 72h				
C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	44,52871073	42,79523	49,94583	45,75659
300	40,6283857	46,58722	37,91983	41,71181
100	32,82773564	34,34453	28,06067	31,74431
33,3	3,683640303	-0,32503	6,933911	3,430841
$r^2$				
IC <sub>50</sub>				

LC EtOH SRB 24h				
C $\mu\text{g/mL}$	CI%	CI%	CI%	Srednja vrednost
900	64,3458453	68,5055	70,2882	67,71318
300	9,081905516	13	17,04467	13,04219
100	-4,46667	5,635337	3,020699	1,396454
33,3	-8,5074	-8,15094	4,565713	-4,0309
$r^2$				
0,9943				
IC <sub>50</sub>				
	707,634	712,962	711,904	687,566



## Lista skraćenica

AK - askorbinska kiselina  
APA – antiproliferativna aktivnost  
BHT - butilovani hidroksitoluen (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol)  
butilovani hidroksianizol (2-terc-butil-4-hidroksianizol i 3-terc-butil-4-hidroksianizol)  
DMSO - dimetil sulfoksid  
DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil  
EtOH – etanol  
FC – Folin – Ciolcateu reagens  
FRAP/FRAE- gvožđe redukujuća moć plazme/ekstrakta (eng. Ferric reducing ability of plasma/extract)  
FV - flavonoidi  
GC-FID - gasna hromatografija sa plamenim jonizujućim detektorom (Gas Chromatography - Flame Ionization Detector)  
GK - galna kiselina  
HPLC-MS - tečna hromatografija visokih performansi sa masenim detektorom (High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)  
IC50 - koncentracija uzorka koje inhibiše/neutrališe 50 % slobodnih radikala (eng: half maximal inhibitory concentration)  
KV - kvercetin  
MeOH-metanol  
NADP -nikotin adenin dinukleotid fosfat  
ph – Phylum (razdeo)  
ROS- reaktivne kiseonične vrste (engl. Reactiv Oxygen Species)  
RSC - Kapacitet hvatanja radikala (engl. Radical Scavenging Capacity)  
SOA- - superoksid anjon radikal O<sub>2</sub>•-  
SOD -superoksid- dismutaza BHA  
UF - ukupni fenoli  
WHO – Svetska zdravstvena organizacija  
MIC - minimalna inhibitorna koncentracija  
MBC – minimalna baktericidna koncentracija  
SNP - natrijum-nitroprusid (Sodium Nitroprusside)  
SOD - superoksid dizmutaza  
ROS - reaktivne vrste kiseonika (Reactive Oxygen Species)  
RSC - kapacitet „hvatanja“ slobodnih radikala (Radical Scavenging Capacity)  
IM- imunomodulatorno dejstvo  
KS- kliničke studije  
PKSŽ- pred kliničke studije na životinjskim modelima  
s.m. suve materije  
DHA - Dokosaheksaenska kiselina  
MUFA - Mononezasićene masne kiseline  
SFA - Zasićene masne kiseline  
PUFA - Polinezasićene masne kiseline  
MER - M. gignateus,  
LSZ - L. sulphureus,  
AU - A. auricula-judae,  
FH - F. hepatica,  
AM - A. mellea,  
CD - C. disseminatus,  
LC - L. controversus,  
LYC - L. perlatum,  
MAP - M. procera

**UNIVERZITET U NOVOM SADU**  
**PRIRODNO MATEMATIČKI FAKULTET**  
**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije:

Monografska dokumentacija

TD

Tip zapisa:

Tekstualni štampani materijal

TZ

Vrsta rada:

Doktorska disertacija

VR

Ime i prezime autora:

Aleksandra Novaković

AU

Mentor:

dr Maja Karaman, vanredni profesor

MN

Naslov rada:

BIOPOTENCIJAL AUTOHTONIH GLJIVA U  
FUNKCIJI NUTRACEUTIKA

NR

Jezik publikacije:

Srpski (latinica)

JP

Jezik izvoda:

Srpski / engleski

JI

Zemlja publikovanja:

Republika Srbija

ZP

Uže geografsko područje:

AP Vojvodina

UGP

Godina:

2015.

GO

Izdavač:

Autorski reprint

IZ

Mesto i adresa:

Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

MA

Fizički opis rada:

7 poglavlja /158 stranica /47 slike / 32 tabele/  
365 referenci / 50 strana prilog

FO

---



Naučna oblast: NO	Biologija
Naučna disciplina: ND	Mikrobiologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Lekovite gljive, Basidiomycota, nutraceutici, biološka aktivnost, antioksidativna aktivnost, antimikrobna aktivnost, antiproliferativna aktivnost, fenolna jedinjenja, masne kiseline, proteinske frakcije.
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Prirodno matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Dositeja Obradovića 3, 21000, Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	Karakterizacija ekstrakata plodnih tela devet autohtonih vrsta gljiva pripadnika razdela Basidiomycota obuhvatila je preliminarno ispitivanje hemijskog sastava i ispitivanje biološke aktivnosti. Primenom HPLC-MS/MS i GC-FID tehnike detektovan je i određen sadržaj fenolnih jedinjenja i metil estara masnih kiselina. Primenom tehnike elektroforeze na mikročipu ("LAB-ON-A-CHIP" kapilarnom elektroforezom) izvršena je karakterizacija proteinskih frakcija u odabranim vrstama gljiva. Antioksidantna aktivnost (sposobnost neutralizacije slobodnih radikala, redukcionni potencijal), sadržaj ukupnih fenola i flavonoida vodenih i etanolnih ekstrakata ispitan je primenom spektrofotometrijskih metoda. Antimikrobna aktivnost metanolnog i heksanskog ekstrakta ispitana je na Gram-pozitivnim i Gram – negativnim bakterijskim sojevima. Efekat etanolnih i vodenih ekstrakata odabranih vrsta gljiva na rast ćelijske linije MCF7 (humani adenokarcinom dojke pozitivan na estrogenske i progesteronske receptore), ispitan je MTT i SRB testom, dok je efekat frakcija ispitan primenom MTT testa. Sumarno, ukupni biopotencijal ispitivanih vrsta na osnovu sprovedenih analiza hemijske karakterizacije i bioloških testova upućuju opravdanost hipoteze da su odabrane vrste potencijalni izvori nutraceutika. Svakako je potrebno i neophodno nastaviti dalja istraživanja ovih vrsta.

---

Datum prihvatanja teme od strane      04.09.2014

Senata:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

KO

PREDESEDNIK:                                      Dr Milan Matavulj, red. prof., PMF-a Univerzitet  
Novom Sadu

ČLAN/MENTOR:                                     Dr Maja Karaman, van. prof., PMF-a, Univerzitet  
Novom Sadu

ČLAN:     Dr. Nebojša Ilić, viši naučni saradnik, Naučni  
institut za prehrambene tehnologije, Univerzitet  
u Novom Sadu

ČLAN:     Dr. Boris Pejin, naučni saradnik, Institut za  
multidisciplinarna istraživanja (IMSI) Beograd,  
Univerzitet u Beogradu

ČLAN:

---

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF SCIENCES  
KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number:  
ANO  
Identification number:  
INO  
Document type: Monograph documentation  
DT  
Type of record: Textual printed material  
TR  
Contents code: Ph.D. Thesis  
CC  
Author: Aleksandra Novaković  
AU  
Mentor: dr Maja Karaman, Associate professor  
MN  
Title: Biopotential Autochthones Fungal in Function of  
TI Nutraceuticals

Language of text: Serbian (Latin)  
LT  
Language of abstract: Serbian (Latin)/English  
LA  
Country of publication: Republic of Serbia  
CP  
Locality of publication: AP Vojvodina  
LP  
Publication year: 2015.  
PY  
Publisher: Authors reprint  
PU  
Publication place: 21000 Novi Sad, Serbia  
PP Trg Dositeja Obradovića 3

Physical description: 7 chapters /158 pages /47 figures / 32 tables/  
PD 365 references / annex: 50 pages

Scientific field: Biology  
SF  
Scientific discipline: Microbiology  
SD

---

Subject, Key words  
SKW Medicinal fungi, Basidiomycota, nutraceutici, biological activity, antioxidant activity, antimicrobial activity, antiproliferative activity, phenolic compounds, fatty acids, protein fractions.

UC  
Holding data:  
HD Library of Faculty of Sciences  
Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Serbia

Note:  
N No notes

Abstract:  
AB Characterization of extracts of fruiting bodies of nine native species of mushrooms members of section Basidiomycota included preliminary testing of chemical composition and biological activity. Using HPLC-MS / MS and GC-FID techniques the content of phenolic compounds and fatty acid methyl esters has been detected and determined. By applying the techniques of electrophoresis on microchip ("LAB-ON-A-CHIP" capillary electrophoresis) characterization of protein fractions in selected types of mushrooms has been performed. The antioxidant activity (the ability of neutralizing free radicals, reducing potential), the contents of total phenols and flavonoids of water and ethanol extracts has been tested using the spectrophotometric method. The antimicrobial activity of methanol and hexane extracts was tested against Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. The effect of ethanol and aqueous extracts of selected fungi species on the growth of the cell line MCF7 (human breast adenocarcinoma positive for estrogen and progesterone receptors), has been examined using MTT and SRB assay, while the effect of the fractions has been tested by using the MTT assay. In summary, the overall biological potential of the examined species based on results for chemical and biological characterization tests (anti-oxidative, antimicrobial and anti-proliferative) indicate the justifiability of the hypothesis that examined species of mushrooms are potential sources of nutraceuticals. It is certainly needed and necessary to continue further research of these species.

---

Accepted on Senate on:

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board:

DB

PRESIDENT:

Dr. Milan Matavulj, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

MEMBER/MENTOR:

Dr. Maja Karaman, associate professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

MEMBER:

Dr. Nebojša Ilić, Senior research associate, Institute of Food Technology in Novi Sad, University of Novi Sad

MEMBER:

Dr. Boris Pejin, Research associate, Institute for Multidisciplinary Research IMSI, University of Belgrade

---

## BIOGRAFIJA

**Aleksandra Novaković**, istraživač saradnik

Rođena 12.06.1972. u Sarajevu, Republika Bosna i Hercegovina, živi i radi u Novom Sadu.

### Obrazovanje:

Osnovnu i srednju školu završila u Sarajevu. Godine 1992. upisuje osnovne akademske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu, na tadašnjem Institutu za biologiju, gde je 1999. godine diplomirala i time stekla zvanje Diplomiranog biologa. Master studije upisuje 2009. godine, a završava ih 2010. godine. Doktorske akademske studije upisuje iste 2010. godine na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu na Katedri za mikrobiologiju.

### Radno iskustvo:

2001-2004. godine zaposlena u Laboratoriji za kontrolu kvaliteta životnih namirnica i predmeta opšte upotrebe, Poljoprivredni zavod Bijeljina.

2004-2007. godine angažovana na poslovima kontrole kvaliteta u preduzeću D.O.O. LTS Lovćenac i Kompanija Aleksandrija Čurug.

2007.- do danas zaposlena u Nučnom institutu za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, kao stručni saradnik, a potom kao istraživač saradnik, gde prati naučna dostignuća i radi na istraživanjima biološki aktivnih supstanci, istraživanjima u oblasti tradicionalnih i regionalno specifičnih proizvoda, bezbednosti hrane i sledljivosti u lancu proizvodnje hrane. Od 2010. godine u zvanju istraživača saradnika, angažovana je na nacionalnim i međunarodnim projektima:

- a) Projekat integrisanog interdisciplinovanog istraživanja III 46001: Razvoj i primena novih i tradicionalnih tehnologija u proizvodnji konkurentnih prehrambenih proizvoda sa dodatom vrednošću za domaće i svetsko tržište - STVORIMO BOGATSTVO IZ BOGATSTVA SRBIJE, rukovodilac projekta dr Jasna Mastilović, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja RS, 2011-2014.
- b) FP7 PROJEKAT: „Low cost technologies and traditional ingredients for the production of affordable, nutritionally correct foods improving health in population groups at risk of poverty“; CHANCE 266331, 2011-2014.
- c) Government of the Swiss Confederation, Support of producers in achieving progresses toward the registration of products of Sudzuk of Sjenica, Cheese of Zlatac and the Kulen of Srem, 2010-2012.
- d) UNDP contract for FAO/EBRD, Deveopment of warehouse receipt system in Serbia, 2010-2011.
- e) FAO: Develop database of agriculture and non-agriculture products important for tourism development and market analysis of traditional and regional products and craft markets in targeted geographic regions, 2010.
- f) Projekat Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, TR 20066 „Održivost lanca masovne proizvodnje hrane“, rukovodioca dr Jasne Mastilović: 2008-2010.

U periodu 2009-2010. godine angažovana je na poslovima pomoćnika direktora za transfer Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu. Učestvovala je u izradi tri studije za Stručnu službu za razvoj APV za potrebe realizacije IRPD projekta Austrijske agencije za razvoj. Autor je (7-mog od 8) strateškog dokumenta „Preparation of Grain warehouse operations manual“ za Kompenzacioni fond RS. Autor je i koautor više radova iz oblasti disertacija.

Udata je i majka jednog Dimitrija.

---