



Универзитет у Новом Саду
Природно-математички факултет
Департман за хемију, биохемију и
заштиту животне средине



Милена Рашета

**ДЕТЕКЦИЈА БИОАКТИВНИХ СУПСТАНЦИ ОДАБРАНИХ ВРСТА
ГЉИВА РОДА *Ganoderma* (Basidiomycota) И ЊИХОВА
БИОЛОШКА АКТИВНОСТ**

Докторска дисертација

Нови Сад, 2016.

ПРЕДГОВОР



*На путу који сам прошла није било дана да
нисам помислила на тебе.
Било је на том путу тешких,
али и љепих момената.
Ја сам знала да си уз мене шта год да сам чинила,
и зато желим да ти кажем хвала.
Хвала за осмјех од горе када сам била тужна!
Хвала за снагу када је било тешко!
Хвала!
Ово је за Тебе,
јер знам да си сада тамо негдје срећан и поносан на своју ћерку!*

Експериментални дио истраживања ове докторске дисертације урађен је у лабораторијама Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду: Департмана за хемију биохемију и заштиту животне средине:

Лабораторији за биохемију љековитог биља и

Лабораторији за течну хроматографију

Департмана за биологију и екологију:

Лабораторији за микробиологију и

Лабораторији за физиологију животиња

Лабораторијама Медицинског факултета, Универзитета у Новом Саду:

Катедре за фармакологију, токсикологију и клиничку фармакологију,

Катедре за хистологију и ембриологију и

Лабораторији Института за низијско шумарство у Новом Саду

Ова докторска дисертација је урађена у оквиру пројекта финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (ОИ 172058)

Користим ову прилику да се захвалим свима који су дали допринос у изради ове докторске дисертације.

Посебну захвалност дугујем својим менторкама проф. др Мири Поповић, професору у пензији са Департмана за хемију, биохемију и заштиту животне средине и проф. др Маји Караман са Департмана за биологију и екологију.

Од уписа докторских студија па до данас дугујем велику захвалност проф. др Мири Поповић на указаном повјерењу, савјетима, великој, искреној и свестраној помоћи и подршци приликом израде и писања овог рада. Хвала јој што ме је усмјерила на пут сталног напредовања, хвала за сву толеранцију, подстрек, подршку и љубав коју ми пружа од почетка наше сарадње.

Од почетка експерименталног рада у оквиру докторске дисертације дугујем велику захвалност свом другом ментору, проф. др Маји Караман. Хвала јој на пруженој прилици да се развијам на професионалном плану, као и на свему што сам од ње научила о науци, што ме упознала са чаробним свијетом гљива и научила толико тога о њима, научно-истраживачком раду, свим пријатељским савјетима, толеранцији и подршци.

Хвала проф. др Неди Мимица-Дукић, шефу Катедре за биохемију и хемију природних производа и руководиоцу Пројекта у оквиру кога је реализован рад на овој докторској дисертацији. Захваљујем јој се за остварење планова предвиђених пријавом моје тезе, на великодушности, срдачности и бројним добронамјерним савјетима.

*Хвала проф. др Биљани Кауриновић и Васиљки Керавица на свим добронамјерним савјетима и подршци при реализацији испитивања *in vivo* антиоксидантне активности.*

Хвала проф. др Борису Поповићу на заинтересованости за рад и свим корисним савјетима.

Велику захвалност дугујем проф. др Светлани Тривић на дивној сарадњи, пријатељским и добронамјерним савјетима, њеној ведрини и срдачности. Хвала јој за сву наставну и не наставну подршку, за сво знање из области биохемије за све ове године наше сарадње.

*Од великог значаја за израду овог рада била ми је сарадња са члановима Катедре за микробиологију на чему им се искрено захваљујем. Поред моје менторке, велику захвалност дугујем проф. др Петру Кнежевић на сарадњи у циљу реализације антивиралне активности испитиваних екстраката рода *Ganoderma*. Велико хвала Љиљи, Александри и Миливоју на свој драгоцјеној помоћи при реализацији, писању и статистичкој обради појединих резултата. Хвала свим осталим колегама из собе бр. 24 на позитивној радној атмосфери.*

Хвала свим колегама са Катедре за биохемију и хемију природних производа а првенствено Филипу, Јелени и Зорици на помоћи при експерименталној реализацији појединих сегмената ове дисертације.

Хвала драгој др Сузани Јовановић –Шанта на свим пријатељским савјетима, подршци и безрезервној помоћи.

Хвала проф. др Соњи Каишаревић, и њеним сарадницама Јелени и Бранки за сву помоћ и подршку при раду на испитивању антипролиферативне активности.

Хвала колегама са Медицинског факултета у Новом Саду, Небојши Стилиновић, Саши Вукмировић и Ивану Чапо на ведром духу и позитивној атмосфери, великој и несебичној помоћи и подршци током рада на испитивању антидијаетогене активности, као и тумачењу добијених резултата.

Хвала мом великом пријатељу и колеги Марку Кеберт најприје за све ове дивне године нашег дружења, на подршци, ведром духу, и изузетно ми је драго што је и он учествовао у изради ове дисертације. Хвала за сву помоћ при реализацији и тумачењу AAS резултата испитиваних микро- и макроелемената.

Велико хвала мојој Сањи и Маци на пријатељству, великој помоћи, смјеху, позитивној енергији и ведром духу који смо изградиле за све ове године у лабораторији бр. 21.

Хвала свим мојим пријатељима, колегама и студентима за разумјевање и пружену подршку.

Највећу захвалност дугујем својој породици, мајци, брату, мом Милану и мом анђелу Јовани. Хвала за сву љубав, вјеру, разумјевање, несебичну и безусловну подршку које су ми биле неисцрпан извор енергије током свих година мог школовања у циљу остварења свих жеља и планова.

Нови Сад, јун 2016.

Милена Рашета

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ОПШТИ ДЕО	11
2.1. ГЉИВЕ	13
2.1.1. Порекло и еволуција гљива	15
2.1.2. Класификација гљива и гљивама сличних организама	17
2.1.2.1. Раздео <i>Basidiomycota</i>	18
2.1.3. Морфологија гљива	19
2.1.4. Биохемијски састав гљива	23
2.1.4.1. Секундарни метаболити гљива	24
2.1.5. Лигниколне гљиве	27
2.1.5.1. Процес дрвне трулежи	29
2.1.6. Гљиве рода <i>Ganoderma</i>	31
2.1.6.1. Биолошке карактеристике врста рода <i>Ganoderma</i>	31
2.1.6.2. Преглед биолошке активности гљива рода <i>Ganoderma</i>	37
<i>Ganoderma applanatum</i>	40
<i>Ganoderma lucidum</i>	46
<i>Ganoderma pfeifferi</i>	53
<i>Ganoderma resinaceum</i>	57
2.2. ОКСИДАТИВНИ СТРЕС И АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ ГЉИВА	60
2.2.1. Слободни радикали и оксидативни стрес	60
2.2.2. Реактивне кисеоничне врсте	63
2.2.2.1. Активирани (реактивни) облици кисеоника	63
2.2.2.2. Редуковани облици кисеоника	64
2.2.2.3. Азот (II)-оксид радикал, NO [•]	69
2.2.3. Ефекти ROS-а	71
2.2.3.1. Липидна пероксидација (LPO)	73
2.2.4. Механизми антиоксидантне заштите	75
2.2.4.1. Ензимска антиоксидантна заштита	77
2.2.4.1. Нензимска антиоксидантна заштита	80
2.2.5. Антиоксиданти гљива	88

2.3. АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ ГЉИВА	89
2.3.1. Антибактеријска активност	91
2.3.2. Антифунгална активност	93
2.3.3. Антивирална активност	94
2.3.4. Једињења са антимикробном активношћу	96
2.3.4.1. Терпеноидна једињења	96
2.3.4.2. Фенолна једињења	100
2.3.4.3. Полисахариди	102
2.3.4.4. Протеини	103
2.4. АНТИИНФЛАМАТОРНА АКТИВНОСТ ГЉИВА	104
2.4.1. Инфламација и метаболизам арахидонске киселине	104
2.4.1.1. Метаболички путеви арахидонске киселине	106
2.4.2. Гљиве као антиинфламаторни агенси	109
2.5. АНТИПРОЛИФЕРАТИВНА АКТИВНОСТ ГЉИВА	110
2.5.1. Ћелијски системи	111
2.5.2. Тестови одређивања цитотоксичности	113
2.5.2.1. МТТ тест ћелијске пролиферације	113
2.5.3. Гљиве као антипролиферативни агенси	114
2.6. АНТИДИЈАБЕТОГЕНА АКТИВНОСТ ГЉИВА	120
2.6.1. Шећерна болест (<i>Diabetes mellitus</i>)	120
2.6.2. Медицинске гљиве и шећерна болест	121
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	125
3.1. САКУПЉАЊЕ И ПРИПРЕМА ЕКСТРАКАТА ГЉИВА	127
3.1.1. Припрема EtOH екстраката гљива	127
3.1.2. Припрема H ₂ O екстраката гљива	128
3.1.3. Припрема CHCl ₃ екстраката гљива	129
3.2. ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ИСПИТИВАНИХ ВРСТА ГЉИВА	130
3.2.1. Одређивање садржаја макро- и микроелемената атомском апсорпционом спектрофотометријом (AAS)	130
3.2.2. LC/MS-MS анализа одабраних фенолних једињења	132
3.2.3. Одређивање садржаја протеина (Bradford, 1976)	132
3.2.4. Одређивање садржаја шећера (PSA тест)	134

3.3. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИОКСИДАНТНЕ АКТИВНОСТИ ГЉИВА <i>IN VITRO</i>	137
3.3.1. Одређивање капацитета „хватања“ DPPH• радикала	137
3.3.2. Одређивање капацитета „хватања“ ABTS•+ радикала	139
3.3.3. Одређивање капацитета „хватања“ OH• радикала	141
3.3.4. Одређивање капацитета „хватања“ O ₂ • радикала	143
3.3.5. Одређивање капацитета „хватања“ NO• радикала	145
3.3.6. Одређивање редокс капацитета	147
3.3.6.1. FRAP (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power) тест	147
3.3.6.2. АЕАС (Ascorbate Equivalent Antioxidant capacity) тест	148
3.3.7. Одређивање садржаја укупних фенола	150
3.3.8. Одређивање садржаја укупних флавоноида	151
3.4. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИОКСИДАНТНЕ АКТИВНОСТИ ГЉИВА <i>IN VIVO</i>	152
3.4.1. Одређивање интензитета липидне пероксидације (LPx)	154
3.4.2. Одређивање редукованог глутатиона (GSH)	154
3.4.3. Одређивање активности глутатион-пероксидазе (GSHPx)	154
3.4.4. Одређивање активности глутатион-редуктазе (GSHR)	154
3.4.5. Одређивање активности пероксидазе (Px)	154
3.4.6. Одређивање активности каталазе (CAT)	155
3.4.7. Одређивање активности ксантин-оксидазе (XOD)	155
3.4.8. Одређивање концентрације укупних протеина	155
3.5. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИМИКРОБНЕ АКТИВНОСТИ ГЉИВА	156
3.5.1. Бактеријски сојеви	156
3.5.2. Суспензије микроорганизама и стандардизација инокулума	156
3.5.3. Антибактеријска активност	157
3.5.3.1. Минимална инхибиторна концентрација (MIC)	157
3.5.3.2. Минимална бактерицидна концентрација (MBC)	158
3.5.3.3. Процена вредности MIC и MBC	159
3.5.3.4. Утврђивање антибактеријске активности	159
3.5.4. Антифунгална активност	160
3.5.4.1. Диск дифузиона метода	160
3.5.4.2. Pour plate метода	161
3.5.5. Антивирална активност	161

3.6. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИИНФЛАМАТОРНЕ АКТИВНОСТИ ГЉИВА	163
3.6.1. Одређивање броја тромбоцита	163
3.6.2. Експериментални поступак за одређивање антиинфламаторне активности	163
3.7. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЕ АКТИВНОСТИ ГЉИВА	168
3.7.1. Припрема ћелија	168
3.7.2. Сађење ћелија	169
3.7.3. Мерење цитотоксичности помоћу МТТ теста	170
3.8. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИДИЈАБЕТОГЕНЕ АКТИВНОСТИ ГЉИВА	170
3.8.1. Експерименталне животиње	170
3.8.1.1. Третман и подела експерименталних група	171
3.8.2. Фармакодинамичка испитивања	172
3.8.2.1. Индукција трајне хипергликемије алоксаном	172
3.8.2.2. Тест оралног оптерећења глукозом	173
3.8.2.3. Мерење глукозе у крви	173
3.8.3. Морфолошка испитивања	173
3.8.3.1. Хистолошка техника обраде ткива	173
3.8.3.2. Статистичка обрада података	174
3.8.4. Одређивање биохемијских параментара и испитивање функције бубрега и јетре	174
3.8.4.1. Липидни статус	174
3.8.4.2. Параметри бубрежне функције	175
3.8.4.3. Параметри јетрене функције	175
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	177
4.1. ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И КВАНТИТАТИВНА АНАЛИЗА ЕКСТРАКАТА ГЉИВА	179
4.1.1. Одређивање садржаја макро- и микроелемената атомском апсорпционом спектрофотометријом (AAS)	179
4.1.2. LC-MS/MS анализа одабраних фенолних једињења	184
4.1.3. Одређивање садржаја протеина (Bradford, 1976)	188
4.1.4. Одређивање садржаја шећера (PSA тест)	190

4.2. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИОКСИДАНТНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА ЕКСТРАКАТА ГЉИВА <i>IN VITRO</i>	194
4.2.1. Одређивање капацитета „хватања“ DPPH• радикала	194
4.2.2. Одређивање капацитета „хватања“ ABTS•+ радикала	197
4.2.3. Одређивање капацитета „хватања“ OH• радикала	199
4.2.4. Одређивање капацитета „хватања“ O ₂ ⁻ радикала	201
4.2.5. Одређивање капацитета „хватања“ NO• радикала	202
4.2.6. Одређивање редукционог потенцијала екстраката	205
4.2.6.1. FRAP (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power) тест	205
4.2.6.2. АЕАС (Ascorbate Equivalent Antioxidant capacity) тест	206
4.2.7. Одређивање садржаја укупних фенола и флавоноида	215
4.3. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИОКСИДАНТНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА ЕКСТРАКАТА ГЉИВА <i>IN VIVO</i>	219
4.3.1. Хепатопротективни ефекат на хомогенату јетре пацова	220
4.4. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИМИКРОБНЕ АКТИВНОСТИ ЕКСТРАКАТА ГЉИВА	226
4.4.1. Антибактеријска активност	230
4.4.2. Антифунгална активност	236
4.4.3. Антивирална активност	240
4.5. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИИНФЛАМАТОРНЕ АКТИВНОСТИ ЕКСТРАКАТА ГЉИВА	242
4.6. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЕ АКТИВНОСТИ ЕКСТРАКАТА ГЉИВА	248
4.7. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИДИЈАБЕТОГЕНЕ АКТИВНОСТИ ЕКСТРАКАТА ГЉИВА	255
4.7.1. Фармакодинамичка испитивања	255
4.7.1.1. Вредности телесне масе	255
4.7.1.2. Алоксански дијабетес	256
4.7.1.3. Тест оралног оптерећења глукозом	257
4.7.2. Одређивање биохемијских параметара и испитивање функције јетре и бубрега	260
4.7.2.1. Утицај дијабетеса на липидни статус	261
4.7.2.2. Утицај дијабетеса на функцију бубрега и јетре	262
4.7.3. Морфолошка испитивања	264
4.7.3.1. Хистолошка анализа ткива панкреаса	264

4.7.3.2. Хистолошка анализа ткива бубрега	267
4.7.3.3. Хистолошка анализа ткива јетре	269
5. ЗАКЉУЧАК	273
6. ЛИТЕРАТУРА	289
7. ПРИЛОГ	317

ЛИСТА ИЛУСТРАЦИЈА У ТЕКСТУ

- Слика 2.1.** Родови гљива и бројеви врста по групама
- Слика 2.2.** Грађа ћелије хифа гљива
- Слика 2.3.** Грађа гљива
- Слика 2.4.** Приказ димитичног система хифа
- Слика 2.5.** Метаболички путеви код гљива
- Слика 2.6.** Животни циклус *Ganoderma* врста
- Слика 2.7.** *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. 1887
- Слика 2.8.** Мапа распрострањења врсте *G. applanatum*
- Слика 2.9.** *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. 1881
- Слика 2.10.** Мапа распрострањења врсте *G. lucidum*
- Слика 2.11.** *Ganoderma pfeifferi* (Bres. 1889)
- Слика 2.12.** Мапа распрострањења врсте *G. pfeifferi*
- Слика 2.13.** *Ganoderma resinaceum* (Boud 1890)
- Слика 2.14.** Мапа распрострањења врсте *G. resinaceum*
- Слика 2.15.** Радиолита воде
- Слика 2.16.** Стварање и детоксикација ROS-а у респираторном ланцу митохондрија
- Слика 2.17.** Процес превођења редуковане у оксидовану форму ензима ХОД
- Слика 2.18.** Структуре основних класа терпеноидних једињења заступљених код гљива рода *Ganoderma*
- Слика 2.19.** Метаболички путеви арахидонске киселине
- Слика 2.20.** Потенцијални антиканцерогени путеви гљиве *G. lucidum* узроковани једињењима типа терпена и полисахарида
- Слика 2.21.** Потенцијални механизми антитуморских ефеката *G. lucidum*
- Слика 3.1.** Механизам антиоксидантног дејства фенолних једињења на DPPH• радикал
- Слика 3.2.** Неутрализација катјонског синтетичког ABTS•+ радикала до безбојне редуковане форме
- Слика 3.3.** Реакција настајања малондиалдехида (MDA)
- Слика 3.4.** Реакција ТВА и MDA
- Слика 3.5.** Структурне формуле тетразолијум нитро-плавог и феназинметилсулфата
- Слика 3.6.** Шематски приказ механизма аеробне редуције NBT
- Слика 3.7.** Реакција нитритних јона са Griess-овим реагентом
- Слика 3.8.** Шематски приказ редуције Fe³⁺ у Fe²⁺ аскорбинском киселином
- Слика 3.9.** Настајање обојеног комплекса Al³⁺ јона и флавоноида
- Слика 3.10.** Шематски приказ серије дуплих микроразређења
- Слика 4.1.** Хистолошка анализа ткива панкреаса. ХЕ. 200х
- Слика 4.2.** Хистолошка анализа бубрежног ткива. ХЕ, 200х.
- Слика 4.3.** Хистолошка анализа ткива јетре. ХЕ, 200х.

ЛИСТА ТАБЕЛА У ТЕКСТУ

- Табела 2.1.** Преглед различитих група организама које чине Царство гљива
- Табела 2.2.** Лигниколне гљиве раздела Basidiomycota и тип трулежи
- Табела 2.3.** Списак врста рода *Ganoderma*
- Табела 2.4.** Биолошки активна једињења и медицински ефекти гљива рода *Ganoderma* (подручје Карпата)
- Табела 2.5.** Синоними врсте *G. applanatum* (Pers.) Pat. 1887
- Табела 2.6.** Синоними врсте *G. lucidum* (W. Curt.:Fr.) P. Karst.
- Табела 2.7.** Синоними врсте *G. pfeifferi* (Bres. 1889)
- Табела 2.8.** Синоними врсте *G. resinaceum* (Boud. in Pat. 1890)
- Табела 2.9.** Најважнији реактивни облици кисеоника
- Табела 2.10.** Физиолошке улоге NO•
- Табела 2.11.** Фазе липидне пероксидације по реакцијама
- Табела 2.12.** Преглед антимикуробних супстанци пореклом из макрогљива
- Табела 2.13.** Тритерпеноидна једињења пореклом из макрогљива
- Табела 3.1.** Списак гљива анализираних у овом раду
- Табела 3.2.** Калибрациона крива за одређивање садржаја протеина
- Табела 3.3.** Раствори припремљени за одређивање садржаја протеина и конструисање стандардне криве (BSA)
- Табела 3.4.** Раствори припремљени за одређивање укупног садржаја шећера и конструисање стандардних кривих
- Табела 3.5.** Раствори припремљени за одређивање капацитета „хватања“ DPPH• радикала
- Табела 3.6.** Раствори припремљени за одређивање садржаја ABTS•+ радикала
- Табела 3.7.** Раствори припремљени за одређивање капацитета „хватања“ OH• радикала
- Табела 3.8.** Раствори припремљени за одређивање капацитета „хватања“ O₂•- радикала
- Табела 3.9.** Раствори припремљени за одређивање капацитета „хватања“ NO• радикала
- Табела 3.10.** Раствори припремљени за одређивање редукционог потенцијала FRAP тестом
- Табела 3.11.** Раствори припремљени за одређивање редукционог потенцијала AEAC тестом
- Табела 3.12.** Раствори припремљени за одређивање садржаја укупних фенола
- Табела 3.13.** Раствори припремљени за одређивање садржаја флавоноида
- Табела 3.14.** Кориштени бактеријски сојеви у експерименталном поступку
- Табела 3.15.** Експериментални поступак за одређивање инхибиције продукције метаболита 12-ННТ, TXB₂ и PGE₂ и ензима 12-LOX
- Табела 3.16.** Оптимизовани параметри за квантификацију 12-ННТ, TXB₂, 12-НЕТЕ и PGB₂
- Табела 4.1.** Приказ детектованих фенолних једињења у EtOH и H₂O екстрактима гљива
- Табела 4.2.** Корелација резултата антиоксидантних тестова и садржаја укупних фенола
- Табела 4.3.** Врсте гљива и екстраката испитиваних у оквиру одређивања антимикуробне активности

Табела 4.4. Антибиограм анализираних бактеријских сојева

Табела 4.5. Антипролиферативна активност испитиваних екстраката (IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)) и стандардних једињења и корелациони фактори (R^2) у вези са фенолним саставом

Табела 4.6. Вредности телесне масе на почетку, након завршетка третмана, као и промена телесне масе у посматраном периоду пацова третираних физиолошким раствором, EtOH и H_2O екстрактима гљива *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*

Табела 4.7. Вредности телесне масе на почетку, након завршетка третмана, као и промена телесне масе у посматраном периоду пацова третираних алоксаном, EtOH и H_2O екстрактима гљива *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*

Табела 4.8. Вредности гликемије пацова након оштећења панкреаса алоксаном

Табела 4.9. Вредности шећера у крви (гликемије) пре и после оралног оптерећења пацова глукозом

Табела 4.10. Концентрација укупног холестерола, триглицерида (TGC), HDL и LDL холестерола, урее и креатинина, аспартат аминотрансферазе и аланин аминотрансферазе (средња вредност \pm SD) у серуму пацова третираних са физиолошким раствором, алоксаном, и EtOH и H_2O екстрактима *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*

ЛИСТА ХИСТОГРАМА У ТЕКСТУ

Хистограм 4.1. Садржај испитиваних макроелемената (mg/g) у сувим остацима гљива AAS техником

Хистограм 4.2. Садржај испитиваних микроелемената ($\mu\text{g}/\text{g}$) у сувим остацима гљива AAS техником

Хистограм 4.3. Приказ средњих вредности mg ек. протеина/ ml узорка добијених Брадфордовом методом за одређивање концентрације протеина за испитиване екстракте гљива

Хистограм 4.4. Приказ средњих вредности садржаја шећера (mg ек. стандарда/ g с.м.) добијених PSA тестом

Хистограм 4.5. Поређење способности „хватања“ DPPH• радикала EtOH и H_2O екстраката врста рода *Ganoderma*

Хистограм 4.6. Поређење способности „хватања“ ABTS•+ радикала EtOH и H_2O екстраката врста рода *Ganoderma*

Хистограм 4.7. Поређење способности „хватања“ OH• радикала EtOH и H_2O екстраката врста рода *Ganoderma*

Хистограм 4.8. Поређење способности „хватања“ $\text{O}_2^{\bullet-}$ радикала EtOH и H_2O екстраката врста рода *Ganoderma*

Хистограм 4.9. Поређење способности „хватања“ NO• радикала EtOH и H_2O екстраката врста рода *Ganoderma*

Хистограм 4.10. Поређење укупног редукционог потенцијала (FRAP тест) EtOH и H_2O екстраката врста рода *Ganoderma*

Хистограм 4.11. Поређење укупног редукционог потенцијала (AEAC тест) EtOH и H_2O екстраката врста рода *Ganoderma*

Хистограм 4.12. Поређење садржаја укупних фенола у EtOH и H_2O екстрактима гљива рода *Ganoderma*

Хистограм 4.13. Поређење садржаја укупних флавоноида у EtOH и H_2O екстрактима гљива рода *Ganoderma*

- Хистограм 4.14.** Утицај алоксана и EtOH и H₂O екстраката гљива рода *Ganoderma* на биохемијске параметре у хомогенату јетре пацова
- Хистограм 4.15.** МИС и МВС вредности испитиваног екстракта референтне гљиве *M. giganteus*
- Хистограм 4.16.** МИС и МВС вредности CHCl₃ екстракта гљиве *G. applanatum*
- Хистограм 4.17.** МИС и МВС вредности CHCl₃ екстракта гљиве *G. resinaceum*
- Хистограм 4.18.** Антифунгална активност EtOH екстракта *G. pfeifferi* (метода дискова)
- Хистограм 4.19.** Антифунгална активност EtOH екстракта *G. resinaceum* (метода дискова)
- Хистограм 4.20.** Антифунгална активност EtOH екстраката *G. pfeifferi* (Pour plate метода)
- Хистограм 4.21.** Антифунгална активност EtOH екстраката *G. resinaceum* (Pour plate метода)
- Хистограм 4.22.** Антивирусна активност испитиваних екстраката гљива изражена у % инактивације вируса
- Хистограм 4.23.** Потенцијал инхибиције продукције метаболита COX-1 пута (12-NHT, TXB₂ и PGE₂) и 12-LOX пута (12-NETE) CHCl₃ и EtOH екстрактима рода *Ganoderma*
- Хистограм 4.24.** Упоредни приказ АПА активности EtOH и H₂O екстраката врста рода *Ganoderma* на MCF-7 ћелијску линију након 24h
- Хистограм 4.25.** Упоредни приказ АПА активности EtOH и H₂O екстраката врста рода *Ganoderma* на MCF-7 ћелијску линију након 72h

1.

УВОД



1. Увод

Све древне цивилизације имале су посебан однос према биолошки активним супстанцама из биљака, гљива као и минерала и стена. Иако је тај однос био заснован само на сопственом искуству кроз традиционалну употребу ових природних извора, а не на "великим" научним сазнањима о хемијској структури супстанци и њиховим механизмима којима биолошки делују на сам људски организам, сви народи су на том базичном нивоу праксе заиста били изненађујуће успешни у лечењу разних обољења само континуираном применом одговарајућих чајева, сувих делова или екстраката гљива, биљака, минерала и др. Многа од тих сазнања су временом била скоро потпуно маргинализована или скоро у потпуности заборављена и одбачена, да би се последњих 50 година, тачније последњих деценија XX и првих деценија XXI века интензивирала истраживања лековитих супстанци пореклом из биљака („зелена хемија“), јестивих печурака и нејестивих гљива („незелена револуција“), али и из морских организама као што су бескичмењаци сунђери, мекушци и микроорганизми: црвене, зелене и мрке алге али и филаментозне гљиве мангрова, претежно родови *Aspergillus* и *Penicillium*.

Највеће познавање царства гљива, као и лечење гљивама кроз традиционалну медицину је потекло на Далеком Истоку где је и даље је највише развијено у земљама Кине, Кореје и Јапана, иако су последњих тридесетак година почела и интензивирала се научна истраживања и то претежно у науци Западних земаља Европе и Америке.

Данас се само око 50 % од укупно познатих врста макрогљива сматра јестивим, а од тога око 3000 врста за сада представљају медицински важне гљиве (енгл. *medicinal mushrooms*) које имају бројна терапевтска својства: антиоксидативно (Ferreira и др., 2009; Lee и др., 2012; Mau и др., 2002; Somanjana и др., 2013), антиканцерогено (Као и др., 2013; Roupas и др., 2012), антивирално (Mothana и др., 2003; Niedermeyer и др., 2005), антиинфламаторно (Gomes Castro и др., 2013; Lull и др., 2005), антибактеријско (Karaman и др., 2012; Prasad и Wesely, 2008) и антидијабетогено (De Silva и др., 2012; Roupas и др., 2012). Иако се сматра да је само 1 % познатих врста гљива отровно тј. токсично, не може се занемарити постојање опасних и по људски живот потенцијално фаталних врста (Chang и Miles, 2004). Истраживања антиоксидантних агенсима је била превасходно усмерена на представнике из Царства биљака (Kahkonen и др., 1999; Ramarathnam и др., 1995), иако су се скоро обновила и истраживања других, до сада недовољно истражених природних извора у које превасходно спада Царство

1. Увод

гљива, а међу њима претежно група припадника раздела Basidiomycota и Ascomycota, популарно названим макрогљивама (Мау и др, 2002).

Гљиве (*Fungi*, *Mycota* или *Mycetalia*) су еукариотски организми, а становници су наше планете Земље још од палеозоика, о чему сведоче фосилни записи у угљу стари око 438 милиона година (Chang и Miles, 2004). У XVIII веку Otto von Munchhausen, савременик Linnaeus-а одређује природу гљива, а његова запажања га још тада доводе до веровања да су гљиве сродници животиња (Findlay, 1982).

Пре око 300 милиона година, у области Пенсилваније појавиле су се и прве макрогљиве (продукују крупнија плодна тела видљива голим оком) и припадају претежно класама: *Basidiomycetes* и *Ascomycetes* (Chang и Miles, 2004). Према Rayen-у (1975) се процењује да постоји приближно 250 000 врста гљива, иако најновија истраживања указују на укупан број од чак око 1 500 000 врста (Blackwell, 2011; Hawksworth, 1991; Wasser, 2002; Webster и Weber, 2007), уз претпоставку да већина гљива-становника света, још није описана.

Миколози су такође у многоме допринели сазнањима о асоцијацијама између гљива и животиња, а у том смислу нарочито инсеката. Такође је потврђено да су неке врсте гљива погодна станишта за поједине животињске врсте (Blackwell, 2010). Поред бројних сличности са животињским организмима, гљиве имају и нека заједничка својства са биљкама, као што су: апсорпција преко увећане спољашње површине, неограничен раст и поседовање ћелијског зида. Ако се свему овоме дода и полифилетско порекло гљива, постаје јасна оправданост њиховог издвајања у посебно Царство организама, упоредо са Царствима биљака и животиња. Најстаријом гљивом сматра се *Tortotubus* (лигниколна гљива) за коју се процењује да је стара око 440 милиона година (Smith, 2016).

У скорије време је постао евидентан и све интензивнији интерес за проучавањем биоактивних супстанци природног порекла, што је узроковало и интензивнија биохемијска истраживања макрогљива из којих је последњих деценија изолован велики број нових једињења, највећим делом примарних метаболита, као што су полисахариди (Ferreira и др., 2009; Paterson, 2006), и протеини и секундарних метаболита као што су фенолна једињења, терпеноиди, који испољавају значајне биолошке ефекте. Поред лековитих супстанци у гљивама се налазе бројни биомолекули, од којих многи имају високе нутритивне карактеристике, као што су

1. Увод

висок садржај протеина у односу на поврће, садржај претежно незасићених есенцијалних масних киселина које чине око 70 % укупних масних киселина, као што су линолеинска киселина (са чак 69-75 %), затим палмитинска и олеинска одређене код врста: *V. volvacea*, *L. edodes*, *A. bisporus*, *P. sajor*, *A. auricular* и *T. fuciformis* због чега су данас гљиве и њихов узгој препознат као револуционаран процес економски исплативе сировине у прехранбеној индустрији, производњи пива, вина, ферментационих млечних производа и антибиотика (Chang и Miles, 2004; Leskosek-Cukalovic и др., 2010).

Предводници „незелене револуције“ су врсте лигниколних гљива (*Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Flammulina velutipes*) чија употреба има дубоке корене у традиционалној кинеској и јапанској медицини. Лигниколне гљиве су се кроз дуготрајан процес еволуције фаворизовале и издвојиле као нутритивна група гљива разграђивача, претежно сапротрофа, које једине осим бактерија, успевају да продукцијом оксидативних ензима (пероксидаза и лаказа), граде лигнин (чврсто полифенолно једињење), који је основни конституент грађе дрвета (Davin и Lewis, 2005). Продукујући спорокарпе (плодна тела) као фруктификационе генеративне структуре, за разлику од вегетативног дела талуса састављене од филаментозних нити хифа чинећи мицелију која су и потенцијални извор примарних и секундарних метаболита са израженом биолошком активношћу (Chang, 1999), оне људима обезбеђују храну и лекове. Међутим, у процесу деструкције тј. разградње лигнина, целулозе, и хемицелулозе долази до провокације оксидационих процеса и продукције веома штетних реактивних кисеоничних врста (ROS), превасходно ОН· радикала, што је утицало на то да се у гљивама развију различити механизми деловања метаболичких путева у циљу одбране од истих (Hammel и др., 2002).

Подручје Србије, као и цела територија Балкана, сматрају се биогеографским подручјем које је веома богато различитим врстама гљива што доприноси високом диверзитету врста уопште. Једним од подручја са најповољнијим климатским условима за развој гљива сматра се Истра (Хрватска), док се код нас у много већем обиму користе култивисане врсте, и то првенствено *A. bisporus* као и у већини европских земаља (Vidović, 2011). На територији Србије и Западног Балкана идентификовано је до сада нешто више од 1200 различитих врста гљива (Uzelac, 2009). Врсте које се код нас користе у исхрани или скупљају као лековите су припадници родова: *Cantharellus*,

1. Увод

Morchella, *Pleurotus* и *Lepista* прилично су слабо истражене у погледу нутритивних карактеристика и потенцијалних фармаколошких активности (Vidović, 2011).

Уколико се докаже да се неке аутохтоне врсте гљива издвајају од истих врста са других географских подручја, или других јестивих и лековитих врста по израженијим антиоксидантним или другим биолошким активностима, могли бисмо поставити хипотезу да се управо антиоксидантна активност гљива налази у основи неких већ доказаних и прихваћених терапијских ефеката лигниколних гљива, као што је антиканцерогена или антиинфламаторна активност. Поред тога, испољене антиоксидантне активности екстраката гљива би указале на њихов потенцијал у превенцији и терапији неких канцерогених, кардиоваскуларних и других обољења код људи, као и на значај ових врста као нових природних ресурса антиоксиданата у редовној исхрани и која би могла да послужи у будућности у форми нутрицеутика (производи који обухватају изоловане хранљиве материје, дијететске суплементе и производе природног порекла који имају широку примену као житарице, супе и напаци) и фармацеутика (било које једињење/производ које има употребу у медицинској дијагностици, лечењу или спречавању болести). Стога би се употреба гљива могла описати Хипократовим начелом „Нека храна буде твој лек, а лек твоја храна“.

Предмет овог рада био је да се истражи биолошка активност (антиоксидантна, антиинфламаторна, антипролиферативна, антимицробна и хепатопротективна) четири различите врсте аутохтоних лигниколних гљива рода *Ganoderma* (*Ganodermataceae*) које су прикупљене на подручју Новог Сада и планинског венца Фрушке Горе:

Ganoderma applanatum (Pers.) Pat. 1887,

Ganoderma lucidum (Curtis.) P. Karst. 1881,

Ganoderma pfeifferi (Bres.) 1889 и

Ganoderma resinaceum (Boud. in Pat.) 1890.

Из досадашњих литературних навода, тј. испитивања лековитих својстава нејестивих гљива рода *Ganoderma*, првенствено употребљаваних вековима у традиционалној народној медицини источњачких народа Кине, Јапана и Кореје, јасно је да бројни секундарни биомолекули (терпеноиди, полисахариди, фенолне киселине, протеини) присутни у четири испитиване врсте могу да испољавају снажне биолошке и

1. Увод

фармаколошке ефекте (Amaral и др., 2008; Baby и др., 2015; Boh и др., 2000; Boh и др., 2007; Cheng и др., 2012; Fatmawati и др., 2011; Kim и др., 2008; Kozarski и др., 2011; Lee и др., 2007; Ming и др., 2002; Mothana и др., 2003; Muhsin и др., 2011; Nie и др., 2013; Silva и др., 2013; Stilinović и др., 2014; Yildiz и др., 2015; Zengin и др., 2015; Zhang и др., 2015).

На основу потврде антиоксидантног деловања екстраката гљива тестовима *in vitro*, који могу да укажу на протективно деловање биоактивних фунгалних супстанци на оксидативне процесе у ћелијама, а нарочито у току метаболичких реакција које се одигравају у ћелијама јетре, а с обзиром да се ова једињења трансформишу преко хепатичких ензима, и могу конкурисати појединим лековима за одређене метаболичке путеве, и притом довести до фармакокинетичких, односно фармакодинамичких интеракција, резултати ових истраживања би могли да укажу на њихов биопотенцијал у функцији фармацеутика. Осим наведеног, резултати ових истраживања дали би податке за процену применљивости и значајније употребе аутохтоних врста гљива рода *Ganoderma*: *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* као функционалне хране.

Сходно горе наведеном, циљеви овог рада су били следећи:

Идентификација и квантификација секундарних биомолекула гљива рода *Ganoderma*

Хемијска карактеризација и квантитативна анализа екстраката:

Одређивање садржаја микро- и макроелемената ААС методом

Одређивање фенолних једињења LC-MS-MS методом

Одређивања садржаја протеина по Брадфорду

Одређивања садржаја угљених хидрата тестом са фенол сумпорном киселином (PSA тест)

Одређивање антиоксидантне активности *in vitro*:

Одређивање капацитета „хватања“ DPPH• радикала (Espin и др., 2000)

Одређивање капацитета „хватања“ ABTS•⁺ радикала (Arnao и др., 2001)

Одређивање капацитета „хватања“ OH• радикала (Halliwell и др., 1987)

Одређивање капацитета „хватања“ O₂•⁻ радикала (Nishikimi и др., 1972)

1. Увод

Одређивање капацитета „хватања“ NO• радикала (Green и др., 1982)

Одређивање редукционог потенцијала FRAP тестом (Benzie и Strain, 1996)

Одређивање редукционог потенцијала АЕАС тестом (Yen и Chen, 1995)

Одређивање садржаја укупних фенола (Singleton и др., 1999)

Одређивање садржаја флавоноида (Chang и др., 2002)

Одређивање антиоксидантне активности *in vivo*:

Хепатопротективни ефекат на хомогенату јетре пацова

Одређивање биолошке активности:

Одређивање антимицробне активности – антибактеријска, антифунгална и антивирална активност *in vitro*

Одређивање антиинфламаторне активности екстракта *ex vivo*

Одређивање антипролиферативне активности МТТ тестом *in vitro*

Одређивање антидијабетогене активности екстракта *in vivo*

Одређивање антидијабетогене активности и утицаја гљива на систем *in vivo* код пацова:

Одређивање липидног статуса крви

Одређивање функције јетре и бубрега

Одређивање хистолошких карактеристика ендокриног панкреаса, бубрега и јетре

На основу података из литературе и сопствених истраживања биолошке активности аутохтоних гљива рода *Ganoderma* добиће се детаљан и реалан приказ различитих биохемијских и фармаколошких активности секундарних биомолекула и комплексних смеша пореклом из ових гљива.

Поред наведеног, на основу добијених резултата очекује се добијање комплетније слике о саставу, као и начину деловања секундарних биомолекула у превенцији хроничних обољења као што су канцер, дијабетес и неуродегенеративна обољења и дефинисање најадекватнијег начина конзумирања гљива рода *Ganoderma* као додатака у исхрани. Испитивање цитотоксичности, тј. антипролиферативног ефекта гљива, могао би бити један од ограничавајућих фактора у њиховој примени или би могао представљати могућност њихове потенцијалне примене као природних извора

1. Увод

нових лекова у терапији бројних обољења модерног света, међу којима су у све већем порасту неуродегенеративна обољења Алцхајмерова, Паркинсонова болест, као и метаболички синдроми, дијабетес, канцер и многе друге.

2.

ОПШТИ

ДЕО



2. Општи део

2.1. ГЉИВЕ

Старе цивилизације Грка, Египћана, Римљана, Кинеза и Мексиканаца су вековима употребљавале гљиве у исхрани и верским церемонијама, а њихове терапеутске вредности биле су потврђене искључиво искуствено кроз процес традиционалне примене ових организама у лечењима рана, јачању организма и др. Истраживањима новијег датума дошло се до значајних научних података да гљиве обезбеђују не само хранљиве материје или храну богату протеинима, већ поједине врсте обезбеђују медицински ефикасне производе (Chang и Miles, 2000).

Најстарији археолошки доказ о употреби гљива потиче са древног Афричког континента и представљен је на Tassili слици, откривеној у каменим пећинама Алжира, за коју се сматра да потиче још из периода од пре 5000 година п.н.е., где је приказан играч (шаман) са гљивама у рукама за које се претпоставља да су служиле као халуциногена средства (Samorini, 2001). Чувени човек леденог доба „Ice Man“ који је недавно пронађен у глечерима италијанских Алпа имао је уз себе две полипорне гљиве: *Piptoporus betulinus* и *Fomes fomentarius* (Karaman, 2012a). Старост ове мумије се процењује на око 5300 година (Hobbs, 2002).

Гљиве (*Fungi*, *Mycota* или *Mycetalia*) представљају еукариотске организме једноставне грађе и једна су од најраспрострањенијих група живог света на Земљи (Hood, 2006). Њихова основна улога је разлагање органске материје, односно представљају најзначајније редуценте органске материје у природи чиме доприносе процесу кружења материје и протока енергије у природи (Davidović, 2007; Ranković, 2003). Гљиве су хемоорганотрофи и користе органску материју као извор угљеника, електрона и енергије, а начин исхране апсорпцијом нутријената издваја их у засебно царство, поред биљака и животиња (класификацијом Roberta Whittaker-а из 1969. године).

Историјски, гљиве су најпре сврставане у групу нижих биљака, *Thallophyta* по Линеу (Linnaeus) (Chang и Miles, 2000) и из тог разлога су биле означене као *Mycophyta*, *Eumycophyta*, *Inophyta* и др. (грчки *phyta*-биљка).

2. Општи део

Према биохемијским карактеристикама гљива утврђено је да се оне суштински разликују од биљака, и да су ближе свету животиња и то због следећих карактеристика:

Гљиве не садрже хлорофил и не могу вршити фотосинтезу, па се хране хетеротрофно, готовим органским материјама

Састав ћелијског зида гљива је специфичан и за разлику од биљака, уместо целулозе поседује аминополисахарид хитин

Као резервни производ у ћелијама гљива се не акумулира скроб, већ гликоген, полисахарид типичан за ћелије животиња

Синтеза аминокиселине лизина се код већине гљива одвија уз учешће аминокиселине, док је за све биљке карактеристично да се синтеза лизина одвија преко диаминопимелинске киселине

Осим биљних хормона значајних за деобу, раст и диференцијацију ћелије, код неких гљива су констатовани и полни хормони

Поседују пигмент меланин

Чињеница која знатно одваја гљиве од биљака, и приближава их животињским организмима јесте карактеристика система цитохрома, који је код гљива сличан оном код животиња, док се значајно разликује од система цитохрома биљака и бактерија

Ипак, поред бројних сличности које деле са животињским организмима, гљиве поседују и нека од својстава која карактеришу и биљке (апсорпција путем увећане спољашње површине, неограничен раст и присуство ћелијског зида). Ако се свему овоме дода и полифилетско порекло гљива, јасно је њихово издвајање у посебно царство, упоредо са царствима биљака и животиња.

Неке врсте гљива су способне да опстану на минералном азоту, док већина правих хетеротрофа захтева присуство органског азота. Вода им је апсолутно неопходна, а и топлота и светлост имају значај за њихов животни циклус. Кисеоник, фосфор, калијум, магнезијум, сумпор, манган, бакар, гвожђе, цинк и витамини су такође есенцијални за живот гљива. По правилу су аеробни организми и добро расту у тамном, влажном станишту, али генерално и на свим местима где постоји органски материјал погодан за разградњу.

2. Општи део

На основу начина на који долазе до хранљивих материја и неопходне енергије, највећи број гљива јесу сапрофити, тј. организми који потребне хранљиве материје добијају разградњом мртве органске материје (биљног, животињског или микробног порекла). Друга група су паразити, који користе живу органску материју биљака, животиња или других гљива. Трећа група формира симбиозе које остварује са аутотрофним организмом у мутуалистичкој асоцијацији (алгама у лишајевима или са вишим биљкама, нарочито шумским дрвећем) као микоризни партнери.

Ова група организама обухвата:

квасце - микроскопске једноћелијске гљивице

плесни - филаментозне гљиве - микроскопске мицелијске гљивице

макрогљиве - група макроскопских организама (Chang и Miles, 2004)

Према неких ауторима према употребној вредности за човека гљиве се још могу поделити у четири категорије (Chang и Miles, 2000):

Јестиве гљиве: нпр. *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach 1946, *Amanita caesarea* (Scop.) Pers. 1801

Медицинске гљиве, нпр. *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. 1881

Отровне гљиве, нпр. *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Link 1833

Друге гљиве, обухватају гљиве чија су својства мање позната

2.1.1. Порекло и еволуција гљива

Гљиве представљају архаичне облике живота, а њихова еволутивна старост се процењује на период од пре 400 милиона година, док се први фосилни налази поклапају са појавом копнених биљака рода *Rhynia*. Постоје докази да су гљиве: *Chytridiomycota*, *Zygomycota* и *Ascomycota* откривене међу фосилним остацима првих биљних врста пре 400 милиона година (Taylor и др., 1995).

Пошто су биле рано описиване само на основу структурних карактеристика, створена је представа о гљивама као о полифилетској групи организама која потиче од веома различитих предака као што су разне групе бичара без пигмената или амебоидни предци који су изгубили флагеле, што је тумачено на основу упоредних

2. Општи део

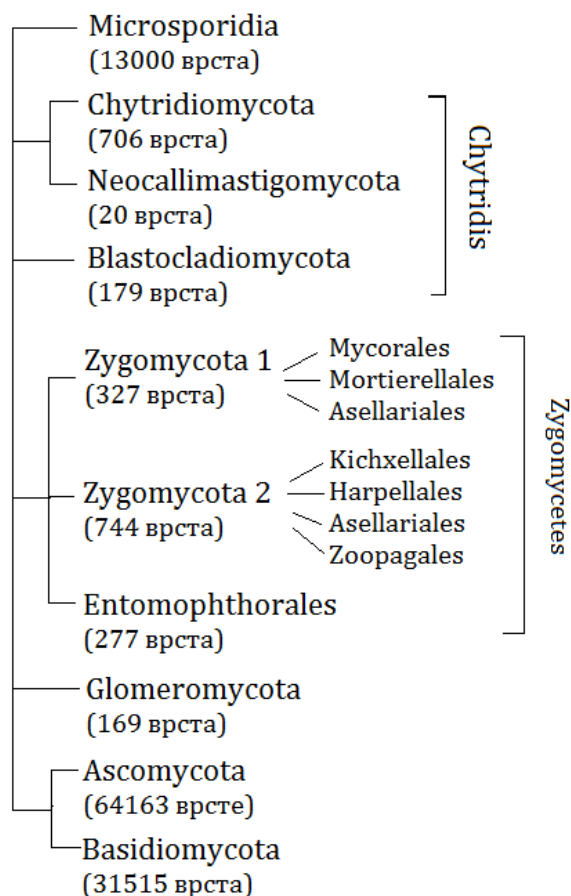
анализа покретних стадијума гљива и савремених бичара (*Flagellata*). Међутим, молекуларни приступ довео је до другачијег тумачења еволутивних односа између појединих група, пружајући валидне доказе и нове информације да је њихово порекло монофилетско и да су све групе унутар раздела потекле од једног заједничког претка. Данашња таксономија гљива се заснива на поређењу више различитих карактеристика: морфо-анатомских, ултраструктурних, биохемијских и молекуларних (Blackwell, 2010).

Иако постоје бројне теорије, порекло гљива није још у потпуности разјашњено, а миколози већ скоро преко 200 година воде расправе о томе које све организме могу сврстати у групу гљива (**Слика 2.1.**).

„Праве“ гљиве се данас деле на четири главна раздела (phylum): *Chitridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* и *Basidiomycota* и чине монофилетску групу (пореклом су од заједничког претка). Претпоставља се да су најпре дивергирале *Chitridiomycota* (најпримитивније гљиве), а да су гљиве подраздела (subphylum) *Ascomycota* и *Basidiomycota* у већем међусобном степену сродства од друге две групе ове филогенетске линије.

Deuteromycota, по пореклу представљају посебну хетерогену групу гљива, која је током еволуције потпуно изгубила полни стадијум и филогенетску повезаност са групама *Ascomycota* и *Basidiomycota* (Ranković, 2003).

2. Општи део



Слика 2.1. Родови гљива и бројеви врста по групама (Hibbett и др., 2007; Kirk и др., 2008)

2.1.2. Класификација гљива и гљивама сличних организама

По ранијим, доскорашњим класификацијама, постојала су четири раздела (Phylum): *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* и *Basidiomycota*, али је 2001. године издвојен још један раздео под именом *Glomeromycota* (арбускуларне микоризне гљиве и њихови сродници) које су раније сврставане у раздео *Zygomycota* (Слика 2.1.). Гљиве раздела *Glomeromycota* су у се појавиле у заједници са првим копненим биљкама, а и данас су у асоцијацији са већином биљних врста (Blackwell, 2010).

2. Општи део

Табела 2.1. Преглед различитих група организама које чине Царство гљива (Deacon, 2006)

Царство:	Fungi (Mycota)
Највероватније пореклом од предака слични групи хоанофлагелата	
Раздео (Phylum) Chytridiomycota	
Раздео (Phylum) Zygomycota	
Раздео (Phylum) Glomeromycota	
Раздео (Phylum) Ascomycota	
Раздео (Phylum) Basidiomycota	
Царство:	Straminipila
Највероватније настало од групе протиста којој припадају златно-браон алге	
Раздео (Phylum) Oomycota	
Раздео (Phylum) Hyphochytridiomycota	
Раздео (Phylum) Labyrinthulomycota	
Гљивама слични организми:	
Раздео (Phylum) Mucoromycota (слузаве гљиве са правом плазмодијом)	
Раздео (Phylum) Plasmodiophoromycota (плазмодиофорице)	
Раздео (Phylum) Acrasiomycota (слузаве гљиве са псеудоплазмодијом)	

2.1.2.1. Раздео *Basidiomycota*

Раздео *Basidiomycota* је са око 23 000 врста други по величини раздео царства гљива, одмах после раздела *Ascomycota* (32 000 врста) (Hood, 2006) и чине га печурке (макроскопске гљиве) и гљиве шумских екосистема (полипорне гљиве). Групу карактерише присуство мејоспора (базидиоспора) које се продукују на базидијама, ћелијама налик на буздоване. Морфологија базидије је играла веома важну улогу у класификацији гљива на две класе: *Phragmobasidiomycetes* (септирана базидија) и *Holobasidiomycetes* (несептирана базидија), међутим недавно је откривено да септирана базидија представља заостао карактер читавог раздела.

Данас се раздео дели на три класе:

Uredinomyces (рђе)

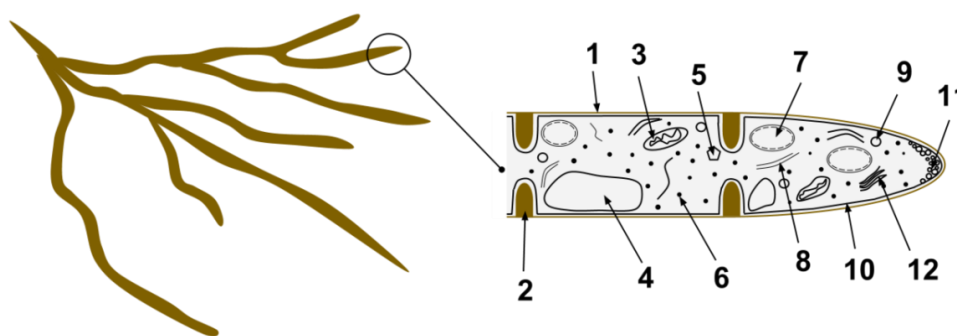
Ustilaginomyces (гаре)

Hymenomyces (печурке и њихови сродници)

2.1.3. Морфологија гљива

Тело или вегетативна структура гљиве се назива *талус*, који може бити плазмодијалан (слузаве гљиве), једноћелијски (квасци) или мицелијалан (филаментозне гљиве).

Мицелијалан талус представља скуп вегетативних ћелија у виду филамената (хифа, лат. *hypha*, pl. *hyphae*) и присутан је код плесни - „нижих гљива“ и код макроскопских - „виших гљива“, међу којима су најпознатије печурке.



Слика 2.2. Грађа ћелије хифа гљива: 1. Ћелијски зид; 2. Септум; 3. Митохондрион; 4. Вакуола; 5. Кристал ергостерола; 6. Рибозом; 7. Једро; 8. Ендоплазматски ретикулум; 9. Липиди; 10. Плазматска мембрана; 11. *Spitzenkörper*; 12. Голџијев апарат (<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:HYPHAE.png>)

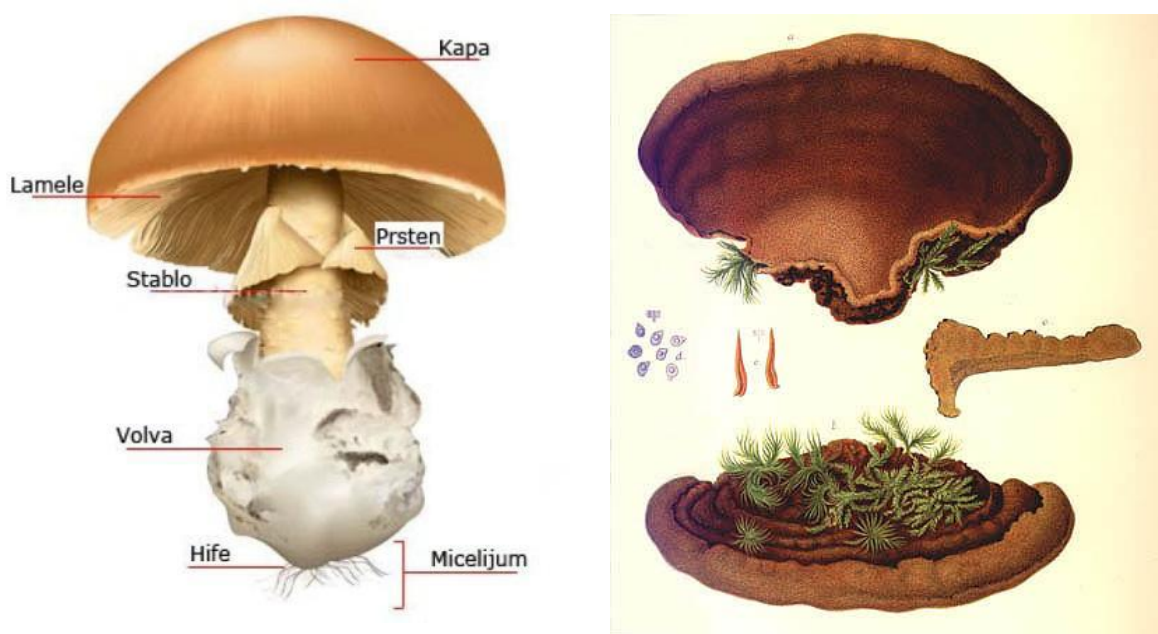
Хифа се састоји од једне или више ћелија окружених зидом цевастих ћелија. Код већине гљива, хифе су подељене у ћелије помоћу септи (преграда), које су везане преко пора за рибозоме, митохондрију а понекад и једро. Главни структурни полимер код ћелијског зида гљива је хитин, за разлику од ћелијског зида биљака и оомицета. Неки припадници Царства Гљива имају асептичне хифе, које карактерише одсуство септума (<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:HYPHAE>). Печурке не формирају ткива у физиолошком смислу и немају диференциране органе и карактеристично је што су варијабилне по саставу и величини талуса и на основу тога се разликују. Мицелијалан талус сачињавају издужене ћелије (хифе). Код неких гљива протоплазма струји кроз несегментисане хифе, док се код осталих гљива струјање протоплазме одвија кроз

2. Општи део

сегментисане хифе, које имају попречне преграде, са једном или више пора (Webster и Weber, 2007).

Што се тиче припадника рода *Ganoderma*, њихова плодна тела углавном имају химениодерм, харакодерм и анамиксодерм. Код *Elfvigia*-е у коју спада *G. applanatum* кора pileus-а је триходермична или неправилне „тквивне” структуре. Наведене структурне карактеристике су веома корисне за идентификацију неког од припадника овог рода, с обзиром да често долази до разлика код јединки исте врсте где долази до варијација у појединим структурним облицима. Њихова плодна тела најчешће расту у облику вентилатора (fan-like) или копита (hoof-like) како на живом тако и на мртвом дрвећу као сапротрофи и сапроби. Карактерише их дупли зид са изрезбареним спорама жутих до браон унутрашњих слојева *Ganoderma* врста (Flood и др., 2000).

2. Општи део



Слика 2.3. Грађа 2.3.a) печуркастог тела гљиве *A. bisporus* и 2.3.б) конзоласног тела полипорних гљива *Phellinus pini* from Jean Louis Émile Boudier (1904 - 1909) *Icones mycologicae ou iconographie des champignons de France, principalement Discomycètes* (Chang и Miles, 2000) (<http://www.mushroomthejournal.com/greatlakesdata/Terms/Polyp296.html>)

Гљиве за репродукцију користе споре, специфичне врсте ћелија (бесполне или полне) које се стварају директно на мицелији или на специфично диференцираним структурама–спорофорима (структуре које носе репродуктивне споре). На **Слици 2.3.** могу се разликовати основни делови спорокарпа печуркастих гљива: lat. *pileus* (клобук, капа), lat. *stipes* (дршка, стабло), *lamela* (ламеле присутне код неких гљива), *annulus* (прстен). Величина, облик, боја као и број спора важни су таксономски карактери тј. представљају специфичне карактере у идентификацији врста гљива. Често су мале и безбојне и могу остати суспендоване у ваздуху дуже време. Зато су оне битан параметар за широко распрострањење политипских врста гљива (Duraković и Duraković, 2003).

Класификација на основу грађе ћелијског зида и целокупног облика хифе

Познавање основних карактеристика хифа може бити од великог значаја при класификацији гљива. У таксономији Basidiomycota, хифе које изграђују плодно тело гљиве могу бити идентификоване као: генеративне, скелетне или везујуће хифе.

2. Општи део

Генеративне хифе: релативно недиференциране, могу да учествују у развоју репродуктивних структура. Карактеришу их танки, згуснути зидови, који садрже септе и најчешће учествују у грађи слузи или желатинозних материјала.

Скелетне хифе: постоје у два облика. Класични облик карактеришу дебљи зидови, и изузетна дужина у односу на септиране генеративне хифе које не карактерише гранање, а уколико се јаве у разгранатој форми карактерише их мали садржај ћелија. Вретансте хифе су други облик скелетних хифа, које карактерише централно набубрење често веома широко дајући облик вретена.

Везујуће хифе: карактерише дебљи ћелијски зид и разгранатост. Подсећају обликом на рогове јелена или гране дрвећа због карактеристичног разгранатог облика.

На основу наведене поделе, 1932. године Корнер одређује термине: мономитични, димитични и тримитични хифални систем са циљем побољшане класификације полипорних гљива (Corner, 1932; Cunningham, 1954). Ова систематизација је модификована такође од стране Корнера 1966. године (Corner, 1966):

Мономитичне хифе: садрже искључиво генеративне хифе (пр. род *Agaricus*).

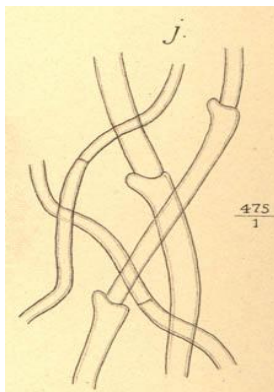
Димитичне хифе: садрже поред генеративних још један тип хифа, најчешће скелетни, са изузетком рода *Laetiporus* код ког су заступљене генеративне и везујуће хифе.

Подврста су саркодимитичне хифе које изграђују вретенасте скелетне и генеративне хифе

Тримитичне хифе: садрже сва три типа хифа (пр. род *Trametes*)

Подврста заступљена код неколико врста гљива су саркотримитичне хифе код којих су заступљене вретенасте скелетне, генеративне и везујуће хифе.

2. Општи део



Слика 2.4. Приказ димитичног система хифа
(<http://www.mushroomthejournal.com/greatlakesdata/Terms/dimit141.html>)

2.1.4. Биохемијски састав гљива

Највећи део садржаја свежих гљива чини вода (75-90 %), док је садржај протеина 19-35 % суве масе (с.м.). Садрже све есенцијалне аминокиселине неопходне за исхрану људи, лизин је најприсутнији, док су триптофан и метионин слабо заступљени.

Гљиве су богате протеинима и угљеним хидратима, али имају низак садржај масти (1,1-8,3 % суве масе), које су у виду слободних масних киселина, моно-, ди-, триглицерида, стерола (висок садржај провитамина D₂ и γ-ергостерола код *Basidiomycota*), естара стерола и фосфолипида па стога представљају добар извор хранљивих материја који је по саставу између меса и поврћа. Стога се гљиве сматрају здравим намирницама са ниским садржајем калорија, високим садржајем есенцијалних аминокиселина, витамина (B₁, B₇, B₃, B₅ и D) и минерала (K, Zn, Fe, Mg, Na, P), и ниским садржајем масти (Вано, 1993). У погледу садржаја масних киселина, доминирају незасићене масне киселине (72 %), од којих је најзаступљенија линолна киселина. Захваљујући чињеници да су код гљива у високом уделу присутне незасићене масне киселине (линолна киселина), то се доводи у везу са значајем гљива као здраве хране. Поред протеина и липида садрже и гликоген, органске киселине, алкалоиде, терпеноидна једињења, витамине B комплекса, међу којима доминирају тиамин, биотин, никотинска киселина, пантотенска киселина и пара-амино-бензоева киселина (Chang и Miles, 2004).

2. Општи део

Најважнија органска једињења у гљивама су на бази азота. Од тога 2/3 укупног азота улази у састав протеина, а остатак је у хитину, нуклеинским киселинама и слободним аминокиселинама. До 50 % суве материје у гљивама чине једињења на бази угљеника, који се јавља у полисахаридима. Последњих година се много ради на карактеризацији хидросолубилних полисахарида, због њиховог антитуморског дејства (Chang i Miles, 2004; Paterson, 2006).

Макрогљиве, за разлику од биљака, могу да акумулирају велике количине јона метала, чак и када настајују земљиште које није богато металима. Осим тога, гљиве имају способност да апсорбују и елементе у траговима и да их акумулирају у својим плодним телима (Kabata-Pendias, 2011). Однос концентрације неког елемента акумулираног у плодном телу гљиве и концентрације истог елемента у супстрату (земљишту) означава се као биоакумулаторски фактор - BAF (engl. *bioaccumulation factor*), односно фактор биоакумулације. Јони елемената који су углавном заступљени у макрогљивама и имају $BAF > 1$ јесу: Au, Ag, As, Br, Cd, Cl, Cs, Cu, Hg, Rb, Se, Vn i Zn, док се међу елементе који су обично заступљени у нижим концентрацијама ($BAF < 1$) сврставају: Co, Cr, F, I, Ni, Sb, Sn, Th, U. Код неких врста гљива долази до хиперакумулације одређеног елемента (нпр. Fe), па вредности за BAF могу бити и до десет пута веће него код сличних врста (Borovička и др., 2006; Falandysz и др., 2001).

Многи од горе наведених макро- и микроелемената су есенцијални за гљиве и могу имати нутритивну вредност, али они такође својим присуством утичу на различите биолошке и метаболичке активности гљива (кофактори ензима, катализатори и др.). На пример, јон селена (Se) је веома значајан елемент и његов садржај може варирати у зависности од врсте гљиве. Неке врсте обилују са Se^{n+} и могу се сматрати потентним антиоксидантима, обзиром на то да су важни ензими укључени у борбу против оксидативног стреса селенопротеини (селен-зависна-GSHPx) (Rayman, 2008). Од осталих јона у гљивама су заступљенији: K, P, Na, Ca, Mg, Cu, Zn, Mn, Cd, Pb (Chang и Miles, 2000; Miles и Chang, 1997).

2.1.4.1. Секундарни биомолекули гљива

Гљиве су веома прилагодљиве на различита станишта, због израженог метаболичког потенцијала који дугују разноврсности и бројности ензимских реакција које се

2. Општи део

одвијају у њима, а последица су сесилног начина живота (Karaman, 2009) (Слика 2.5.). Метаболизам секундарних биомолекула карактерише висока сложеност биосинтетичких путева, који су вишефазни и укључују велики број ензима, мултиензимских система и њихових регулатора. Глоер (Gloer, 1995) је сугерисао да њихова биосинтеза није насумична већ да је у корелацији са еколошким факторима. Иако су гљиве изузетно богате секундарним биомолекулима, до данас је изоловано и окарактерисано око 4000 једињења. Међутим, Hawksworth (1991) наводи податак да је у гљивама присутно од 5000-7000 секундарних метаболита. Утврђено је да је различит хемијски састав у плодним телима, мицелијама и ферментационој култури.



Слика 2.5. Метаболички путеви код гљива (Deacon, 2006)

С обзиром на биогенетско порекло секундарни биомолекули гљива могу се класификовати у следеће категорије (Lorenzen и Anke, 1998):

2. Општи део

Секундарни метаболити који потичу из глукозе:

Полисахариди: β -D-глюкани: *лентинан* (*L. edodes*), *шизофилан* (*Sch. commune*),

хетерополисахариди: кисела полисахаридна фракција (*P. ostreatus*)

Гликопротеини: *PSK-крестин* (*C. versicolor*), *LEM, LAP* (*L. edodes*)

Хранљива влакна: хитин

За ова једињења је утврђено да поседују бројне биолошке и фармаколошке активности од којих је најзначајнија антитуморска (Ху и др., 2011; Zhao и др., 2010).

Секундарни метаболити који потичу из шикиматног пута:

У ову групу се убрајају једињења која поседују ароматични прстен:

стробилурини,

оудемансини,

анисалдехид, 3-хлоро-анисалдехид и (4-метоксифенил)-1, 2-пропандиол

армиларсин и

хинони: омфалон, миценон

За ову групу једињења утврђена је антивирална активност (Lindequist и др., 2005; Paterson, 2006)

Секундарни метаболити који потичу из ацетат-малонатног пута:

полиацетилени: *скородонин, агроцибин*

поликетиди: *мерулинска киселина, херицени А, В, С...*

За ову групу једињења је утврђено да показују снажно антивирално деловање услед интеракција са вирусним омотачем (Paterson, 2006)

Секундарни метаболити који потичу из ацетат-мевалонатног пута:

терпени:

монотерпени

сесквитерпени (најзаступљенији код *Basidiomycota*)

протоилудани: *армиларин, армиларидин и армиларична киселина*

илудани: *илудин М, илудин S*

марасмани: *марасминска киселина, пилатин, хифодонтал*

хирсутани: *кориолин В, дикетокориолин В, хирсутична киселина С и компликатична киселина, фелодонична киселина*

лактарани и секолактарани: *бленин А, деоксилактарорурфин А, омфалодин*

изолактарани и стерпурани

фоманозини, гуаиани, еудезмани и гермакрани, дримани

дистерпени: *плеуромутилин, циатини*

сестерпени

тристерпени

стероиди:

хебеломична киселина А, В, Е, F

2. Општи део

За ове групе једињења је утврђен широк спектар активности: антибактеријска, антиинфламаторна, антиоксидантна, антивирална, антипролиферативна, хепатопротективна, хиполипидемична, хипотензивна

Секундарни метаболити који потичу из аминокиселина:

пептидне структуре:

беауверицин (*L. sulphureus* циклодепсипептид)

омфалотин (циклични пептид)

мускарин (*A. muscaria*, *A. pantherina*)

иботенична киселина

лектини:

GLLs (*G. lucidum*)

Код великог броја једињења пептидне структуре утврђена је инсектицидна активност, док су код омфалотина забележени нематоцидни ефекти.

Секундарни метаболити непознатог биогенетског порекла:

басидалин (γ - лактон) који поседује слаб антибактеријски и продужен антитуморски ефекат на ћелије леукемије

тиромицин (бис- лактон) који настаје кондензацијом еикосанедоичне киселине са два молекула оксалоацетата

адустин је антифунгални антибиотик и

птерулна киселина и *птерулин* који поседују антифунгално деловање.

2.1.5. Лигниколне гљиве

Лигниколним гљивама се називају поједини представници раздела (Phylum) *Ascomycota* и *Basidiomycota*, чија је заједничка карактеристика да као супстрат користе дрво (дрвену масу) коју разграђују би дошли до материја неопходних за сопствену раст и развој. Уколико су на живом дрвећу, понашају се као паразити, а уколико егзистирају на мртвом дрвећу, оне су сапротрофи. Елементи који су есенцијални за њихов метаболизам су: угљеник, азот, фосфор, калијум, магнезијум, бакар, гвожђе и цинк којима се снабдевају директно из дрвета, формирајући своја плодна тела директно на површини дрвета и апсорбујући потребне материје. Главни извори угљеника су угљени хидрати, и то: скроб, целулоза и хемицелулоза (Dix и Webster, 1995; Karadžić, 1992 из Karaman, 2009). Иако су лигниколне гљиве у директном контакту са својим супстратом, а само посредно са околним земљиштем тако да се њихово расејавање најчешће врши преко спора, а велики број припадника ових врста

2. Општи део

гљива способан је да се распростире путем кончастих творевина (ризоморфа) до плодног тела. На овај начин гљиве долазе у директан контакт са земљиштем и корењем биљака, па тиме и хемијски састав земљишта утиче на такве гљиве двоструко: индиректно преко биљке домаћина и директно (Karaman, 2009).

Ткиво дрвета је тешко разградиво и састоји се од приближно $\frac{3}{4}$ целулозе и хемицелулозе и $\frac{1}{4}$ лигнина, а лигниколне гљиве поседују специфичан ензимски систем и способне су да врше потпуну деградацију свих основних конституената дрвне масе (Karaman, 2009).

Лигнин је фенолни биополимер хетерогене структуре и неодређене примарне структуре. Главна улога му је да обезбеди чврстину биљног материјала. Ковалентно је умрежен са целулозом и хемицелулозом и ово умрежавање са наведним полисахаридима представља препреку за апсорпцију воде у ћелијском зиду, те стога лигнин омогућава васкуларном ткиву боље провођење воде. Само лигниколне гљиве и неке врсте бактерија имају способност хидролизе лигнина (Karaman, 2009).

Макрогљиве разарачи дрвета су паразити или агресивни сапрофити. Паразитне врсте доспевају до биљних домаћина својим спорама, а ређе директно мицелијом. Даљи ток болести зависи у многоме од патогености самих паразита, као и имунитета биљке домаћина. Факултативни паразити користе озледе на епидермису и кори дрвета за улазак у домаћина, или ожиљке на листовима, али и ткива ослабљена сушом или неким другим утицајем микроорганизама. Прави паразити (*Armillaria mellea* и *Fomes annosus*) продиру путем одумрлог корена, где гљива више или мање разара корен и на тај начин се постепено пење у редишњи део стабла (Kišpatić, 1982). У стаблу се процес дрвне трулежи дешава у унутрашњем делу: дебла, дебљих грана или корена и у већини случајева ту и остане, док ретко прелази до спољних делова.

Велики број лигниколних гљива је високо специјализован за супстрат који користи, односно врсту дрвета на коме расту. Ова специфичност је условљена пре свега ензимима које гљива поседује, али и хемијским и физичким особинама саме биљке домаћина (састав ћелијског зида, степен влажности ткива, степен аерисаности ткива, особине екскремената биљке који инхибирају раст гљива односно присуство тзв. антифунгалних супстанци).

2. Општи део

Иако су лигниколне гљиве у директном контакту са својим супстратом, а само посредно са околним земљиштем, при чему се њихово расејавање најчешће врши путем спора, велики број ових врста гљива је способан да се распростире и путем ризоморфа (посебних кончастих творевина). Ризоморфе се пружају и по неколико метара кроз земљиште и осим што чине могућим распрострањавање гљиве, служе и за транспорт хранљивих материја из супстрата (дрвне масе и земљишта) до плодног тела гљиве. На тај начин гљиве долазе у директан контакт са земљиштем и кореновима биљака. Стога, хемијски састав земљишта утиче на такве гљиве двоструко: индиректно, преко биљке домаћина и директно.

Једна од важних особина лигниколних *Basidiomycota* је да могу да се развијају на веома ниским концентрацијама азота, при чему стварају мицелију сиромашну азотом. Поред тога, при одумирању старијих делова мицелије, ове гљиве су способне да транслоцирају азот у млађе, метаболички активне хифе (Dix и Webster, 1995 из Karaman, 2009).

Потпуном разградњом дрвних материја у процесима труљења, остварује се витална улога гљива у природи, посебно лигниколних врста, које поново враћају CO₂ и H₂O природи у непромењеној форми, чиме се наставља кружење материје у живим екосистемима.

2.1.5.1. Процес дрвне трулежи

Развијајући се на живом или мртвом дрвећу, лигниколне гљиве обезбеђују неопходне материје (енергију за раст и развој) изазивајући процес труљења тј. процес хидролизе главних конституената ћелијске мембране дрвета (целулозе, хемицелулозе и лигнина) изазивајући различита обољења и промену механичких својстава супстрата. Ензими који су задужени за овај процес укључују слободне радикале за деполимеризационе механизме реакција.

Лигнолитички систем чине: оксидазе, пероксидазе и H₂O₂ продукујући ензими (Baldrian, 2008).

Добро проучене лигнолитичке ензиме представљају: лаказа, лигнин пероксидаза, манган пероксидаза, целобиоза дехидрогеназа и други екстрацелуларни ензими. Због умрежености са другим компонентама ћелијског зида, лигнин умањује приступачност

2. Општи део

целулозе и хемицелулозе микробиалним ензимима. Стога је лигнин генерално говорећи, задужен и за смањење дигестибилност биљне биомасе што помаже одбрани од патогена и пестицида.

Метаболички пут зависи од врсте дрвне трулежи коју гљива изазива, тако разликујемо три врсте трулежи (Reid, 1995 из Karaman, 2009):

Бела трулеж: најефикаснији разграђивачи лигнина су гљиве подраздела *Basidiomycota*, које су способне за потпуну минерализацију, како лигнина, тако и свих угљенохидратних компонената дрвета више мање истовремено, па дрво добија светлију боју од нормалне, услед оксидације лигнина (ензимима лигниназама, оксидазама, који врше његову оксидацију са екстрацелуларном пероксидазом као катализатором). Дрво постаје: влажније, мекше, порозно и беље. Гљиве рода *Ganoderma* су главни представници белих трулежница, а селективна делигнификација наведеног рода је повезана са способношћу овог рода да првенствено деградира фенолна једињења која су структурно слична лигнину (Schwarze, 2007 из Karaman, 2009).

Мрка трулеж: ове гљиве селективно разграђују целулозу и хемицелулозу, док долази до нагомилавања лигнина, што за последицу има деметилизован лигнин, који је делимично оксидован и полимеризован. Овако модификован лигнин даје дрвету карактеристичну боју и конзистенцију (Schwarze, 2007 из Karaman, 2009). Гљиве мрке трулежи чине свега 6 % свих лигниколних врста, и претежно припадају разделу *Basidiomycota*, и сматра се да су еволуирале из гљива беле трулежи.

Мека трулеж: до ње доводе гљиве подраздела *Ascomycota* и *Deuteromycota*, које узрокују губитак механичке отпорности те дрво постаје спонгиозно и влажно. Ове гљиве разлажу целулозу и хемицелулозу, док само неке делимично разлажу и лигнин. Хемијски су гљиве ове групе доста сличније мрким трулежницама због горе наведених својстава. Све већи број случајева дрвећа које је захваћено меким трулежницама упућује на то да овај тип трулежи настаје као последица беле- односно мрке- трулежи (Schwarze, 2007 из Karaman, 2009).

2. Општи део

Табела 2.2. Лигниколне гљиве раздела *Basidiomycota* и тип трулежи (Dix и Webster; Schwarze и др., 2000)

ВРСТА	ФАМИЛИЈА	ТИП ТРУЛЕЖИ
<i>Armillaria mellea</i>	<i>Physalacriaceae</i>	Бела трулеж
<i>Coniophora puteana</i>	<i>Coniophoraceae</i>	Мрка трулеж
<i>Coriolus versicolor</i>	<i>Polyporaceae</i>	Бела трулеж
<i>Daedalea quercina</i>	<i>Fomitopsidaceae</i>	Мрка трулеж
<i>Flammulina velutipes</i>	<i>Physalacriaceae</i>	Бела трулеж
<i>Fomes fomentarius</i>	<i>Polyporaceae</i>	Мрка трулеж
<i>Ganoderma applanatum</i>	<i>Ganodermataceae</i>	Бела трулеж
<i>Ganoderma australe</i>	<i>Ganodermataceae</i>	Бела трулеж
<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Ganodermataceae</i>	Бела трулеж
<i>Inonotus hispidus</i>	<i>Hymenochaetaceae</i>	Мека трулеж
<i>Irpex lacteus</i>	<i>Meruliaceae</i>	Бела и мрка трулеж
<i>Laetiporus sulphureus</i>	<i>Fomitopsidaceae</i>	Мрка трулеж
<i>Meripilus giganteus</i>	<i>Meripilaceae</i>	Бела трулеж
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	<i>Phanerochaetaceae</i>	Бела и мрка трулеж
<i>Phlebia tremellosa</i>	<i>Meruliaceae</i>	Бела трулеж
<i>Piptoporus betulinus</i>	<i>Fomitopsidaceae</i>	Мрка трулеж
<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Pleurotaceae</i>	Бела трулеж
<i>Schizophyllum commune</i>	<i>Schizophyllaceae</i>	Бела трулеж
<i>Stereum hirsutum</i>	<i>Stereaceae</i>	Бела трулеж

2.1.6. Гљиве рода *Ganoderma*2.1.6.1. Биолошке карактеристике врста рода *Ganoderma*

Гљиве рода *Ganoderma* (грчки *ganos/γανος* је сјај, *derma/δερμα* је кожа) (Liddell и Scott, 1980) припадају разделу *Basidiomycota*, и представљају беле трулежнице.

Род *Ganoderma* први помиње фински миколог Peter Adolf Karsten (1881) темељено на врсти *Polyporus lucidus* W. Curt. 1889 Karsten уводи род *Elfvigia* базирано на врсти *Polyporus applanatus* (Pers. Ex S.F. Gray) Wallr, док Imazeki (1943) предлаже подрод *Elfvigia* P. Karst. 1889. Donk (1948) уводи термин *Ganodermataceae*, док се према Ryvarden-у (1991), род налази у стању „таксономског хаоса“ (Gottlieb и Wright, 1999). Данашњи род *Ganoderma* броји 219 врста, од којих је око 30 познатих и описаних у оквиру подврсте *Elfvigia* (Kaliyaperumal и Thangavelu Kalaichelvan, 2007; Seo и Kirk, 2000).

Припадници фамилије *Ganodermataceae* су полипорне гљиве које живе на дрвећу као сапротрофи, или могу бити паразити ослабљених дрвенастих биљака. Распрострањене су широм света, а чешће у тропским регионима Земље. Разликују се

2. Општи део

од других полипорних врста по томе што имају дупли зид базидиоспоре (Hong и Jung, 2004; Ofodile и др., 2005). Облик и величина базидиоспора, текстура pileus-а су карактеристике које обезбеђују разлику између врста рода *Ganoderma* (Hong и Jung, 2004). Овај род карактерише базидиокарп, то су велике вишегодишње, дрвенасте врсте са или без дршке. За њих је карактеристичан тримитични хифални систем, који се састоји од: везујућих, скелетних и генеративних хифа.

Ryvarden (1995) издваја следеће морфолошке карактеристике гљива рода *Ganoderma*:

Величина и облик базидиокарпа нису униформни

Боја клобука *pileusa* и дршке *stipesa* се мења са старошћу врсте

Величина пора је таксономски карактер

Боја површине пора и њен садржај се мењају временом

Већина врста из групе *G. lucidum* има тримитични хифални систем, док се по записима Ryvarden (2000) издваја 15 врста из ове групе са димитичним хифалним системом

Величина и облик апикалних ћелија pileus-а је једна од константних карактеристика таксономске врсте

Базидиоспоре варирају и по величини и облику (Bhosle и др., 2010)

Постоје бројни записи о терапеутским ефектима плодних тела, мицелија и спора код астме, артритиса, анорексије, дијабетеса, гастритиса, хроничних хепатитиса, хипертензије, хипергликемије, мигрене, нефритиса, срчаних проблема и затвора (Chen и др., 2008; Paterson, 2006).

Гљиве рода *Ganoderma* се проучавају годинама са различитих тачка гледишта:

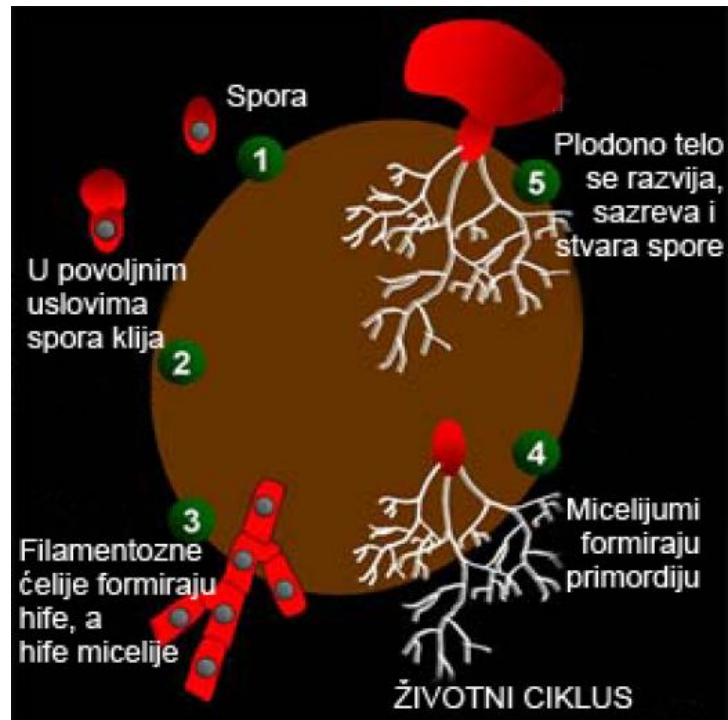
као извор дрога и додатака исхрани (дијететских производа)

као биљни патогени код култура: палмино уље, кокос, чај, кафа, какао и дрвеће (Paterson, 2007)

као узрок астме услед ширења спора у ваздуху (Craig и Laventin, 2000)

као извор лигнолитичких ензима код потенцијалне примене у текстилној индустрији, детоксификацији загађених вода и бројним другим биотехнолошким поступцима (Wang и Ng, 2006)

2. Општи део



Слика 2.6. Животни циклус *Ganoderma* врста (<http://www.hbp.usm.my/1b/GT/ganoderma.html>)

Према *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: April 2013* гљиве рода *Ganoderma* се класификују на следећи начин:

Род: *Ganoderma*
Царство: Fungi
Раздео: Basidiomycota
Класа: Agaricomycetes
Ред: Polyporales
Фамилија: Ganodermataceae

2. Општи део

Табела 2.3. Списак врста рода *Ganoderma* (https://eol.org/content_partners/14)

<i>Ganoderma adpersum</i> (Schulzer) Donk 1969
<i>Ganoderma ahmadii</i> Steyaert 1972
<i>Ganoderma albomarginatum</i> S. C. He 1989
<i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat. 1887
<i>Ganoderma asperulatum</i> (Murrill) Sacc. & Trotter 1912
<i>Ganoderma atrum</i> J.D. Zhao, L.W. Hsu & X.Q. Zhang 1979
<i>Ganoderma austrofujianense</i> J.D. Zhao, L.W. Hsu & X.Q. Zhang 1979
<i>Ganoderma bawanglingense</i> J. D. Zhao & X. Q. Zhang 1987
<i>Ganoderma brownii</i> (Murrill) Gilb. 1961
<i>Ganoderma bruggemanii</i> Steyaert 1972
<i>Ganoderma calidophilum</i> J.D. Zhao, L.W. Hsu & X.Q. Zhang 1979
<i>Ganoderma cantharelloideum</i> M. H. Liu 1989
<i>Ganoderma capense</i> (Lloyd) Teng 1963
<i>Ganoderma carnosum</i> Pat. 1889
<i>Ganoderma cehengense</i> X. L. Wu 1995
<i>Ganoderma cervinum</i> Bres. 1916
<i>Ganoderma chalceum</i> (Cooke) Steyaert 1967
<i>Ganoderma chenhaiense</i> J. D. Zhao 1989
<i>Ganoderma colossus</i> (Fr.) C. F. Baker 1918
<i>Ganoderma corrugatum</i> Steyaert 1961
<i>Ganoderma crebrostriatum</i> J. D. Zhao & L. W. Hsu 1983
<i>Ganoderma cupreolaccatum</i> (Kalchbr.) Z. Igmándy 1968
<i>Ganoderma curtisii</i> (Berk.) Murrill 1908
<i>Ganoderma daiqingshanense</i> J. D. Zhao 1989
<i>Ganoderma dejongii</i> Steyaert 1972
<i>Ganoderma densizonatum</i> J.D. Zhao & X.Q. Zhang 1986
<i>Ganoderma diaoluoshanense</i> J. D. Zhao & X. Q. Zhang 1987
<i>Ganoderma donkii</i> Steyaert 1972
<i>Ganoderma dorsale</i> (Lloyd) Torrend 1920
<i>Ganoderma dussii</i> Pat. 1899
<i>Ganoderma fassioides</i> Steyaert 1961
<i>Ganoderma fici</i> Pat. 1892
<i>Ganoderma flexipes</i> Pat. 1907
<i>Ganoderma formosanum</i> T. T. Chang & T. Chen 1984
<i>Ganoderma guinanense</i> J. D. Zhao & X. Q. Zhang 1987
<i>Ganoderma guizhouense</i> S. C. He 1988
<i>Ganoderma hainanense</i> J.D. Zhao, L.W. Hsu & X.Q. Zhang 1979
<i>Ganoderma hoploides</i> Steyaert 1961
<i>Ganoderma impolitum</i> Corner 1983
<i>Ganoderma jianfenglingense</i> X. L. Wu 1996
<i>Ganoderma kosteri</i> Steyaert 1972
<i>Ganoderma kunmingense</i> J. D. Zhao 1989
<i>Ganoderma lamaoense</i> Steyaert 1972
<i>Ganoderma leucocreas</i> Pat. & Har. 1912
<i>Ganoderma leytense</i> Steyaert 1972
<i>Ganoderma limushanense</i> J. D. Zhao & X. Q. Zhang 1986
<i>Ganoderma lobatoideum</i> Steyaert 1980
<i>Ganoderma lobatum</i> (Schwein.) G. F. Atk. 1908
<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst. 1881
<i>Ganoderma luteicinctum</i> Corner 1983
<i>Ganoderma luteomarginatum</i> J.D. Zhao, L.W. Hsu & X.Q. Zhang 1979
<i>Ganoderma magniporum</i> J. D. Zhao & X. Q. Zhang 1984
<i>Ganoderma manoutchehrui</i> Steyaert 1972

2. Општи део

- Ganoderma mediosinense* J. D. Zhao 1988
Ganoderma meijangense J. D. Zhao 1988
Ganoderma meredithiae Adask. & Gilb. 1988
Ganoderma microsporium R. S. Hseu 1989
Ganoderma miniatocinctum Steyaert 1967
Ganoderma mirabile (Lloyd) Humphrey 1938
Ganoderma mirivelutinum J. D. Zhao 1988
Ganoderma multipileum Hou 1950
Ganoderma multiplicatum (Mont.) Pat. 1889
Ganoderma neojaponicum Imazeki 1939
Ganoderma nitidum Murrill 1908
Ganoderma ochrolaccatum (Mont.) Pat. 1889
Ganoderma oerstedii (Fr.) Torrend 1902
Ganoderma orbiforme (Fr.) Ryvarden 2000
Ganoderma oregonense Murrill 1908
Ganoderma oroleucum Pat. & Har. 1906
Ganoderma ostracodes Pat. 1913
Ganoderma parviungulatum J. D. Zhao & X. Q. Zhang 1986
Ganoderma pfeifferi Bres. 1889
Ganoderma philippii (Bres. & Henn. ex Sacc.) Bres. 1932
Ganoderma platense Speg. 1926
Ganoderma puglisii Steyaert 1972
Ganoderma ramosissimum J. D. Zhao 1989
Ganoderma ravenelii Steyaert 1980
Ganoderma resinaceum Boud. 1890
Ganoderma reticulatosporum (Van der Byl) D. A. Reid 1973
Ganoderma rothwellii Steyaert 1980
Ganoderma rotundatum J.D. Zhao, L.W. Hsu & X.Q. Zhang 1979
Ganoderma sanmingense J. D. Zhao & X. Q. Zhang 1987
Ganoderma sculpturatum (Lloyd) Ryvarden 1989
Ganoderma sessiliforme Murrill 1912
Ganoderma shandongense J.D. Zhao & X.Q. Zhang 1986
Ganoderma shangsiense J. D. Zhao 1988
Ganoderma sichuanense J. D. Zhao & X. Q. Zhang 1983
Ganoderma simaoense J. D. Zhao 1988
Ganoderma sinense J.D. Zhao, L.W. Hsu & X.Q. Zhang 1979
Ganoderma stipitatum (Murrill) Murrill 1908
Ganoderma stratoideum S. C. He 1989
Ganoderma sublucidum (Beeli) Steyaert 1961
Ganoderma subresinosum (Murrill) Humphrey 1938
Ganoderma subtornatum Murrill 1907
Ganoderma tenue J.D. Zhao, L.W. Hsu & X.Q. Zhang 1979
Ganoderma testaceum (Lév.) Pat. 1889
Ganoderma theaecolum J. D. Zhao 1984
Ganoderma tibetanum J. D. Zhao & X. Q. Zhang 1983
Ganoderma tornatum (Pers.) Bres. 1912
Ganoderma trengganuense Corner 1983
Ganoderma triangulum J. D. Zhao & L. W. Hsu 1984
Ganoderma tropicum (Jungh.) Bres. 1910
Ganoderma trulla Steyaert 1972
Ganoderma trulliforme Steyaert 1972
Ganoderma unguatum J. D. Zhao & X. Q. Zhang 1984
Ganoderma valesiacum Boud. 1895
Ganoderma vanheurnii Steyaert 1972
Ganoderma weberianum (Bres. & Henn. ex Sacc.) Steyaert 1972

2. Општи део

Ganoderma williamsianum Murrill 1907
Ganoderma xingyiense S. C. He 1989
Ganoderma zhenningense S. C. He 1995
Ganoderma zonatum Murrill 1902
Amauroderma (Patouillard) Torrend, 1920
Amauroderma Murrill, 1905 +
Ganodermites A. Fleischmann, M. Krings, H. Mayr & R. Agerer, 2007
Haddowia R. L. Steyaert, 1972 +
Humphreya R. L. Steyaert, 1972 +

Гљиве рода *Ganoderma* су лигниколне полипорне гљиве са космополитском распрострањеношћу и способношћу раста како на четинарском тако и листопадном дрвећу храста, букве, кестена и јавора. Плодна тела расту у облику налик вентилатору или копиту на живом дрвећу као паразит или мртвом као сапротроф узрокујући белу трулеж дрвећа. Род броји око 110 врста, од којих су многе из тропских региона које карактеришу услови високе температуре, где расту на различитим врстама дрвећа (Kirk и др., 2008). Донедавно, род је био подељен у две секције: секција *Ganoderma* са сјајном површином клобука (нпр. *G. lucidum*) и *Elfvingia*, са мат површином (нпр. *G. applanatum*) (Smith и Sivasithamparam, 2003). Филогенетском анализом употребом DNA секвенцирања базираног на митохондријалној SSU rDNA, врсте рода *Ganoderma* се деле у шест монофилетских група:

G. colossus се разликује по пореклу од других врста рода и убраја се у род *Tomophagus* (Murrill, 1905)

G. applanatum и *G. lobatum* припадају подврсти *Elfvingia*

G. tsugae (Северна Америка) и *G. valesiacum* (Европа) су веома сродне врсте и расту на четинарима. Истој групи припадају и *G. oregonense* и *G. lucidum* (Европа и Канада)

G. lucidum (Америка, Тајван) припада групи у којој су и *G. resinaceum*, *G. pfeifferi* и *G. subamboinense* и имају способност производње хламидиоспора

У посебну групу се издвајају поједини сојеви *G. lucidum* и *G. resinaceum* које расту у Америци

2. Општи део

G. lucidum (Кореја, Јапан) је монофилетска врста која се разликује од врста са подручја Европе и Северне Америке (Hong и Jung, 2004)

2.1.6.2. Преглед биолошке активности гљива рода *Ganoderma*

Ganoderma врсте се вековима користе у медицинске сврхе нарочито у земљама далеког Истока: Кини, Јапану и Кореји (Wasser, 2005), док су систематска испитивања њихових фармаколошких ефеката почела тек пре 25 година (Boh и др., 2000). Постоје бројни синоними за гљиве наведеног рода, као што су: Lingzhi, Munnertake, Reishi, Sachitake и Youngzhi (Chen и др., 2008; Paterson, 2006).

Све гљиве рода *Ganoderma* узрокују белу трулеж дрвећа, са изузетком врсте *G. adpersum*. Познато је да беле трулежнице расту претежно на листопадном дрвећу: *Quercus*, *Acer*, *Ulmus*, *Salix*, али и дрвећу воћа: јабуке, брескве, шљиве (Papp и др., 2012). Термин „бела трулеж“ (енгл. „white rot“) представља својство гљива да разлажу лигнин као основну компоненте дрвета остављајући белу целулозу нетакнутом. Биодеградација целулозних компоненти је доста једноставна не само због чињенице да је изграђена од β -1,4-гликозидне везе унутар глукозних јединица. Тиме гљиве добијају енергију од шећерних компоненти, првенствено целулозе, али и скроба и пектина (Paterson, 2007).

До појаве трулежи долази преко различитих механизма укључујући селективну лигнификацију праћену изазивањем трулежи (Schwarze и Ferner, 2003).

Као последица трулежи дрво постаје мекше, док постепеним пропадањем губи чврстину, и у каснијој фази је изражен губитак крутости дрвне масе и добија порозну (сунђерасту) конзистенцију (Schwarze, 2000). Увелико се разматрају чињенице да ли гљиве могу да трансформишу једињења са домаћина на коме расту, а да саме нису у стању да произведу дата једињења? Одговор на то упућује сама чињеница да су гљиве рода *Ganoderma*, биоразграђивачи дрвне масе преко разградње лигнина где производе у првој фази фенолна једињења а потом и CO_2 и H_2O , неопходне за кружење енергије у природи (Leonowicz и др., 1999).

Гљиве беле трулежнице се класификују према лигнолитичким ензимима које поседују (Погледати **2.1.5. Лигниколне гљиве**):

2. Општи део

Лаказне гљиве (подрод *Ganoderma*): *G. lucidum* комплекс-продукује манган пероксидазу (MnP) и лаказу

Нелаказне гљиве (подрод *Elfvigia*): *G. applanatum* комплекс-продукује лигнин пероксидазе (LIP) (Парр и др., 2012)

Бројне класе једињења су детектоване у *Ganoderma* врстама: алкалоиди, аминокиселине, витамини (Paterson, 2006), фенолне киселине (Karaman и др., 2010; Kim и др., 2008; Stilinović и др., 2014; Yildiz и др., 2014; Zengin и др., 2015), ганомицини (Niedermeyer и др., 2013), лигнини и лектини (Rosecke и Konig, 2000), нуклеозиди, нуклеотиди, полисахариди (Amaral и др., 2008; Jeong и др., 2008; Kozarski и др., 2012; Lee и др., 2007; Nie и др., 2012), стероиди (Smania и др., 1999; Weng и др., 2010; Yuan и др., 2006; Ziegenbein и др., 2006), танини (Muhsin и др., 2011) и тритерпеноиди (Boh и др., 2000; Boh и др., 2007; Ko и др., 2008; 2013; Mothana и др., 2003; Niedermeyer и др., 2005; Smania и др., 2003)(Ofodile и др., 2005). Више од 140 биолошки активних тритерпеноида (ганодеричне, луциденичне, ганодермичне киселине и др.) и 200 полисахаридних једињења, лектина, протеина, стерола и других метаболита је изоловано из плодних тела, мицелија и спора различитих врста рода *Ganoderma* (Boh и др., 2000; Парр и др., 2012; Paterson, 2006; Trigos и Suarez Medellin, 2011).

2. Општи део

Табела 2.4. Биолошки активна једињења и медицински ефекти гљива рода *Ganoderma* (подручје Карпата)

ВРСТА	БИОАКТИВНА ЈЕДИЊЕЊА	МЕДИЦИНСКИ ЕФЕКТИ	РЕФЕРЕНЦА
<i>G. adpersum</i>	гљукани	антитуморски	(Kovalenko и др., 2010)* (Sadava и др., 2009)**
<i>G. applanatum</i>	апланатини β-гљукани хетерогљукани стероли други терпеноиди ганодерма алдехид ганодеричне киселине апланокисдична киселина активне масне киселине	антивирално антитуморски имуностимулаторно и хепатопротективно антиреуматски антимикробно антидијабетогено антиоксидантно	(Fushimi и др., 2010)* (Jeong и др., 1999; Kim и др., 1998)** (Lee и др., 2007; Usui и др., 1983)* (Sadava и др., 2009; Usui и др., 1983)** (Zjawiony, 2004)* (Hobs, 1995; Zjawiony, 2004)* (Ma и др., 2011; Nishitoba и др., 1988)* (Nishitoba и др., 1988)** (Ma и др., 2011) ** (Ming и др., 2002)* (Hobs, 1995)** (Rosecke и Konig, 2000)* (Moradali и др., 2006; Smania и др., 1999; Zjawiony, 2004)** (Paterson, 2006)* (Moradali и др., 2006)* (Yang и др., 2007)** (Acharya и др., 2005)** (Keller и др., 1997; Paterson, 2006)*
<i>G. carnosum</i>	ланостански тип стероида метил естар олеинске киселине глигерол триолеат егзополисахариди	антиимикробно	(Yamac и Bilgili, 2006)** (Paterson, 2006)* (Kizilcik и др., 2010)*
<i>G. cupreolaccatum</i>	стероли други терпеноиди	UV-протективно на кожу антивирално антимикробно антитуморски	(Timo и др., 2005; Zjawiony, 2004)* (Hoang-Minh и др., 2011)** (Mothana и др., 2003; Timo и др., 2005)*, ** (Mothana и др., 2003; Suay и др., 2000; Zjawiony, 2004)** (Sadava и др., 2009)**
<i>G. resinaceum</i>	β-гљукани екстерни полисахариди тритерпени	антимикробно антитуморски имуностимулаторно антиоксидантно	(Amaral и др., 2008)* (Al-Fatimi и др., 2005; Ofodile и др., 2005; Suay и др., 2000; Zjawiony, 2004)** (Chen и др., 2007)*, ** (Niu и др., 2007)*
<i>G. valesiacum</i>		антитуморски	(Al-Fatimi и др., 2005; Sadava и др., 2009)** (Sadava и др., 2009)**

* одговарајућа референца за биолошки активна једињења, ** одговарајућа референца уз медицински ефекат

2. Општи део

Од бројних активних компоненти, издвајају се полисахариди који испољавају широк спектар фармаколошких активности, као што су: антиоксидантна, антитуморска, хипогликемична, антимикуробна, анти-HIV и против старења (anti-aging) (Chen и др., 2008; Fan и др., 2012; Ferreira и др., 2015; Heleno и др., 2012; Ео и др., 2000; Као и др., 2008; Kozarski и др., 2012; Wang и др., 2013; Zhao и др., 2010), али и терпеноиди: антибактеријска, антиоксидативна, антитуморска, антивирусна, антиинфламаторна и имуномодулаторна (Cheng и др., 2010; Hu и др., 2002; Joseph и др., 2011; Као и др., 2008; Ко и др., 2008; Mothana и др., 2003; Niedermeyer и др., 2005; Ofodile и др., 2005; Shimizu и др., 2009; Smania и др., 1999; Zjawiony, 2004).

Ganoderma applanatum (Pers.) Pat. 1887



Царство:	<i>Fungi</i>
Раздео:	<i>Basidiomycota</i>
Класа:	<i>Agaricomycetes</i>
Ред:	<i>Polyporales</i>
Фамилија:	<i>Ganodermataceae</i>
Род:	<i>Ganoderma</i>
Врста:	<i>Ganoderma applanatum</i>

Слика 2.7. *Ganoderma applanatum*
(www.scmsfungi.org/fungi-ganoderma_applanatum.html)

Према бази података *Index Fungorum* постоји 13 записа у оквиру врсте (форма, подврста, варијетет) (<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>):

Ganoderma applanatum (Pers.) Pat. 1887,
Ganoderma applanatum f. *applanatum* (Pers.) Pat. 1887,
Ganoderma applanatum f. *australe* (Fr.) Bourdot & Galzin 1925, = *Ganoderma australe*);
Ganoderma applanatum f. *laccatum* (Sacc.) Golovin 1956, (also see Species Fungorum: *Ganoderma pfeifferi*);
Ganoderma applanatum f. *macrosporum* C.J. Humphrey & Leus-Palo 1931, (also see Species Fungorum: *Ganoderma applanatum*);
Ganoderma applanatum subsp. *applanatum* (Pers.) Pat. 1887, (also see Species Fungorum: *Ganoderma applanatum*);

2. Општи део

Ganoderma applanatum subsp. *australe* (Fr.) Bourdot & Galzin 1925, (also see Species Fungorum: *Ganoderma australe*);
Ganoderma applanatum var. *applanatum* (Pers.) Pat. 1887, (also see Species Fungorum: *Ganoderma applanatum*);
Ganoderma applanatum var. *laccatum* (Sacc.) Rea 1922, (also see Species Fungorum: *Ganoderma pfeifferi*);
Ganoderma applanatum var. *laevisporum* C.J. Humphrey & Leus-Palo 1931, (see Species Fungorum: *Ganoderma applanatum*);
Ganoderma applanatum var. *philippinense* C.J. Humphrey & Leus-Palo 1931, (also see Species Fungorum: *Ganoderma applanatum*);
Ganoderma applanatum var. *tornatum* (Pers.) C.J. Humphrey & Leus-Palo 1931, (also see Species Fungorum: *Ganoderma australe*);
Ganoderma applanatum var. *vegetum* (Fr.) Rea 1922, (also see Species Fungorum: *Ganoderma applanatum*)

Народни назив: *Ganoderme plan* (француски); *Red mother fungus*; *The artist's conk* (енглески) – „уметникова шкољка“ зато што се гребанем по белим порам са доње стране шешира може појавити браон боја хиџа, што су уметници користили за цртање по њеном хименофору.

Ganoderma applanatum (**Слика 2.7.**) (грчки „*gano*“ сјајан; „*derma*“ кожа; „*applanatum*“ раван, спљоштен) је *Basidiomycota*, коју још називају и *Elfvigia applanata* (Makino, 1989) нејестива гљива тврде, дрвенасте структуре. Списак синонима за врсту *G. applanatum* дат је у **Табели 2.5.**

Екологија: Расте током целе године као сапроб, а ређе као паразит на здравим, болесним или оштећеним стаблима букве, јавора, тополе, кестена, храста и др., или на мртвим стаблима, пањевима, корењу или гранама као сапротроф.

Плодно тело: је копитастог или конзоластог облика, величине до 30-40 cm, смеђе боје са белим рубом, прилично дебело, дрвенасто. Цевчице су смеђе боје, а поре беличасте, док на додир постају црвенкасте. Површина шешира је мат, лепезастог облика, полукружна смеђе до сивкасто браон боје. Површина пора је беле, прљаво-жуте, прљаво-смеђе до маслинасте боје. Чини је 4-6 ситних, скоро голим оком невидљивих пора од неколико mm (годишње се добија по једна) са дубином од око 4-12 mm. Обично не садржи стабљику, а ако је поседује онда је латерална или здепаста. Плодно тело и цевчице (лат. *tubes*) поцрне реакцијом са КОН.

2. Општи део

Микроскопске карактеристике: споре су браон до црвенкасте боје величине 8-12 x 6,5-8 μm ; углавном елипсоидне са непотпуним завршетком. При мањим микроскопским увећањима су глатке, док се употребом имерзионог уља појављује двоструки зид са низом „pila“ између зидова. Карактерише је тримитични хифални систем (http://www.mushroomexpert.com/ganoderma_applanatum.html).

G. applanatum, као и друге врсте рода *Ganoderma*, изазивају белу трулеж дрвета (енгл. white-rot fungi), када егзоензимима (оксидазе, пероксидазе и H_2O_2 продукујући ензими) селективно разграђују лигнин и целулозу (Baldrian, 2008; Dill и Kraepelin, 1986).

Распрострањеност: Космополитска врста која расте широм света, у скоро свим климатским зонама, па и у тропским, на свим континентима осим Антарктика (Kirk и др., 2008). Веома је распрострањена у SAD-у, са заступљеношћу чак у 50 држава. (http://www.mushroomexpert.com/ganoderma_applanatum.html).



Слика 2.8. Мапа распрострањења врсте *G. applanatum*
(http://eol.org/data_objects/21243830)

Употреба у традиционалној медицини: Вековима је кориштена у облику чаја у традиционалној медицини код народа Далеког истока за лечење реуматских обољења, туберкулозе и канцерозних обољења једњака

2. Општи део

(Giovaninni, 2006; Jeong и др., 2008). H₂O екстракти (чајеви) ове гљиве се и данас користе за лечење многих болести од прехладе до канцера и АИДС-а.

Фармакологија и клиничка испитивања: До сада су из *G. applanatum* изоловане различите биоактивне компоненте, као што су: стероиди, масне киселине, апланоксидична киселина, фураноганодеринска киселина, високо оксидовани тритерпеноиди ланостанског типа (ганодерична, ганодеренска, ганолуциденска и луциденска киселина) (Wasser и Weis, 1999). Фитохемијским анализама је доказано и присуство: сапонина, флавоноида, кардијачних гликозида и стероида (Manasseh и др., 2012). Wang и сар. су из плодног тела *G. applanatum* изоловали два нова бензопиран-4-он деривата (апланатини А и В), аналоге ганодерма алдехида (Wang и др., 2007). Jeong и сар. су радили на испитивањима имуномодулирајућих, односно антитуморских својстава егзобиополимера (ЕХР) *G. applanatum*, где су утврдили протективни ефекат испитиване врсте са следећим уделом хемијског састава ЕХР-а: 58,9 % угљених хидрата (48,4 % маноза и 40,9 % глукоза) и 17,1 % протеина (12,7 % серин, 11,6 % глицин, 11,1 % аспарагинска киселина и 10,5 % аланин) (Jeong и др., 2008). Поређењем са резултатима Kim-а и сар. долази се до сазнања да хемијски састав исте врсте услед различитих услова раста, станишта варијају и код исте врсте (Jeong и др., 2008; Kim и др., 1994).

Полисахариди, али и егзополисахариди (ЕПС) изоловани из *G. applanatum* повећавају *in vitro* пролиферацију ћелија слезине и стимулишу антитуморску активност код саркома мишева (Boh и др., 2000; Lee и др., 2007). Такође, повећавају и примарни имуни одговор слезине (Giovaninni, 2006). Битно је напоменути да је мицелија богатија садржајем ЕПС-а у односу на плодно тело гљиве (Lee и др., 2007). Ming и сар. су радили на изолацији и идентификацији: ганодерма алдехида, ергостерола, β-амиренона, 2-хидроксихексакозаноичне киселине, β-амирин ацетата, 2,5-дихидроксibenзоеве киселине и ганодеричних киселина (А, D и G) (Ming и др., 2002). Нуклеинске киселине изоловане из ове гљиве умањују број плакова *vaccinia* вируса у култури ткива фибробласта пилећег ембриона, а интравенозне дозе (*i.v.*) делују протективно када су у питању инфекције вирусом енцефалитиса који преносе крпељи код

2. Општи део

мишева. Пре десетак година изолована су једињења која модулирају хуморални имуни одговор (Гао и др., 2004). Постоје подаци о антивиралним и антибактеријским својствима MeOH и H₂O екстраката *G. applanatum* са одсуством негативних, токсичних ефеката (Kim и др., 1994).

Стероиди, али и фенолна једињења могу да изазову антимикуробну активност посредством различитих механизма као што су: инхибиција екстрацелуларних микробних ензима, губитка супстрата неопходних за раст микроорганизама или директним дејством на метаболизам микроорганизама инхибицијом оксидативне фосфорилације (Karaman и др., 2012). Такође су изоловане и квантификоване тритерпеноидне киселине, као што су ганодерична и ганодеренична киселина, где је највећа концентрација поменутих једињења присутна у цевчицама (порама), затим тамни слојеви pileus-a, док старији сегменти плодног тела имају најмањи садржај терпеноидних киселина (Voh и др., 2000). Значајан је антидијабетогени ефекат ове гљиве преко инхибиције алдоза редуктазе (Jung и др., 2005), али и цитотоксични ефекти на хепатома ћелијама (Ming и др., 2002).

Табела 2.5. *Синоними врсте G. applanatum (Pers.) Pat. 1887* (<http://www.nahuby.sk/atlas-hub/Ganoderma-applanatum/lesklokorovka-plocha/lesklokorka-ploska/ID246>)

Синоними *G. applanatum*

- Boletus applanatus* Pers., *Observ. mycol.* (Lipsiae) 2: 2 (1800) [1799]
Boletus fomentarius var. *applanatus* (Pers.) Pers., *Syn. meth. fung.* (Göttingen) 2: 536 (1801)
Elfvigia applanata (Pers.) P. Karst., *Bidr. Känn. Finl. Nat. Folk* 48: 334 (1889)
Elfvigia megaloma (Lév.) Murrill, *Bull. Torrey bot. Club* 30(5): 300 (1903)
Fomes applanatus (Pers.) Fr., *Summa veg. Scand.*, Sectio Post. (Stockholm): 321 (1849)
Fomes applanatus (Pers.) Fr., *Summa veg. Scand.*, Sectio Post. (Stockholm): 321 (1849)
 f. *applanatus*
Fomes applanatus f. *coralloides* Glaser, *Acta Soc. Bot. Pol.* 22: 809 (1953)
Fomes applanatus f. *leucophaeus* (Mont.) Lloyd
Fomes applanatus (Pers.) Fr., *Hyménomycètes* (Alençon): 685 (1849) var. *applanatus*
Fomes applanatus var. *leucophaeus* (Mont.) Cleland & Cheel, *J. Proc. R. Soc. N.S.W.* 51: 518 (1918)
Fomes gelsicola Berl., *Malpighia* 3: 373 (1889)
Fomes incrassatus (Berk.) Cooke, *Grevillea* 14(no. 69): 21 (1885)
Fomes leucophaeus (Mont.) Cooke, *Grevillea* 14(no. 69): 18 (1885)
Fomes longoporus Lloyd, *Mycol. Writ.* 6: 940 (1920)
Fomes megaloma (Lév.) Cooke, *Grevillea* 14(no. 69): 18 (1885)
Fomes stevenii (Lév.) P. Karst., *Bidr. Känn. Finl. Nat. Folk* 37: 75 (1882)
Fomes vegetus (Fr.) Fr., *Grevillea* 14(no. 69): 18 (1849)

2. Општи део

- Fomes vegetus* var. *leucostratus* Yamano, *Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ.* **6**: (199-236) (1931)
Fomes vegetus (Fr.) Fr., *Grevillea* **14**(no. 69): 18 (1849) var. *vegetus*
Friesia applanata (Pers.) Lázaro Ibiza, *Revta R. Acad. Cienc. exact. fis. nat. Madr.* **14**: 587 (1916)
Friesia vegeta (Fr.) Lázaro Ibiza, *Revta R. Acad. Cienc. exact. fis. nat. Madr.* **14**: 588 (1916)
Ganoderma applanatum (Pers.) Pat., *Hyménomyc. Eur.* (Paris): 143 (1887) f. *applanatum*
Ganoderma applanatum f. *macrosporum* C.J. Humphrey & Leus-Palo, *Philipp. J. Sci., C, Bot.* **45**(4): 551 (1931)
Ganoderma applanatum (Pers.) Pat., *Hyménomyc. Eur.* (Paris): 143 (1887) subsp. *applanatum*
Ganoderma applanatum (Pers.) Pat., *Hyménomyc. Eur.* (Paris): 143 (1887) var. *applanatum*
Ganoderma applanatum var. *laevisporum* C.J. Humphrey & Leus-Palo, *Philipp. J. Sci., C, Bot.* **45**(4): 533 (1931)
Ganoderma applanatum var. *philippinense* C.J. Humphrey & Leus-Palo, *Philipp. J. Sci., C, Bot.* **45**(4): 535 (1931)
Ganoderma applanatum var. *vegetum* (Fr.) Rea, *Brit. basidiomyc.* (Cambridge): 597 (1922)
Ganoderma flabelliforme Murrill, *J. Mycol.* **9**(2): 94 (1903)
Ganoderma gelsicola (Berl.) Sacc., *Fl. ital. crypt.*, Hymeniales (Genoa) **1**: 1010 (1916)
Ganoderma incrassatum (Berk.) Bres., *Hedwigia* **56**(4,5): 295 (1915)
Ganoderma incrassatum (Berk.) Bres., *Hedwigia* **56**(4,5): 295 (1915) f. *incrassatum*
Ganoderma incrassatum f. *substipitatum* Bres., *Hedwigia* **56**(4): 295 (1915)
Ganoderma leucophaeum (Mont.) Pat., *Bull. Soc. mycol. Fr.* **5**(2,3): 73 (1889)
Ganoderma megaloma (Lév.) Bres., *Hedwigia* **53**: 54 (1912)
Phaeoporus applanatus (Pers.) J. Schröt., in Cohn, *Krypt.-Fl. Schlesien* (Breslau) **3.1**(25-32): 490 (1888) [1889]
Placodes applanatus (Pers.) Quél., *Enchir. fung.* (Paris): 171 (1886)
Placodes vegetus (Fr.) Quél., *Enchir. fung.* (Paris): 171 (1886)
Polyporus applanatus (Pers.) Wallr., *Fl. crypt. Germ.* (Norimbergae) **2**: 591 (1833)
Polyporus applanatus (Pers.) Wallr., *Fl. crypt. Germ.* (Norimbergae) **2**: 591 (1833) f. *applanatus*
Polyporus applanatus f. *stratosus* Sacc., *Nuovo G. bot. ital.* **8**(2): 162 (1876)
Polyporus concentricus Cooke, *Grevillea* **9**(no. 49): 13 (1880)
Polyporus incrassatus Berk., *J. Linn. Soc., Bot.* **16**(no. 89): 41 (1878) [1877]
Polyporus leucophaeus Mont. [as 'leucophaeum'], *Syll. gen. sp. crypt.* (Paris): 157 (1856)
Polyporus megaloma Lév., *Annls Sci. Nat., Bot., sér. 3* **5**: 128 (1846)
Polyporus merismoides Corda, in Sturm, *Deutschl. Fl.*, 3 Abt. (Pilze Deutschl.) **4**: 139 (1837)
Polyporus stevenii Lév., *Annls Sci. Nat., Bot., sér. 3* **2**: 91 (1844)
Polyporus subganodermicus (Lázaro Ibiza) Sacc. & Trotter, *Syll. fung.* (Abellini) **23**: 369 (1925)
Polyporus vegetus Fr., *Epicr. syst. mycol.* (Upsaliae): 464 (1838) [1836-1838]
Scindalma gelsicola (Berl.) Kuntze, *Revis. gen. pl.* (Leipzig) **3**(2): 518 (1898)
Scindalma incrassatum (Berk.) Kuntze, *Revis. gen. pl.* (Leipzig) **3**(2): 518 (1898)
Scindalma leucophaeum (Mont.) Kuntze, *Revis. gen. pl.* (Leipzig) **3**(2): 519 (1898)
Scindalma megaloma (Lév.) Kuntze, *Revis. gen. pl.* (Leipzig) **3**(2): 519 (1898)
Scindalma stevenii (Lév.) Kuntze, *Revis. gen. pl.* (Leipzig) **3**(2): 519 (1898)
Scindalma vegetum (Fr.) Kuntze, *Revis. gen. pl.* (Leipzig) **3**(2): 519 (1898)
Ungularia subganodermica Lázaro Ibiza, *Revta R. Acad. Cienc. exact. fis. nat. Madr.* **14**: 674 (1916)

2. Општи део

Ganoderma lucidum (W. Curt.:Fr.) P. Karst.



Царство:	<i>Fungi</i>
Раздео:	<i>Basidiomycota</i>
Класа:	<i>Agaricomycetes</i>
Ред:	<i>Polyporales</i>
Фамилија:	<i>Ganodermataceae</i>
Род:	<i>Ganoderma</i>
Врста:	<i>Ganoderma lucidum</i>

Слика 2.9. *Ganoderma lucidum*

(<http://www.naturefg.com/pages/b-fungi/ganoderma%20lucidum.html>)

Према бази података *Index Fungorum* постоји 23 записа у оквиру врсте (форма, подврста, варијетет) (<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>):

Ganoderma lucidum sensu auct. asiatic.,
Ganoderma lucidum (Curtis) P. Karst. 1881,
Ganoderma lucidum f. *alneum* Bourdot & Galzin 1925,
Ganoderma lucidum f. *annulatum* Torrend 1920,
Ganoderma lucidum f. *boninense* Pat. 1887,
Ganoderma lucidum f. *hemisphaericum* Torrend 1920,
Ganoderma lucidum f. *lucidum* (Curtis) P. Karst. 1881,
Ganoderma lucidum f. *martellii* (Bres.) Bourdot & Galzin 1925,
Ganoderma lucidum f. *naiae* Chona & Munjal 1956,
Ganoderma lucidum f. *noukahivensis* Pat. 1887,
Ganoderma lucidum f. *rubellum* Torrend 1920,
Ganoderma lucidum subsp. *lucidum* (Curtis) P. Karst. 1881,
Ganoderma lucidum subsp. *resinaceum* (Boud.) Bourdot & Galzin 1925,
Ganoderma lucidum subsp. *valesiacum* (Boud.) Bourdot & Galzin 1925,
Ganoderma lucidum var. *badium* Pat. 1899,
Ganoderma lucidum var. *lucidum* (Curtis) P. Karst. 1881,
Ganoderma lucidum var. *nicotianae* (Inglese) Sacc. & Trotter 1912,
Ganoderma lucidum var. *orbiformis* (Fr.) Rick 1960
Ganoderma lucidum var. *orbiformis* Steyaert 1961,
Ganoderma lucidum var. *resinaceum* Maire 1933,
Ganoderma lucidum var. *resinosum* Pat. 1907,
Ganoderma lucidum var. *typicum* Maire 1933,
Ganoderma lucidum var. *valesiacum* (Boud.) Lloyd

2. Општи део

Народни назив: Сјајница (српски), Reishi или Mannetake (јапански), Ling Zhi и Ling Chih (кинески, кореански) "гљива бесмртности", *Ganoderme luisant* (француски).

Ganoderma lucidum (**Слика 2.9.**) (грчки „*gano*“ сјајан; „*derma*“ кожа; латински „*lucidus*“ сјајан, брилијантан) (Wachtel-Galor и др., 2011) је највише цитирана врста од свих гљива рода *Ganoderma* по начину узгајања, биохемијском саставу, фармаколошким и биолошким ефектима (Saltarelli и др., 2009). Позната је и као „Краљица гљива“ или „Гљива бесмртности“ (Gowrie и др., 2014). Списак синонима за врсту *G. lucidum* дат је у **Табели 2.6.**

Екологија: *G. lucidum* је једногодишња врста и не расте више таком година попут неких вишегодишњих, полипорних врста. Сазревање плодног тела може трајати месецима. *G. tsugae* је практично идентична овој врсти, а њеним сродником сматрају и врсту *G. resinaceum*.

Настањује листопадне и то најчешће хрестове шуме. Нејестива врста горког укуса и дрвенасте грађе. Паразитира на живом дрвећу првенствено храста, на приземним деловима стабла или корену, изазивајући настанак беле трулежи. Такође настањује издубљена и полегла стабла, као и пањеве, живећи као сапротроф (Schwarze и др., 2000). Као и *G. applanatum* и ово је једногодишња врста.

Плодно тело: Плодно тело је дрвенасто, на почетку раста неправилно квргасто или издужено, али сазревањем добија лепезасти облик, ширине до 20 cm. На почетку раста је беле боје, затим добија жуте тонове који сазревањем постају црвенкасто-смеђи до тамнољубичасти. Млађе је доста мекано, док временом постаје тврђе. Површина горњег дела је сјајна, док су доња површина и унутрашњост беличасте боје. Капа је величине од 2-30 cm Дршка је бочно постављена, цилиндричног облика, дужине до 20 cm, ширине око 2 cm, смеђа и сјајна. Површина пора је беличаста, временом постаје временом прљаво смеђа. Обично садржи 4-7 ситних, скоро невидљивих голим оком (неколико mm) кружних пора. Цевчице су до 2 cm дубине. Стабљика је најчешће присутна, дужине 3-14 cm и дебљине 3 cm. Гљива поцрни реакцијом са КОН.

2. Општи део

Микроскопске карактеристике: споре су браон до боје. Величине од 9-12 x 5,5-8 μm , мање или више елипсоидне, понекад са непотпуним крајем; посматрањем под микроскопом уочава се двоструки зид са бројним „pills“ (стубовима) између зидова. Заступљен хифални тримитични систем (http://www.mushroomexpert.com/Ganoderma_lucidum.html).

Распрострањеност: Космополита. У Јапану се може пронаћи на старом дрвету шљиве, док у Европи, Азији, северној и јужној Америци најчешће расте на пањевима, корењу, оболелим стаблима листопадног дрвећа (храста или кестена). Појављује се од пролећа до јесени.



Слика 2.10. Мапа распрострањења врсте *G. lucidum*
(http://eol.org/data_objects/21243842)

Употреба у традиционалној медицини: Постоје писани подаци да је гљива *G.lucidum* коришћена у традиционалној медицини Кине и Јапана још пре 4000 година нарочито за третирање хроничног хепатитиса, нефритиса, хипертензије, артритиса, неурастеније, инсомније, бронхитиса, астме и чира на желуцу (Zhang и др., 2003). Дивља *Lingzhi* је била веома ретка врста и пре само је племство могло да приушти ову гљиву и веровало се да је то света гљива која је расла у кући бесмртника на кинеској обали (McMeekin 2005). Поред *Lentinus edodes*, током последњих деценија представља најбоље проучену гљиву захваљујући управо искуствима традиционалне кинеске и јапанске

2. Општи део

медицине. У најпознатијој енциклопедији кинеске биљне медицине која датира још из 1578. године али и у Shen Nong Ben Cao Jing (писана за време Хан династије) постоје записи да се контину'ираном употребом ове гљиве може смањити телесна тежина, продужити живот али и повећати либидо (Trigos и Medellin, 2011). Постоје бројне приче о људима оболелим од рака или неких других обољења који су путовали на удаљена места како би је употребљавали. Показало се да је *G. lucidum* потпуно здравствено безбедна јер и при оралној примени њених екстраката нема нежељених ефеката (Ео и др., 1999).

Култивација и узгајање: Прво гајење ове гљиве у Европи су осмислили Constantin и Matruchot још 1898. године. Са овом методом је завршио Matruchot 1908. године гајењем култура на отпацама лишћа различитог дрвећа у влажним пећинама. Масовну продукцију ове гљиве је започео Y. Naoi 1971. године, култивишући мицелију на пиљевини смештеној у грнчарији. Може да се узгаја на различитом типу листопадног дрвећа, слично ономе како расте у природном окружењу. Становништво Кине, Јапана и Кореје, земаља које су главни произвођачи ове гљиве, сматра да су плодна тела која се добијају на медијуму (пиљевини) неупотребљива у медицинске сврхе, те да је могућност њихове примене у виду извора макро средстава и даље под знаком питања. Различити типови ове гљиве су фаворизовани у различитим географским подручјима, нпр. у јужној Кини је популарна црна *G. lucidum*, док је црвена популарна у Јапану.

Фармакологија и клиничка испитивања: Првобитно се сматрало да су позитивни фармаколошки ефекти последица интензитета обојености ове гљиве, али су истраживања показала да концентрација полисахарида као биоактивних материја веома зависи од фазе развоја плодног тела, времена складиштења после брања као и од услова под којима се чува (Jong и Birmingham, 1992).

Већину масе гљиве чини вода (око 90 %), затим осталих 10 % чине: угљени хидрати (26-28 %), масти (3-5 %), влакна (59 %), протеини (7-8 %) али и минерали: калијум, калцијум, фосфор, магнезијум, селен, гвожђе, цинк и бакар (Borchers и др., 1999; Мау и др., 2001).

2. Општи део

У највећем уделу код *G. lucidum* заступљени су следећи активни метаболити: полисахариди, тритерпени, стероли, лектини, али и неки протеини у циљу превенције различитих обољења (Као и др., 2013; Sanodiya и др., 2009). Што се тиче терпеноидних једињења, екстраховано је више од 150 различитих једињења из неполарних екстраката *G. lucidum* претежно ланостанског типа (ганодерична, ганолуцидична, луциденична киселина, ганодероли и луцидони) (Cheng и др., 2012; Cole и Schweikert, 2003; Fatmawati и др., 2011; Joseph и др., 2011; Ко и др., 2008; Li и др., 2013; Lindequist и др., 2015; Yue и др., 2010). Поред терпеноидних једињења, најзаступљенији су полисахариди којих је из ове гљиве изоловано око 200 из поларних екстраката *G. lucidum* (Fan и др., 2012; Као и др., 2013; Kozarski и др., 2012; Wang и др., 2013; XiaoPing и др., 2009; Xie и др., 2012; Zhao и др., 2010).

Постоје радови базирани на употреби H₂O екстраката *G. lucidum* у циљу инхибиције раста саркома, док су неполарни екстракти ефикасни против липидне пероксидације, као јаки антиоксиданти (скевенџери хидроксилног и супероксиданјон радикала) (Мау и др., 2002). *G. lucidum* због високог садржаја полисахарида и лектина поседује антитуморска својства преко позитивног ефекта на имуни систем, пре него преко механизма директне цитотоксичности на ћелије рака (Као и др., 2013; Kim и др., 1999; Lin и Zhang, 2004; Slivova и др., 2004).

Полисахариди *G. lucidum* (Gl-PS) поседују хипогликемичну активност преко пораста концентрације инсулина и тако утичу на ензиме јетре и уједно на метаболизам угљених хидрата код здравих и алоксан-индукованих дијабетичких мишева (Mohammed и др., 2007; Zhang и др., 2003). LZ-8 протеини изоловани из мицелија *G. lucidum* поседују митогену активност, састоје се од од 110 аминокиселина са ацетилованим аминокрајевима (Paterson, 2006). Значајни су полисахаридно-протеински комплекси познати као GLPP који су активни при неутрализацији ROS-а (You и Lin, 2002).

G. lucidum поседује и антиалергијска, антиинфламаторна својства, антивирална својства (HIV-1, Epstein Barr вирус, herpes simplex virus тип 1 (HSV-1) и тип 2 (HSV-2)), антиоксидантна али и антиканцерогена својства

2. Општи део

(Deeralakshmi и др., 2013; Liu и др., 2004; Paterson, 2006; Sanodiya и др., 2009). Бројни полисахариди и тритерпени показују хемопревентивне и/или антитуморске ефекте (**Слика 2.20.**) што доказују бројне *in vivo* и *in vitro* студије на различитим канцер ћелијским линијама (HeLa, MCF-7, MDA-MB-123 итд.) (Hu и др., 2002; Као и др., 2013; Liu и др., 2009; Saltarelli и др., 2009; Shang и др., 2009; Shimizu и др., 2009; Slivova и др., 2004; Wachtel-Galor и др., 2011). Испољава седативно дејство на централни нервни систем, а користи се и за зарастања рана као кардиотоник, антихолестеролемик, хипотензив, антиалергик и аналгетик. Такође се примењује у лечењу хроничног бронхитиса, јер делује на обнављање епитела бронхијалних путева и испољава антибактеријско деловање на *Staphylococcus* и *Sterptococcus*, као и на *Bacillus pneumoniae*. Делује стимулативно на пролиферацију ћелија са нуклеусом у кичменој моздини, затим кардиотонично, а поседује и антибактеријска и имуномодулирајућа својства (Giovaninni и др., 2006; Karaman и др., 2009; Kozarski и др., 2011; Ofodile и др., 2005).

Препарати на бази ове гљиве у облику ампула, капсула, екстраката, чајева али и додатака у исхрани доносе светски годишњи приход од 1,6 милијарди долара.

Табела 2.6. Синоними врсте *G. lucidum* (W. Curt.:Fr.) P. Karst. (<http://www.nahuby.sk/atlas-hub/Ganoderma-pfeifferi/lesklokorovka-Pfeifferova/ID247>)

Синоними *G. lucidum*

- Agarico-igniarium trulla* Paulet, *Traité sur les Champignons Comestibles* (Paris) 2: 95 (1793)
- Agaricus lignosus* Lam., *Encycl. Méth. Bot.* (Paris) 1(1): 51 (1783)
- Agaricus pseudoboletus* Jacq., *Miscell. austriac.* 1: 26, tab. 41 (1778)
- Boletus castaneus* Weber, *Suppl. Fl. hols.*: 13 (1787)
- Boletus castaneus* Weber, *Suppl. Fl. hols.*: 13 (1787) **f. castaneus**
- Boletus crustatus* J.J. Planer, *Ind. Pl. erfurt. Fung. add.*: 23 (1788)
- Boletus dimidiatus* Thunb., *Flora japonica*: 348 (1784)
- Boletus flabelliformis* Leyss., *Fl. halensis*: 219 (1761)
- Boletus laccatus* Timm, *Fl. Megapol. Prodr.*: 269 (1788)
- Boletus lucidus* Curtis, *Fl. Londin.* 1: 72 (1781)
- Boletus ramulosum* var. *flabelliformis* (Leyss.) J.F. Gmel., *Systema Naturae*, Edn 13 2(2): 1435 (1792)
- Boletus rugosus* Jacq., *Fl. austriac.* 2: 44 (1774)
- Boletus supinus* var. *castaneus* (Weber) J.F. Gmel., *Systema Naturae*, Edn 13 2(2): 1433 (1792)

2. Општи део

- Boletus verniceus* Brot., *Fl. lusit.* 2: 468 (1804)
Boletus vernicosus Bergeret, *Phytonom. univ.* 1: tab. 99 (1783)
Fomes japonicus (Fr.) Sacc., *Syll. fung.* (Abellini) 6: 156 (1888)
Fomes lucidus (Curtis) Sacc., *Syll. fung.* (Abellini) 6: 157 (1888)
Fomes lucidus (Curtis) Sacc., *Syll. fung.* (Abellini) 6: 157 (1888) **f. lucidus**
Fomes lucidus var. *badius* (Pat.) Sacc., *Syll. fung.* (Abellini) 16: 153 (1902)
Fomes lucidus var. *exquisitus* (Kalchbr.) F.M. Bailey, *Syn. Queensl. Fl.*, Suppl. 2: 104 (1888)
Fomes lucidus (Curtis) Sacc., *Syll. fung.* (Abellini) 6: 157 (1888) **var. lucidus**
Fomes lucidus var. *nicotianae* (Inglese) Sacc. & Traverso, *Syll. fung.* (Abellini) 19: 714 (1910)
Fomes lucidus var. *resinosus* Pat.
Fomes resinaceus var. *martellii* (Bres.) Sacc., *Syll. fung.* (Abellini) 11: 90 (1895)
Ganoderma japonicum (Fr.) Sawada, *Rep. Govt Res. Inst. Dep. Agric., Formosa* 51: 76 (1931)
Ganoderma laccatum (Timm) Pat., *Ann. Jard. Bot. Buitenzorg*, suppl. 1: 114 (1897)
Ganoderma lucidum f. *alneum* Bourdot & Galzin, *Bull. trimest. Soc. mycol. Fr.* 41(2): 183 (1925)
Ganoderma lucidum f. *annulatum* Torrend, *Brotéria*, sér. bot. 18 (1920)
Ganoderma lucidum f. *boninense* Pat., *J. Bot.*, Paris 1: 170 (1887)
Ganoderma lucidum f. *hemisphaericum* Torrend, *Brotéria*, sér. bot. 18 (1920)
Ganoderma lucidum (Curtis) P. Karst., *Revue mycol.*, Toulouse 3(no. 9): 17 (1881) **f. lucidum**
Ganoderma lucidum f. *martellii* (Bres.) Bourdot & Galzin, *Bull. trimest. Soc. mycol. Fr.* 41(2): 183 (1925)
Ganoderma lucidum f. *naiae* Chona & Munjal, *Indian Phytopath.* 8(2): 189 (1956) [1955]
Ganoderma lucidum f. *noukahivensis* Pat., *J. Bot.*, Paris 1: 170 (1887)
Ganoderma lucidum f. *rubellum* Torrend, *Brotéria*, sér. bot. 18 (1920)
Ganoderma lucidum (Curtis) P. Karst., *Revue mycol.*, Toulouse 3(no. 9): 17 (1881) **subsp. lucidum**
Ganoderma lucidum var. *badium* Pat., *Bull. Soc. mycol. Fr.* 15: 199 (1899)
Ganoderma lucidum (Curtis) P. Karst., *Revue mycol.*, Toulouse 3(no. 9): 17 (1881) **var. lucidum**
Ganoderma lucidum var. *nicotianae* (Inglese) Sacc. & Trotter, *Syll. fung.* (Abellini) 21: 302 (1912)
Ganoderma lucidum var. *orbiformis* Steyaert, (1961)
Ganoderma lucidum var. *resinaceum* Maire, *Treb. Mus. Ciènc. nat. Barcelona*, sér. bot. 15(no. 2): 38 (1933)
Ganoderma lucidum var. *resinosum* Pat., in Rick, *Brotéria*, sér. bot. 6: 86 (1907)
Ganoderma lucidum var. *typicum* Maire, *Treb. Mus. Ciènc. nat. Barcelona*, sér. bot. 15(no. 2): 33 (1933)
Ganoderma mongolicum Pilát, *Annls mycol.* 38(1): 78 (1940)
Ganoderma nitens Lázaro Ibiza, *Revta R. Acad. Ciènc. exact. fis. nat. Madr.* 14: 104 (1916)
Ganoderma ostreatum Lázaro Ibiza, *Revta R. Acad. Ciènc. exact. fis. nat. Madr.* 14: 110 (1916)
Ganoderma ostreatum var. *hemicycla* Lázaro Ibiza, *Revta R. Acad. Ciènc. exact. fis. nat. Madr.* 15: 202 (1917)
Ganoderma ostreatum Lázaro Ibiza, *Revta R. Acad. Ciènc. exact. fis. nat. Madr.* 14: 110 (1916) **var. ostreatum**
Ganoderma pseudoboletus (Jacq.) Murrill, *Bull. Torrey bot. Club* 29: 602 (1902)
Ganoderma resinaceum var. *martellii* Bres., *Fung. trident.* 2(8-10): 31 (1892)
Grifola lucida (Curtis) Gray, *Nat. Arr. Brit. Pl.* (London) 1: 644 (1821)
Phaeoporus lucidus (Curtis) J. Schröt., in Cohn, *Krypt.-Fl. Schlesien* (Breslau) 3.1(25-32): 491 (1888) [1889]
Placodes lucidus (Curtis) Quél., *Fl. mycol. France* (Paris): 399 (1888)
Polyporus japonicus Fr., *Epicr. syst. mycol.* (Upsaliae): 442 (1838) [1836-1838]
Polyporus laccatus (Timm) Pers., *Mycol. eur.* (Erlanga) 2: 54 (1825)
Polyporus laccatus (Timm) Pers., *Mycol. eur.* (Erlanga) 2: 54 (1825) **subsp. laccatus**

2. Општи део

Polyporus laccatus subsp. semipatera Pers., *Mycol. eur.* (Erlanga) 2: 55 (1825)
Polyporus lucidus (Curtis) Fr., *Syst. mycol.* (Lundae) 1: 353 (1821)
Polyporus lucidus (Curtis) Fr., *Syst. mycol.* (Lundae) 1: 353 (1821) **f. lucidus**
Polyporus lucidus var. exquisitus Kalchbr., *Proc. Linn. Soc. N.S.W.* 7(3-4): 564 (1883)
Polyporus lucidus var. japonicus (Fr.) Cleland & Cheel, *J. Proc. R. Soc. N.S.W.* 51: 474 (1917)
Polyporus lucidus (Curtis) Fr., *Syst. mycol.* (Lundae) 1: 353 (1821) **var. lucidus**
Polyporus lucidus var. nicotianae Inglese, *Di un singulare caso di parasitismo del Polyporus lucidus sulla Nicotiana Tabacum. Sansepolcro*, 1-2 (1901)
Scindalma japonicum (Fr.) Kuntze, *Revis. gen. pl.* (Leipzig) 3(2): 518 (1898)

Ganoderma pfeifferi (Bres. 1889)



Царство:	<i>Fungi</i>
Раздео:	<i>Basidiomycota</i>
Класа:	<i>Agaricomycetes</i>
Ред:	<i>Polyporales</i>
Фамилија:	<i>Ganodermataceae</i>
Род:	<i>Ganoderma</i>
Врста:	<i>Ganoderma pfeifferi</i>

Слика 2.11. *Ganoderma pfeifferi*

([www.wikimedia.org/Ganoderma_pfeifferi - Kupferroter Lackporling.JPG](http://www.wikimedia.org/Ganoderma_pfeifferi_-_Kupferroter_Lackporling.JPG))

Према бази података *Index Fungorum* (<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>) постоје 3 записа у оквиру врсте (форма, подврста, варијетет):

Ganoderma pfeifferi Bres. 1889,
Ganoderma pfeifferi var. borneense Corner 1983,
Ganoderma pfeifferi var. pfeifferi Bres. 1889

Народни назив: *Ganoderma pfeifferi* (**Слика 2.11.**) је фитохемијски најмање испитана врста из фамилије *Ganodermataceae* (Niedermeyer и др., 2013). Називају је још и *Scindalma pfeifferi* (Bres.) Kuntze 1898 или *Fomes pfeifferi* (Bres.) Sacc. 1891. Списак синонима за врсту *G. pfeifferi* дат је у **Табели 2.7.**

2. Општи део

Екологија: Представља нејестиву врсту, дрвенасте структуре која је слаб паразит и доста јачи сапрофит који расте искључиво на мртвом листопадном дрвећу букве изазивајући белу трулеж.

Плодно тело: Може се препознати по испуцалом и набораном слоју смоле на pileus-у и слатком мисрису зими. Њен тамно браон кортекс је разликује од других, раније откривених врста као што су: *G. lucidum* и *G. resinaceum* (Lindequist и др., 2015).

Филогенетска анализа сврстава *G. pfeifferi* у једну монофилетску групу заједно са *Ganoderma resinaceum* Boudier, *Ganoderma subamboinense* P. Henn. var. *laevisporum* Bazzalo & Wright и три соја *G. lucidum* из SAD и Тајвана. Наведену групу карактерише производња хламидиоспора у медијум (Hong и Jung, 2004).

Распрострањеност: Расте искључиво у Европи на дрвету букве (*Fagus* spp.) али и другог листопадног дрвећа као што је: *Aesculus*, *Acer*, *Fraxinus*, и *Quercus* (Hoang-Minh и др., 2011; Lindequist и др., 2015).



Слика 2.12. Мапа распрострањења врсте *G. pfeifferi*
(<http://www.discoverlife.org/mp/20m?map=Ganoderma+pfeifferi>)

Употреба у традиционалној медицини: Не постоје писани докази употребе у традиционалној медицини (Mothana и др., 2003)

Фармакологија и клиничка испитивања: *G. pfeifferi* се сматра најмање испитаном врстом из фамилије *Ganodermataceae*. Код ове врсте је

2. Општи део

описано присуство 23 секундарна метаболита, и то: сесквитерпени, тритерпени, стероли и фенолне киселине (Lindequist и др., 2015). *G. pfeifferi* карактерише присуство фарнезилхидрохинона (ганомицин А, В и К), који су ретко заступљени код гљива (Mothana и др., 2000; Niedermeyer и др., 2013) који испољавају активност против мултирезистентних бактеријских сојева (*Staphylococcus aureus* и др.).

Поред сесквитерпена, до сада је код ове врсте идентификовано 12 тритерпена. Mothana и сар. су изоловали из ове врсте антивиралне ланостаноидне тритерпене ганодермадиол (HSV вирус), луцидалол и апланоксидичну киселину (Mothana и др., 2003). Потом 4 једињења типа стерола (деривати ергостерола) (Lindequist и др., 2015). Код EtOH екстраката изолована су и два фенолна једињења: 2,5-дихидрокси бензоева киселина и 2,4,5-трихидрокси бензалдехид, док су из H₂O екстраката изоловани β-1,3 глукани (Lindequist и др., 2015). Код ове гљиве је на основу ранијих радова доказано антимикуробно: антибактеријско, антифунгално и антивирално дејство (Lindequist и др., 2015; Mothana и др., 2003; Niedermeyer и др., 2013). Од осталих врста рода *Ganoderma*, *G. pfeifferi* одликује изузетна антибактеријска активност на Gram – бактеријске врсте (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas maltophilia* и *Serratia marcescens*).

На основу новијих научних истраживања долази се до података о широком спектру биолошких активности: антиоксидантна, ензим инхибирајућа, цитотоксична али и против старења. С обзиром да не постоје записи о традиционалној употреби *G. pfeifferi*, радује чињеница да у скорој будућности, на основу добијених резултата, може доћи до потенцијалне употребе као додатка исхрани у својству нутрацеутика (производ изолован из хране, за који се претпоставља да има потенцијалну примену у промоцији здравља, превенцији хроничних обољења (Health Canada, 1998)). Доказано је да екстракти *G. pfeifferi* својим активним једињењима инхибирају раст микроорганизама одговорних за проблеме коже (*Pityrosporum ovale*, *Propionibacterium acnes* и *Staphylococcus epidermidis*) (Lindequist и др., 2005), док су са друге стране UV заштитна својства, антибактеријска и својства против

2. Општи део

старења значајна код потенцијалне примене у припреми фармацеутских и козметичких производа (Lindequist и др., 2015; Niedermeyer и др., 2005).

Због својих својстава, EtOH и H₂O екстракти *G. pfeifferi* су регистровани под INCI бројевима: 2-03-2006-0416 и 2-03-2006-0417 (Lindequist и др., 2015).

Табела 2.7. Синоними врсте *G. pfeifferi* Bres. 1889 (<http://www.nahuby.sk/atlas-hub/Ganoderma-pfeifferi/lesklokorovka-Pfeifferova/ID247>.)

Синоними *G. pfeifferi*

Fomes cupreolaccatus (Kalchbr.) Ferd. & C.A. Jørg., *Skovtraernes Sygdomme* 2: 322 (1939)

Fomes laccatus Sacc., *Syll. fung.* (Abellini) 9: 175 (1891)

Fomes pfeifferi (Bres.) Sacc., *Syll. fung.* (Abellini) 9: 179 (1891)

Ganoderma applanatum f. *laccatum* (Sacc.) Golovin, *Trudy botanicheskogo Instituta im. V.L. Komarova AN SSSR, Series II, Spor. Rast.* 2(10): 235 (1956)

Ganoderma applanatum var. *laccatum* (Sacc.) Rea, *Brit. basidiomyc.* (Cambridge): 597 (1922)

Ganoderma cupreolaccatum (Kalchbr.) Z. Igmándy, *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 3: 234 (1968)

Ganoderma laccatum (Sacc.) Bourdot & Galzin, *Bull. trimest. Soc. mycol. Fr.* 41(2): 185 (1925)

Ganoderma pfeifferi var. *borneense* Corner, *Beih. Nova Hedwigia* 75: 140 (1983)

Ganoderma pfeifferi Bres., in Patouillard, *Bull. Soc. mycol. Fr.* 5(2,3): 70 (1889) var. *pfeifferi*

Polyporus cupreolaccatus Kalchbr. [as '*cupreo-laccatus*'], in Wettstein, *Öst. bot. Z.* 35(3): 81 (1885)

Polyporus laccatus Kalchbr., in Wettstein, *Öst. bot. Z.* 35(3): 81 (1885)

Scindalma laccatum (Sacc.) Kuntze, *Revis. gen. pl.* (Leipzig) 3(2): 519 (1898)

Scindalma pfeifferi (Bres.) Kuntze, *Revis. gen. pl.* (Leipzig) 3(2): 519 (1898)

2. Општи део

Ganoderma resinaceum Boud. in Pat. 1890



Царство:	<i>Fungi</i>
Раздео:	<i>Basidiomycota</i>
Класа:	<i>Agaricomycetes</i>
Ред:	<i>Polyporales</i>
Фамилија:	<i>Ganodermataceae</i>
Род:	<i>Ganoderma</i>
Врста:	<i>Ganoderma resinaceum</i>

Слика 2.13. *Ganoderma resinaceum*

([http://www.pharmanatur.com/Pagepolypore/Ganoderma resinaceum5.jpg](http://www.pharmanatur.com/Pagepolypore/Ganoderma%20resinaceum5.jpg))

Према бази података *Index Fungorum* постоји 6 записа у оквиру врсте (форма, подврста, варијетет) (<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>):

Ganoderma resinaceum Boud. 1890,
Ganoderma resinaceum f. *quercinum* Dzhaf. 1955,
Ganoderma resinaceum f. *resinaceum* Boud. 1890,
Ganoderma resinaceum var. *alneum* Bourdot & Galzin 1925,
Ganoderma resinaceum var. *martellii* Bres. 1892, (also see Species Fungorum: *Ganoderma lucidum*);
Ganoderma resinaceum var. *resinaceum* Boud. 1890, (also see Species Fungorum: *Ganoderma resinaceum*)

Народни назив: *Ganoderma resinaceum* (Слика 2.13.) се назива још и Lacquered Bracket, Língzhī resinaceum De (靈芝, 靈芝resinaceum的), Reishi resinaceum (レイシresinaceum), Ganoderme résineux, Fungo coriaceo, Harzige Lackporling, Ganoderma smolistaya (ганодерма смолистая) (www.alohaculturebank.com). Списак синонима за врсту *G. resinaceum* дат је у Табели 2.8.

Екологија: Расте веома брзо и то од 1,5-3,5 cm/недељи.

Плодно тело: Pileus је конкаван, глатак, неправилно наборан величине од 0,7-1,2 cm (Mohanty и др., 2011). Горња површина је концентрично ужљебљена, упадљиво сјајна црвено-браон или бордо до скоро црне боје

2. Општи део

(Mohanty и др., 2011). Дршка је цилиндричног облика, дужине од 10-45 cm, ширине око 10 cm, смеђа и сјајна.

Карактерише је тримитични хифални систем. Хифе су разгранате, танких зидова (Mohanty и др., 2011). Hong и Jung (2004) су утврдили да постоје велике филогенетске сличности између *G. resinaceum* и *G. lucidum*. Може да се гаји на пиљевини на исти начин као и *G. lucidum*.

Ова гљива се користи као додаток за кафу, чај као функционална храна или медицински додаток.

Распрострањеност: *G. resinaceum* је ретка нејестива вишегодишња врста која се може наћи углавном на пањевима рода *Quercus* и *Fagus* у Северној Америци и Европи, али је заступљена и у Северној Индији.



Слика 2.14. Мапа распрострањења врсте *G. resinaceum*
(<http://eol.org/pages/133784/overview>)

Фармакологија и клиничка испитивања: Већ се дуго времена *G. resinaceum* користи због антиоксидантних и имуно-регулишућих ефеката као хепатопротектива. У овој врсти је утврђено присуство: β -гљукана, полисахарида и тритерпена (Amaral и др., 2008; Chen и др., 2007; Niu и др., 2007; Silva и др., 2013). Из плодних тела *G. resinaceum* изоловано је осам ланостаноидних једињења: луцидони D-G, 7-оксо-ганодерична киселина Z₂, 7-

2. Општи део

оксо-ганодерична киселина Z₃, ганодересин А, ганодересин В, и шест већ познатих ланостаноида (Peng и др., 2013).

Табела 2.8. Синоними врсте *G. resinaceum* Boud. in Pat. 1890

(<http://www.nahuby.sk/atlas-hub/Ganoderma-resinaceum/lesklokorovka-zivicovita/lesklokorka-pryskyricna/ID1367>)

Синоними *G. resinaceum*

- Fomes resinaceus* (Boud.) Sacc., *Syll. fung.* (Abellini) **9**: 179 (1891)
Fomes resinaceus (Boud.) Sacc., *Syll. fung.* (Abellini) **9**: 179 (1891) **var. resinaceus**
Scindalma resinaceum (Boud.) Kuntze, *Revis. gen. pl.* (Leipzig) **3**(2): 519 (1898)
Friesia resinacea (Boud.) Lázaro Ibiza, *Revta R. Acad. Cienc. exact. fis. nat. Madr.* **14**: 591 (1916)
Ganoderma lucidum subsp. *resinaceum* (Boud.) Bourdot & Galzin, *Bull. trimest. Soc. mycol. Fr.* **41**(2): 177 (1925)
Ganoderma chaffangeonii Pat., *Bull. Soc. mycol. Fr.* **5**(2,3): 74 (1889)
Fomes chaffangeonii (Pat.) Sacc., *Syll. fung.* (Abellini) **9**: 179 (1891)
Scindalma chaffangeonii (Pat.) Kuntze, *Revis. gen. pl.* (Leipzig) **3**(2): 518 (1898)
Ganoderma resinaceum Boud., in Patouillard, *Bull. Soc. mycol. Fr.* **5**(2,3): 72 (1890) **var. resinaceum**
Ganoderma resinaceum Boud., in Patouillard, *Bull. Soc. mycol. Fr.* **5**(2,3): 72 (1890) **f. resinaceum**
Fomes sessilis (Murrill) Sacc. & D. Sacc., *Syll. fung.* (Abellini) **17**: 122 (1905)
Polyporus sessilis (Murrill) Lloyd, *Mycol. Writ. 4 (Syn. Apus)*: 371 (1915)
Ganoderma praelongum Murrill, *N. Amer. Fl.* (New York) **9**(2): 121 (1908)
Ganoderma pulverulentum Murrill, *N. Amer. Fl.* (New York) **9**(2): 121 (1908)
Polyporus pulverulentus (Murrill) Overh., in Seaver & Chardón, *Botany of Porto Rico and the Virgin Islands: Mycology*: 165 (1926)
Ganoderma subperforatum G.F. Atk., *Bot. Gaz.* **46**: 337 (1908)
Fomes subperforatus (G.F. Atk.) Sacc. & Traverso, *Syll. fung.* (Abellini) **19**: 718 (1910)
Ganoderma subincrustedum Murrill, *N. Amer. Fl.* (New York) **9**(2): 122 (1908)
Polyporus subincrustedum (Murrill) Seaver & Chardón, in Seaver & Chardón, *Botany of Porto Rico and the Virgin Islands: Mycology*: 166 (1926)
Ganoderma argillaceum Murrill, *N. Amer. Fl.* (New York) **9**(2): 122 (1908)
Polyporus argillaceus (Murrill) Overh., *Botany of Porto Rico and the Virgin Islands: Mycology*: 161 (1926)
Ganoderma subforficatum Murrill, *N. Amer. Fl.* (New York) **9**(2): 121 (1908)
Ganoderma areolatum Murrill, *Bull. New York Bot. Gard.* **8**: 149 (1912)
Fomes areolatus (Murrill) Murrill, *Bull. New York Bot. Gard.* **8**: 153 (1912)
Mensularia vernicosa Lázaro Ibiza, *Revta R. Acad. Cienc. exact. fis. nat. Madr.* **14**: 740 (1916) **var. vernicosa**
Ganoderma perturbatum (Lloyd) Torrend
Polyporus perturbatus Lloyd, *Mycol. Writ.* **5**(Letter 68): 11 (1918)
Ganoderma resinaceum var. *alneum* Bourdot & Galzin, *Bull. trimest. Soc. mycol. Fr.* **41**(2): 183 (1925)
Ganoderma subtuberculosum Murrill, *Lloydia* **7**(4): 326 (1945)
Ganoderma resinaceum f. *quercinum* Dzhaf., *Izv. Akad. Nauk azerb. SSR, Ser. Biol. Nauk* **11**(2): 133 (1955)

2.2. ОКСИДАТИВНИ СТРЕС И АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ ГЉИВА

2.2.1. Слободни радикали и оксидативни стрес

Првобитни атмосферски омотач Земље је био анаеробан (садржавао је водоник сулфид, метан, амонијак, хлороводоник, водоник и јоне прелазних метала). При високом притиску и температури у праокеану настао је први облик анаеробног живота. Пре око 2,5 милијарди година, плаво-зелене алге су почеле да оксидују воду до молекулског кисеоника. После 800 милијарди година у атмосфери је било око 20 % молекулског кисеоника, што је довело до изумирања анаеробних, и настајања аеробног облика живота. Аеробни организми су путем респирације обезбедили далеко већу количину енергије у односу на аеробне и са тим су стекли велику еволутивну предност над анаеробима. Сагоревањем глукозе у анаеробним условима добија се 176,8 kJ/mol, а у аеробним условима 2867 kJ/mol, што је омогућило бржу еволуцију аеробних организама. Захваљујући фотосинтези код биљака данас у атмосфери има око 21 % молекулског кисеоника, што одговара садашњим облицима аеробног живота. Уколико би дошло до било које промене запреминске концентрације кисеоника (повећане или смањене) доводи до токсичних ефеката који су потврђени бројним експериментима. Један од парадокса живота је да O_2 молекул који је неопходан за аеробни живот, уједно је и најтоксичнији природни полутант (Halliwell, 1984; Halliwell и Gutteridge, 2007).

Уколико се људи кратко излажу дејству повишеног притиска ваздуха ($p > 1 \text{ atm}$) или дејству чистог кисеоника ($p = 1 \text{ atm}$) (баро коморе) долази до позитивног ефекта (спречавања гангрене), а могуће су штетне последице (токсификација централног нервног система праћене конвулзијама и оштећењима плућа) (Jaeschke, 2003, Van Marter, 2000).

У хомеостази се око 95 % O_2 троши у процесу респирације, а остатак у другим процесима оксидоредукција. У овим процесима настаје до 3 % ROS-а од којих се штитимо антиоксидантним системима насталим током еволуције аероба.

2. Општи део

У физиолошким условима кисеоник релативно споро оксидује органске молекуле. Међутим, кисеоник реагује брзо са јонима прелазних метала, радикалима и ензимима који катализују редукцију O_2 . То су ROS, односно редуковани облици кисеоника (слободни радикали), који настају примањем електрона и активирани облици, који настају примањем енергије.

Молекулски кисеоник може да инхибира фиксацију CO_2 инактивирањем тиолне групе неких ензима, што успорава раст биљака кроз утицај на процес фотосинтезе (Asada, 1977; Elstner, 1982; Mittler и др., 2004), а токсичност је последица деловања ROS-а.

Слободни радикали по дефиницији престављају атоме, молекуле или јоне који у својој структури садрже један или више неспарених електрона (H, Cl, F, Br, I, O_2 , NO, OH^\bullet , $O_2^{\bullet-}$...). Једном продукован слободни радикал (фаза иницијације) може изазвати низ ланчаних реакција (фаза пропације) реагујући са другим мање реактивним врстама. Иако су слободни радикали у организму обично присутни у врло ниској концентрацији (10^{-5} до 10^{-9} mol/dm³) и живе веома кратко ($< 10^{-10}$ s), али због високе хемијске реактивности лако ступају међусобно у реакцију или са другим молекулима, при чему неспарени електрони образују хемијске везе и долази до ослобађања енергије. Постоје и радикали (већином органски) који су веома стабилни, не реактивни.

Слободни радикали су неизбежни пратиоци различитих биохемијских процеса: оксидативна фосфорилација у митохондријама, процес фотосинтезе у хлоропластима, процес фагоцитозе и деловање оксидоредуктаза (ксантин-оксидаза, NADPH-оксидаза макрофага, оксидаза аминокиселина), цитохром P450 изоензима и флавоензима) при метаболисању бројних ендогених и егзогених супстанци (ксенобиотици). На настанак ROS-а у живим системима утичу такође и различити егзогени фактори: различите врсте зрачења (јонизујуће, UV, VIS или IR), дим цигарете и уношење алкохола у организам, нагла и интензивна физичка активност, загађивачи ваздуха (озон, оксиди азота), деловање ксенобиотици (пестициди, лекови, тешки метали), деловање хормона као и други спољашњи фактори.

2. Општи део

Од природе радикала зависи који део ћелије (мембрански липиди, нуклеинске киселине, протеини, цитосолни молекули) или која екстрацелуларна компонента (хијалуронска киселина, колаген) ће реаговати са слободним радикалима као и од места његовог стварања (нпр. ћелијске мембране, цитосолне мембране, ендоплазматског ретикулума, митохондрија, пероксизома) (Halliwell и Gutteridge, 2007). Интеракцијом са основним ћелијским структурама и биомолекулима, токсични облици кисеоника могу довести до низа физиолошких поремећаја и настанка бројних обољења и дегенеративних оштећења (Halliwell, 2001). Свака ћелија поседује природну заштиту од слободних радикала, међутим ако њихова количина прекорачи одбрамбени капацитет организма, тј. када продукција ROS-а превазиђе капацитете антиоксидантне заштите, у организму долази до оксидативног стреса, тј. до испољавања токсичних ефеката ROS-а.

Антиоксидантом се сматра било које једињење које одлаже, превенира или уклања оксидативно оштећење на циљном молекулу и може се синтетисати *in vivo* или узимати путем хране (Halliwell и Gutteridge, 2007). Бројне студије су показале обрнуту зависност између повећаног уноса воћа и поврћа богатог антиоксидантима и смањене појаве различитих обољења (Eastwood, 1999; Grover и Samson, 2014; Toh и др., 2013).

2. Општи део

2.2.2. Реактивне кисеоничне врсте

Табела 2.9. Најважнији реактивни облици кисеоника (Jones, 2008)

ВРСТА	ПОЛУЖИВОТ НА 37 °C (s)	МЕХАНИЗМИ СТВАРАЊА
$^1\text{O}_2$ (синглетни кисеоник)	10^{-6}	Прво ексцитирано стање
$\text{O}_2^{\cdot-}$ (супероксид анјон радикал)	Спонтана и ензимска дисмутација 10^{-6}	Једноелектронска редукција (у реакцијама аутооксидације)
HO_2^{\cdot} (перхидроксилни или хидропероксил радикал)	Стабилна ензимска редукција	Протонована форма
HO^{\cdot} (хидроксил радикал)	10^{-9}	Троелектронска редукција
RO^{\cdot} (алкоксил радикал)	10^{-6}	Органски радикал кисеоника
ROO^{\cdot} (пероксил радикал)	10^{-2}	Одузимање Н од органских хидропероксида
RCO^{\cdot} (карбонил радикал)		Фотоемисија
H_2O_2 (водоник пероксид)		Двоелектронска редукција
ROOH (органски хидропероксид)	$>10^2$	
HOCl (хипохлоритна киселина)		

Само атоми или молекули који имају паралелне спинове али супротног смера од смера спина електрона кисеоника, могу бити оксидовани кисеоником, који брзо реагује са прелазним металима, радикалима и ензимима који катализују његову редукцију. Тада долази до промене $^3\text{O}_2$ реактивне форме.

Познато је да је кисеоник токсичан у активираним, редукованим и ретко молекулском облику.

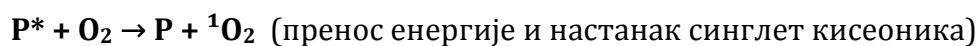
2.2.2.1. Активирани (реактивни) облици кисеоника

Молекулски кисеоник је по својој хемијској структури стабилан бирадикал код кога четрнаест електрона попуњава седам молекулских орбитала, а последња два електрона паралелних спинова (π^*2px и π^*2pz) у сагласности са Хундовим правилом. Овај облик је триплетни облик кисеоника ($^3\text{O}_2$).

Активирани облици кисеоника су синглетни облици кисеоника који настају довођењем енергије (фотохемијским или термичким реакцијама) премештањем једног неспареног електрона из развезујуће π^* орбитале молекула кисеоника (Pardini, 1995).

2. Општи део

При апсорпцији одређене количине енергије $^3\text{O}_2$ настаје синглетни облик кисеоника ($^1\text{O}_2$) (Wasserman и Murray, 1979). Он има висок садржај енергије и веома лако може започети слободно-радикалске реакције у организму (Halliwell и Gutteridge, 2007). Синглетни кисеоник може хемијски реаговати са бројним молекулима или им само предати део енергије у процесу означеном као квенчинг (quenching). Екситација молекулског кисеоника најчешће настаје у фотохемијским реакцијама (Duran, 1982) када поједини молекули (фотодинамични молекули) у побуђеном стању предају вишак енергије кисеонику, након чега се сами враћају у основно стање:



У живим системима најпознатији фотодинамички молекули су: FMN (флавинмононуклеотид) и FAD (флавинадениндинуклеотид), билирубин, хлорофил, ретинал и разни порфирина, који могу бити слободни или везани за протеине.

2.2.2.2. Редуковани облици кисеоника

Редуковани облици кисеоника (слободни кисеонични радикали) настају у ћелији једновалентом редукцијом кисеоника у току различитих метаболичких процеса: у респираторном низу, приликом оксидације ћелијских биомолекула (катехоламина, оксисемоглобина, тиола, хидрохинона), дејством ензима (ксантин-оксидазе, липоксигеназе, NADPH-оксидазе, простагландин-синтетазе и др.) (Halliwell и Gutteridge, 1992), дејством бивалентних металних јона (ТМЈ - Transition Metal Ions) (Candenas и Davies, 2000), као и редукцијом молекула кисеоника. Равнотежа између продукције реактивних кисеоничних врста и активности компонената антиоксидативног система заштите се може нарушити: дејством јонизујућег и УВ зрачења, хормонима, авитаминозом, пушењем, уношењем алкохола, претераном физичком активношћу, и др. Примањем једног електрона настаје супероксид анјон радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$) који је у равнотежи са својом коњугованом базом $\text{HO}_2^{\cdot-}$ перхидроксил радикал (хидропероксил радикал). Други производ редукције (пероксид дианјон, O_2^{2-})

2. Општи део

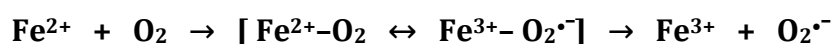
настаје двоелектронском редукцијом кисеоника у основном стању, који је веома јака база и у присуству H^+ јона гради H_2O_2 , најчешћи производ двоелектронске редукције кисеоника у биолошким системима. Такође постоје ензими локализовани у пероксизомима који могу да продукују H_2O_2 без учешћа $O_2^{\bullet-}$. Пероксид диајон (O_2^{2-}) нема неспарене електроне и није радикал. Постепеном редукцијом молекула кисеоника у основном стању веза $O=O$ слаби, пошто се примањем електрона попуњавају развезујуће молекулске орбитале кисеоника. Атоми кисеоника у супероксиданјон радикалу везани су једном и по ковалентном везом, а код пероксидног јона само једном ковалентном везом. Даља редукција захтева попуњавање σ^* развезујуће молекулске орбитале. Следећи производ троелектронске редукције кисеоника је нестабилни хипотетички интермедијер O_2^{3-} , који се разлаже на воду, и анјон радикал атома кисеоника $O^{\bullet-}$, који у присуству H^+ прелази у хидроксил радикал (OH^{\bullet}). Производ четвороелектронске редукције молекула кисеоника је вода (крајњи производ респирације).

Супероксид анјон радикал, $O_2^{\bullet-}$

Супероксид анјон радикал настаје једноелектронском редукцијом молекулског кисеоника, а може настати и једноелектронском оксидацијом водоник пероксида (H_2O_2).

У организму супероксид анјон радикал може да настане током многих метаболичких процеса:

реакцијом са јонима прелазних метала (изузетак Zn): Fe, Cu, Ni и Cr имају неспарене електроне па се могу сматрати радикалима.



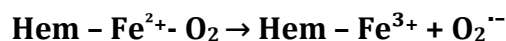
ћелије фагоцита (еозинофили, неутрофили, моноцити, макрофаги)
(Babior и др., 2002; Cathcart, 2004; Joseph, 1980)

ензими (алдехид оксидаза, ксантин оксидаза, пероксидаза, индоламин диоксигеназа, триптофан диоксигеназа, моноаминооксидазе, диаминооксидазе, уриказа) који директно продукују супероксид анјон радикал преко оксидације различитих супстанци (Fridovich, 1986)

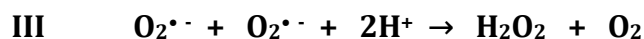
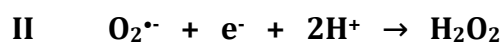
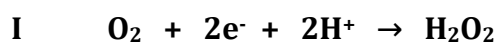
2. Општи део

електрон транспортни ланац (митохондрије, ендоплазматски ретикулум) (Cheeseman, 1993; Perner и др., 2002; Turrens, 1997)

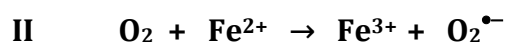
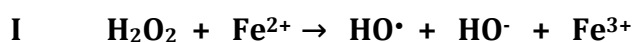
у току деградације оксихемоглобина:

**Водоник пероксид, H₂O₂**

Водоник пероксид, H₂O₂, је најстабилнији, односно најмање реактиван интермедијер у процесу редукције кисеоника. Пролази кроз ћелијску мембрану и константа дифузије му је идентична као код воде. Настаје директно двоелектронском редукцијом молекулског кисеоника (I), једноелектронском редукцијом супероксид анјон радикала (II) или његовом ензимском дисмутацијом дејством ензима супероксид дисмутаза (III) (Negre-Salvayre, 1997).



Токсичност H₂O₂ је последица његове хомолитичке разградње на HO• или реакцијом са O₂^{•-} при чему такође настаје HO• који је најреактивнији ROS. (Haber-Weiss-ова реакција, I) у присуству јона метала (Fenton-ова реакција, II) (Fridovich, 1986).



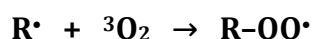
Водоник пероксид не поседује неспарени електрон те није у правом смислу слободни радикал. Иако није слободни радикал, испољава веома токсичне ефекте. Директне токсичне ефекте испољава на биомолекулима при концентрацији која је четири пута већа од концентрације у *in vivo* условима. Стога се претпоставља да токсичност водоник пероксида није последица директног дејства већ његове интеракције са супероксид анјон радикалом (Haber-Weiss-ова реакција, I) у присуству јона метала (Fenton-ова реакција, II) (Fridovich, 1986).

2. Општи део

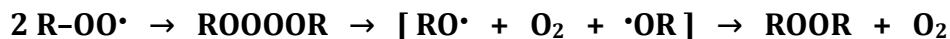
Водоник пероксид стимулише процес оксидативне фосфорилације. ДНК различитих ћелија показује различит степен осетљивости на водоник пероксид. H_2O_2 је главни "оксиданс" који може да пенетрира у једру узрокујући оштећење ДНК. У одсуству инхибитора каталазе, осетљивост ДНК на различите концентрације водоник пероксида је пропорционална активности каталазе у тим ћелијама.

Пероксил радикал, $ROO\cdot$

Пероксил радикали настају у реакцији алкил радикала ($R\cdot$) са 3O_2 . Пероксил радикали веома често подлежу интрамолекулским реакцијама, посебно у реакцијама оксидације незасићених масних киселина.



Такође, подлежу и бимолекулским реакцијама које су посебно значајне у реакцијама терминације ланчаних реакција (Halliwell и Gutteridge, 2007).



Однос ове две компетитивне реакције зависи од структуре пероксил радикала, $ROO\cdot$. Уколико је у питању терцијарни радикал $(R)_3COO\cdot$, дифузија је много бржа од комбинације реакција и само мали проценат доводи до терминације реакције. Код секундарних пероксилрадикала $(R)_2HCOO\cdot$ димеризација је веома значајна у биолошким системима Russel (1957):



Реакција је праћена електронски ексцитованим стањем праћеним хемилуминесценцијом, која је често детектор оксидативног стреса.

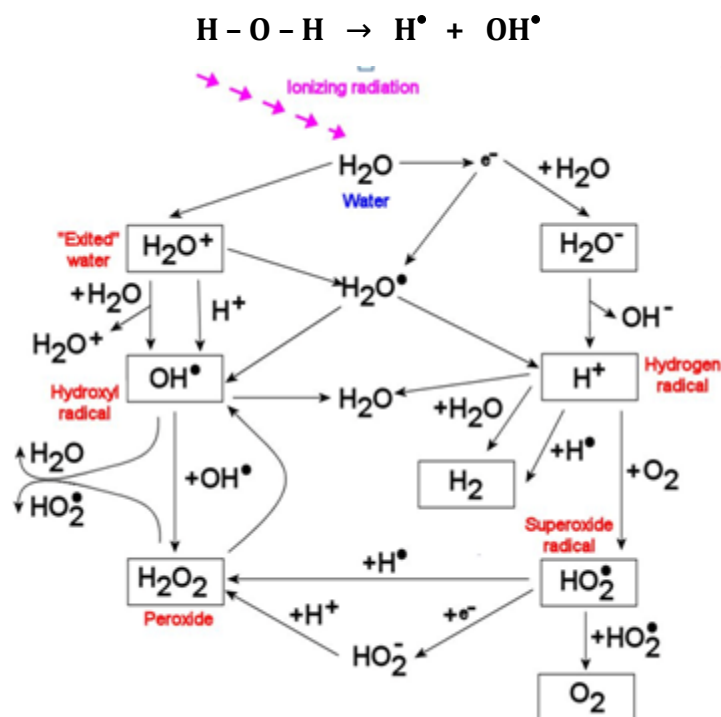
Хидроксил радикал, $OH\cdot$

Хидроксил радикал, $OH\cdot$, је хемијски најреактивнији облик „активираниог кисеоника“, који настаје троелектронском редукцијом молекулског кисеоника у ћелијском метаболизму и најодговорнији је за токсичне ефекте кисеоника (Beuchamp и Fridovich, 1970; Cohen и др., 1974).

2. Општи део

Хидрохсил радикал, OH^\bullet , може настати на следеће начине:

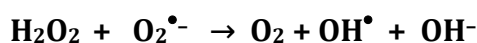
Излагањем ткива γ -зрачењу највећи део енергије апсорбује ћелијска вода. Зрачење изазива разлагање једне од ковалентних веза водоник-кисеоник у молекулу воде (Слика 2.15.), при чему настају два радикала, водоник радикал (H^\bullet) и хидрохсил радикал (OH^\bullet):



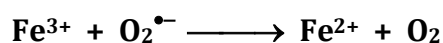
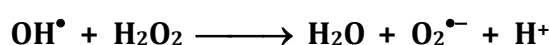
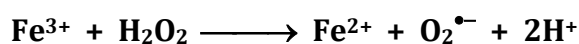
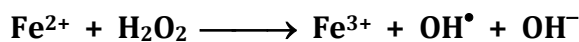
Слика 2.15. Радиолита воде

Хидрохсил радикал се увек ствара у ћелијама када постоје услови за Haber-Weiss-ову и Fenton-ову реакцију, као и у процесу фагоцитозе (Si-xue и Schopfer, 1999).

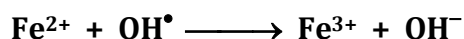
Haber-Weiss-овом реакцијом са $\text{O}_2^{\bullet-}$:



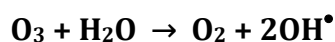
Смеша H_2O_2 и Fe^{2+} (Fenton, 1894; Fenton, 1899) производи хидрохсил радикал, али је након тога могућа читава серија ланчаних реакција:



2. Општи део



Реакцијом воде и озона у алкалној средини:



То је најреактивнији слободни радикал (OH^{\bullet}), полуживот му је изузетно кратак (10^{-9} s), јер одмах реагује са свим биомолекулима (угљени хидрати, протеини, аминокиселине, липиди, пуринске и пиримидинске базе и др.), присутан је у живим ћелијама у реакцији чија је брзина ограничена дифузијом (Hippeli и Elner, 1997). У реакцији са биомолекулима, OH^{\bullet} покреће ланчане реакције (Halliwell и Gutteridge, 1984, Halliwell и Gutteridge, 1989).

Оксидишући масне киселине, хидроксил радикал покреће процес липидне пероксидације (Lpx), која за последицу може имати деструкцију биолошких мембрана и мембранских протеина (Anderson и др., 2012).

С обзиром на њихову високу реактивност и токсичност у односу на биомолекуле, хидроксил радикали имају значајну улогу у патофизиолошким процесима као што су: инфламација, тератогенеза и ћелијска смрт. Код инфламаторних процеса OH^{\bullet} радикал има централну улогу у регулацији продукције цитокина (Vulcano и др., 1998).

2.2.2.3. Азот (II)-оксид радикал, NO^{\bullet}

Азот-моноксид, најмањи је убиквитарни ћелијски сигнални медијатор. Испитивања овог медијатора су почела 1980. године открићем Furchgott и Zawadzki-ог (1980) о постојању непостојане супстанце, коју продукује ендотел а која је способна да изазове релаксацију изолованих крвних судова. Palmer и сар. су 1987. године доказали да ендотелне ћелије синтетишу NO (Palmer и др., 1987). Азот-моноксид се може синтетисати и у глаткомишићним ћелијама, неутрофиолима, активираним макрофагима, Купферовим ћелијама, надбубрежној жлезди као и у централном нервном систему (Nathan и Hibbs, 1991; Wendehenne и др., 2001).

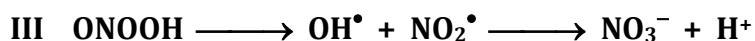
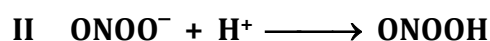
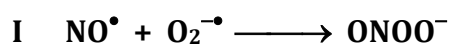
Азот-моноксид настаје стерео-специфичном оксидацијом L-аргинина, каталитичким дејством азот-моноксид синтетазе (NOS).

2. Општи део

NOS је ензим који захтева присуство пет редукујућих коензима: NADPH, FAD, FMN, хема и тетрахидробиоптерина. Идентификоване су три изоформе NOS: ендотелна, неуронална и макрофагална. Све три изоформе садрже хем (Forstermann и др., 1994; Wiesinger, 2001).

Азот-моноксид је слободни радикал мале молекулске масе, липофилне природе, што га чини погодним за локалну трансцелуларну комуникацију. Ове особине му омогућавају приступ унутрашњости макромолекула и способност да изазове оштећења активних центара. Учествује у регулацији јонских канала, тирозин киназа и фосфатаза, GTP-аза и транскрипционих фактора.

Кратак полуживот (6-60 s) NO радикала је последица хемијске нестабилности, с тога брзо реагује са кисеоником и супероксид анјон радикалом, при чему са $O_2^{\bullet -}$ гради високо токсични пероксинитритни јон (I) који се, у киселој средини, може трансформисати у пероксинитритну киселину (II), а потом даље у OH \bullet радикал (III) (Angus и Cocks, 1989):



Интеракција ROS и RNOS (Reactive NO Species – реактивне врсте азот моноксид радикала) указује на синергизам респираторне експлозије при чему настали пероксинитрил има већи цитотоксичан потенцијал од NO^{\bullet} и супероксид анјон радикал из којих настаје. Додатни ћелијски одговор на NO радикал укључује индукцију апоптозе (програмиране ћелијске смрти), разарање и мутацију ДНК. Биолошки ефекти NO^{\bullet} радикала могу бити:

Директни – ако је концентрација NO^{\bullet} радикала мања од $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ реагује са биомолекулима

Индиректни – ако је концентрација NO^{\bullet} радикала већа од $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ реагује са слободним радикалима кисеоника при чему настају реактивне NO- врсте (RNOS) (Murad, 1999).

2. Општи део

Табела 2.10. Физиолошке улоге NO•

ЛОКАЦИЈА	ФУНКЦИЈА
Периферна васкулатура	Вазодилатација крвних судова и регулација крвног притиска
Циркулишуће ћелије	Инхибиција адхезије тромбоцита и леукоцита за ендотел и агрегације тромбоцита
Срце	Редукција контрактилности миокарда
Бубрези	Регулација реналног васкуларног отпора и екскреције натријума
Нервни систем	Учествује у памћењу, перцепцији бола, посредује у неадренергичној нехолинергичној неуротрансмисији у периферним крвним судовима
Гастроинтестинални тракт	Врши неуротрансмисију и неадренергично нехолинергично-посредовану релаксацију глатких мишића
Ендокрини систем	Мења секретацију инсулина и ренина
Имуни систем	Доприноси отпорности

Азот-моноксид радикал је укључен у неспецифичне одбрамбене механизме и убијање посредством макрофага, инхибише пролиферацију туморских ћелија и микроорганизама. Дејством инфламаторних агенаса долази до ко-стимулације NOS и фагоцитне NADPH оксидазе. Симултана продукција реактивних интермедијера оба система резултује стварањем различитих молекула са антимикуробним дејством. Поред антимикуробног NO• поседује и цитопротективан, имунорегулаторан и микроваскуларан ефекат.

Антиинфламаторна активност подразумева следеће реакције NO•: формирање Fe-нитрозил-комплекса (спречавање уласка гвожђа у катализу прооксидативних реакција), инхибицију оксидазе „респираторне експлозије“, терминацију липидне пероксидације, утицај на експресију протективних стрес регулона. Антиинфламаторна активност се исказује и посредно спречавањем инактивације циклооксигеназе (COX) посредством супероксид анјон радикала где у реакцији са њим NO продукује нитрат (NO₃⁻).

2.2.3. Ефекти ROS-а

Бројни радови указују да ROS има и позитивне и негативне ефекте на хомеостазу живих бића. Учествују у процесима фагоцитозе (Pisani и др., 2009),

2. Општи део

а самим тим и у инфламаторном одговору организма на стране агенсе (Diaz и др., 2012; Halliwell и Gutteridge, 2007). Поред тога, све је више доказа да реактивни облици кисеоника имају и важну улогу у регулацији и инхибицији респирације (Pelicano и др., 2003) и апоптозе митохондрија (Lee и др., 2003).

Услед интеракције ROS-а са основним ћелијским структурама и биомолекулима, у организму веома лако може доћи до различитих „нежељених“ реакција:

оксидација тиолних група протеина доводи до дисфункције протеина, односно ензима, као и до поремећаја у јонском и трансмембранском транспорту (McCall и Frei, 1999)

оксидативно „цепање“ нуклеинских киселина доводи до оштећења генома, што је узрок мутација и карциногенезе (McCall и Frei, 1999)

оксидативна деструкција полисахарида доводи до поремећаја њихове функције и губитка вискозности хијалуронске киселине (Duan и Kasper, 2011)

слободни радикали кисеоника су потенцијални иницијатори оксидације и деградације полинезасићених масних киселина (PUFA- Poly Unsaturated Fatty Acids), које су структурне компоненте фосфо- и сфинголипида ћелијских мембрана, при чему долази до липидне пероксидације (Leutner и др., 2001)

оштећење мембране лизозима изазива екскрецију хидролитичких ензима, чиме долази до разарања основних ћелијских структура и нагомилавања липофусцина, пигмента старења (Halliwell и Gutteridge, 2007)

слично липидима и протеини су подложни штетном деловању пропагирајућих радикала (алкокси радикали) при чему долази до стварања других реактивних врста (Arrigo и др., 2002)

пуринске и пиримидинске базе су такође осетљиве на деловање ROS-а, па се тако реакција ОН радикала са ароматичним прстеном тимидина одвија механизмом адиције, уз формирање тимидил радикала, који даље подлежу низу споредних реакција резултујући оштећењем РНК и ДНК (Moustafa и др., 2004).

2. Општи део

2.2.3.1. Липидна пероксидација (LPO)

Липидна пероксидација је најчешће и најизраженије оштећење изазвано деловњем слободних радикала. То је ланчана слободно-радикалска реакција и представља аутокаталитички проградијентан (брзо напредујући) и најчешће иреверзибилан процес. Липидна пероксидација је оксидативно оштећење које захвата ћелијске мембране, липопротeine и друге молекуле који садрже липиде у условима постојања оксидативног стреса. Липиди ћелијске мембране (фосфолипиди, гликолипиди и холестерол) представљају најчешће супстрате оксидативног напада.

LPO је један од најбоље проучених процеса оштећења ћелија у условима оксидативног стреса. Почетна истраживања су указивала да LPO подлежу само липиди чије масне киселине садрже више од две двоструке везе. Данас је познато да процес обухвата и оксидацију холестерола, а готово је немогуће одвојити овај процес од оксидативне модификације протеина.

Процес липидне пероксидације представља само једну консеквенцу оксидативног стреса присутног у ћелији услед не адекватног баланса стварања и елиминације слободних радикала.

Табела 2.11. Фазе липидне пероксидације по реакцијама

Фаза Липидне Пероксидације	Реакција
Иницијација	$RH + O_2^{\bullet -} \rightarrow R^{\bullet} + HOO^{\bullet -}$ $RH + HOO^{\bullet -} \rightarrow R^{\bullet} + H_2O$
Пропагација	$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow + ROO^{\bullet}$ $ROO^{\bullet} + RH \rightarrow ROOH + R^{\bullet}$ $ROOH + M^n \rightarrow RO^{\bullet} + HO^{\bullet} + M^{n+1}$ $RO^{\bullet} + RH \rightarrow ROH + R^{\bullet}$ $R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$
Терминација	$R^{\bullet} + InH \rightarrow RH + In^{\bullet}$ $ROO^{\bullet} + InH \rightarrow ROOH + In^{\bullet}$ $In^{\bullet} + ROO^{\bullet} \rightarrow P$ $In^{\bullet} + In^{\bullet} \rightarrow P$ $R^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow P$ $ROO^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow P$ $2 ROO^{\bullet} \rightarrow P$

Иницијатори LPO, супероксид анјон и перхидроксил радикал, одузимањем водониковог атома од масне киселине (RH) доводе до стварања алкил

2. Општи део

радикала (R^\bullet). У фази пропагације настају алкилпероксил (ROO^\bullet) и алкоксил (RO^\bullet) радикали; пропагација (ширење) процеса зависи од присуства јона метала са променљивом валенцом. У фази терминације LPO значајну улогу имају реакције липидних радикала и антиоксиданаса (InH), као и реакције рекомбинације липидних радикала; у оба случаја настају молекулски производи (P) који немају карактер радикала.

Иницијација процеса липидне пероксидације подразумева одузимање атома H (од стране радикала кисеоничног порекла високог оксидационог потенцијала, најчешће OH^\bullet и 1O_2) из метиленске групе ($-CH_2-$) која се налази у α -положају од места двоструке везе у угљоводоничном ланцу незасићене масне киселине. Иницијацију LPx покреће било који оксиданс тј. слободни радикал.

При пропагацији као примарни продукти LPx настају коњуговани диени, перокси радикали и липидни хидропероксиди, а као секундарни продукти LPx (настају разградњом примарних продуката) краткочлани угљоводоници (етан, пентан, етен...), алдехиди и детони, малондиалдехид (MDA) и нови слободни радикали.

Трећа фаза, терминација подразумева прекид процеса LPx и обухвата реакције које се одигравају између слободних радикала, при чему настају терцијарни производи LPO који могу довести до промене флуидности и пермеабилности мембране, умрежавања протеина и хемоатрактанти макрофага.

Са старењем, мембранске структуре подлежу физичко-хемијским променама које воде већој ригидности мембрана при чему су деловање слободних радикала и LPO кључни фактори овог процеса.

Интрацелуларна акумулација флуоресцентног пигмена старења – липофусцина, се често користи као индекс LPO ћелија. Главни конституенти овог пигмента су оксидовани остаци липида.

За иницијацију, пропагацију и терминацију процеса липидне пероксидације неопходно је присуство супстрата који се оксидише, настајање ROS који покреће овај процес, присуство јона метала (Fe^{n+} и Cu^{n+}) који иницирају настајање нових високореактивних радикала одговорних за даљу иницијацију и пропагацију LPx.

2. Општи део

За заустављање процеса неопходно је деловање антиоксидантних ензима и неензимских антиоксиданата, који лимитирају ниво ROS-а.

Интензивираан процес липидне пероксидације је нађен више болести, при чему у атерогенези, исхемично-реперфузионим оштећењима и канцерогенези овај процес представља један од непосредних узрока основне болести.

Интензитет процеса липидне пероксидације као и могућност делимичног или потпуног репарирања оштећења, зависи од про- и антиоксидативних услова у средини у којој се овај процес одвија.

2.2.4. Механизми антиоксидантне заштите

Током еволуције, као адаптивни одговор на токсично деловање кисеоника, код аеробних организама је дошло до ставарња комплексних механизма заштите од оксидативних оштећења. Основна улога овог механизма је да смањи количину слободних радикала и њихових прекурсора у ћелији.

У организму постоји непрекидна физиолошка продукција токсичних метаболита кисеоника, али до поремећаја не долази све док постоји равнотежа између ћелијских система који продукују различите оксидансе и оних који одржавају антиоксидантне одбрамбене механизме. Овај оксидантно/антиоксидантни баланс је један од главних хомеостатских механизма у одржавању нормалних функција одбрамбених система. Сваки поремећај ове равнотеже представља „оксидативни стрес“ и фаворизује оксидативне процесе. У таквим условима деловаће антиоксиданти у зависности од типа оксидативног стреса као и од природе супстрата (Halliwell, 2001).

„Антиоксидант“ је често коришћен термин у литератури и, иако се о њему пола века интензивно расправља, још увек га је тешко дефинисати. Антиоксидантом се сматра свака супстанца која спречава или успорава оксидацију супстрата. У стању су да неутралишу деструктивне, високо реактивне слободне радикале, јер су у могућности да им предају електроне, стабилизујући их.

2. Општи део

Са функционалног аспекта деловања антиоксидативна заштита обухвата следећа три нивоа деловања:

Системи антиоксидативне заштите, који уколико је то могуће у потпуности спречавају ендогено стварање слободно радикалских форми. Овај ниво заштите је обезбеђен просторном раздвојеношћу процеса у којима се стварају слободни радикали.

Ангажовање антиоксидантног система у условима нормалног и појачаног стварања слободних радикала. Према природи и начину деловања антиоксиданти могу бити: ензимски и неензимски.

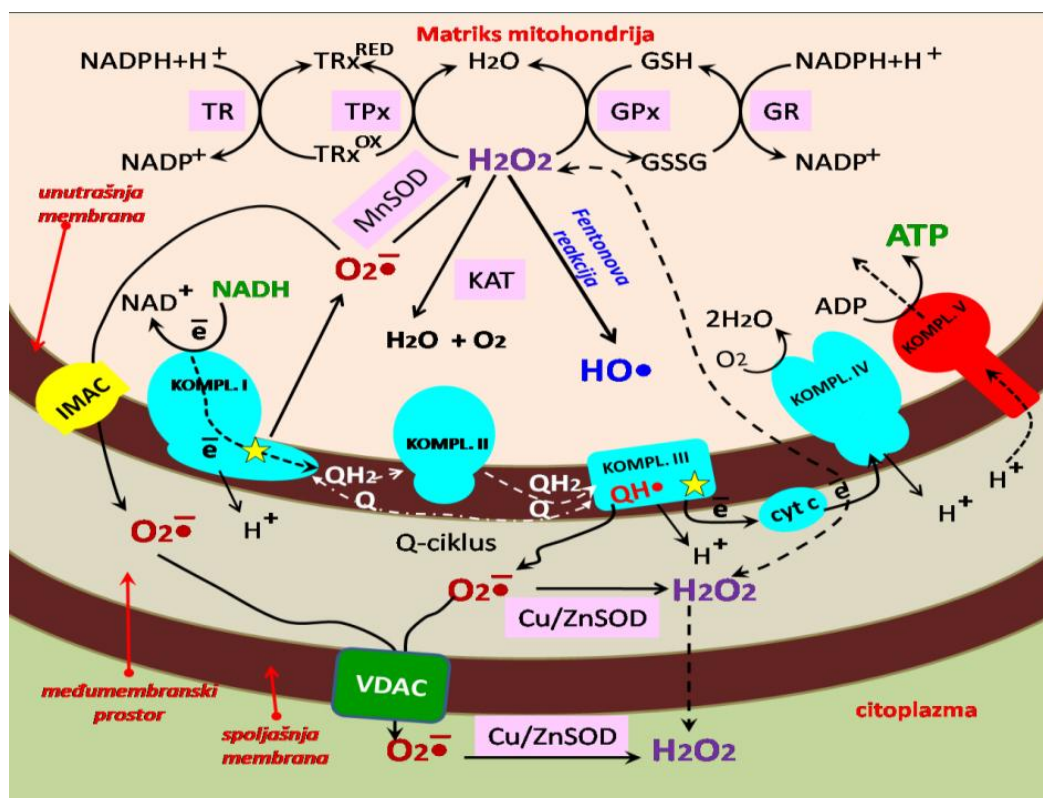
Ензимски антиоксиданти: примарна (прва) линија антиоксидантне заштите, укључује следеће ензиме: каталаза (CAT), глутатионпероксидаза (GSHPx), глутатион редуктаза (GSHR), глутатион-S-трансфераза (GST) и супероксид дисмутаза (SOD)

Неензимски антиоксиданти: секундарна (друга) линија антиоксидантне заштите обухвата природне ендогене продукте ћелије, нутритивне егзогене материје и синтетске производе као што су фармаколошки активне материје (нестероидни антиинфламаторни лекови, блокатори калцијума, алопуринол, десфероксамин, N-ацетилцистеин, АСЕ инхибитори). Овој групи припадају: витамин Е, витамин С, β-каротени, тиолна једињења (глутатион, метион и цистеин), албумин, металотионеин, карнозин, таурин, билирубин, мокраћна киселина, естрогени, креатинин, дихидролипонска киселина, коензим Q, полиамини, флавоноиди и друга фенолна једињења биљног порекла (Porović и др., 2002) или пореклом из гљива (Heleno и др., 2012; Fontes Vieira и др., 2013).

Ензимски антиоксиданти који учествују у репарацији насталог оксидативног оштећења липида, протеина, угљених хидрата и нуклеинских киселина. У ову групу спадају: класична и фосфолипид зависна глутатион пероксидаза, фосфолипаза A₂, разни протеолитички ензими, метионинсулфоксид-редуктаза, гликозилазе, ендо- и егзонуклеазе, ДНК-лигазе и ДНК-полимеразе.

Сви антиоксидантни системи су повезани и делују у „сагласју“. Било који антиоксиданс да је дефицитаран свакако ће се одразити на укупан антиоксидантни систем (*Слика 2.16.*).

2. Општи део



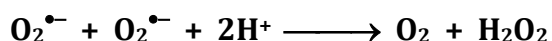
Слика 2.16. Стварање и детоксикација ROS-a у респираторном ланцу митохондрија

Mn-зависна супероксид дисмутаза (MnSOD) у матриксу и Cu/ZnSOD у међумембранском простору митохондрија и цитоплазми конвертују $O_2^{\bullet-}$ у H_2O_2 . Водоник пероксид се затим редукује до воде помоћу каталазе (CAT), глутатион пероксидазе (GPx) и тиоредоксин пероксидазе (TRx). Оксидовани глутатион (GSSG) и тиоредоксин (TRx^{OX}) који настају у овим реакцијама се враћају у редуковани облик GSH, односно TRx^{RED} , дејством глутатион редуктазе (GR), односно тиоредоксин редуктазе (TR), које као редуциона средства користе $NADPH + H^+$.

2.2.4.1. Ензимска антиоксидантна заштита

Супероксид дисмутаза (SOD)

Супероксид дисмутаза (EC 1.15.1.1.; супероксид: оксидоредуктаза) катализује дисмутацију супероксид анјон радикала ($O_2^{\bullet-}$) у водоник пероксид и O_2 , при чему се један $O_2^{\bullet-}$ оксидује у O_2 , а други редукује у H_2O_2 :

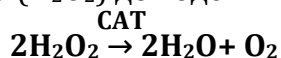


Ензим поседује три изоензимска облика.

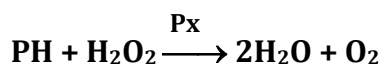
2. Општи део

Каталаза (CAT)

Каталаза (EC 1.11.1.6.; H₂O₂: H₂O оксидоредуктаза) је ензим који катализује разградњу водоник пероксида (H₂O₂) до воде и молекулског кисеоника:



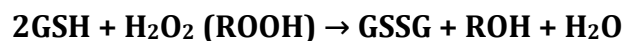
У зависности од концентрације супстрата одвија каталазни или пероксидазни тип реакције:



Распрострањена је у хуманим, животињским и биљним ткивима, као и код највећег броја аеробних и неких анаеробних бактерија. Заступљена је у ткивима сисара, а посебно је висока активност уочена у јетри и еритроцитима. Овај ензим не поседује изоензиме.

Глутатион-пероксидаза (GSHPx)

Глутатион-пероксидаза (EC 1.11.1.9.; глутатион: водоник пероксид оксидоредуктаза) катализује реакцију редукције водоник пероксида или органских хидропероксида у присуству редукованог глутатиона:



Глутатион редуктаза врши сталну регенерацију редукованог глутатиона:



Глутатион пероксидазну активност показује фамилија селен-зависних и селен-независних ензима који имају мањи афинитет према H₂O₂ али су ефикаснији у редукцији органских хидропероксида (Muller и др., 2007).

Глутатион-редуктаза (GSHR)

Глутатион редуктаза (EC 1.6.4.2.) или глутатион-дисулфид редуктаза је флавопротеин који катализује трансформацију оксидованог глутатиона (GSSG) у редуковани глутатион (GSH) у присуству NADPH као коензима (Deponte, 2013).

Активношћу GSHR обезбеђен је однос GSSG/GSH (GSH:GSSG=500:1), који је један од кључних фактора при одржавању оксидативне равнотеже ћелије са циљем одржавања високог нивоа редукованог глутатиона (GSH) и ниског нивоа

2. Општи део

оксидованог глутатиона (GSSG). Ензим катализује редукцију и других дисулфида, који настају како редукцијом GSH тако и других једињења која садрже –SH (коензим Н, цистеин, SH-протеини и др.).

Глутатион-S-трансфераза (GST)

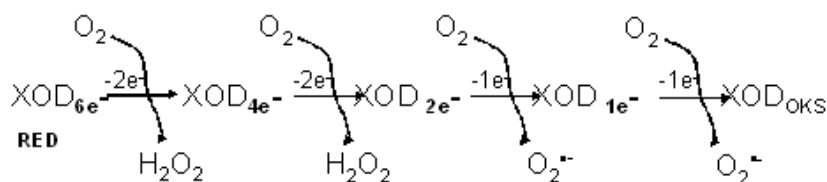
Глутатион-S-трансфераза (EC 2.5.1.18.) је фамилија мултифункционалних ензима чија је најважнија улога у процесима детоксификације, коју остварују катализовањем коњугације GSH са великим бројем електрофилних токсина и канцерогена (Marrs, 1996). Садрже је готово сва ткива и органи, а највише је заступљена у јетри, где су изолована три GST изоензима (GST1, GST2 и GST3) (Josephu, 2010).

Ксантин оксидаза (XOD)

Ксантин оксидаза (EC 1.1.3.22.; ксантин: кисеоник оксидоредуктаза) катализује оксидацију ксантина до мокраћне киселине:



Спада у групу металофлавопротеина (Brau и Meriwether, 1966; Hart и др., 1970). Ксантин оксидаза (XOD) постоји у два облика: ксантин дехидрогеназа (XDH) и ксантин оксидаза (XO), која се доводи у везу са настајањем већих количина $\text{O}_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 (Слика 2.17.).



Слика 2.17. Процес превођења редуковане у оксидовану форму ензима XOD

Код здравих особа, ксантин оксидаза је у мерљивим количинама присутна само у јетри и јејунуму, док код различитих поремећаја јетре долази до ослобађања ензима у циркулацију, те одређивање нивоа ксантин оксидазе у серуму служи као индикатор акутног оштећења јетре, нпр. код жутице (Hille, 2006). Новија истраживања стављају акценат на повезаност повећане

2. Општи део

активности ксантин оксидазе, оксидативног стреса са кардиоваскуларним болестима и дијабетесом (Desco и др., 2002; Kundalić и др., 2003; Ruilope и Pontremoli, 2013).

2.2.4.2. Неензимска антиоксидантна заштита

Глутатион (GSH)

Трипептид глутатион, чини 90 % укупних непротеинских сулфхидрилних једињења ћелије и присутан је у хуманим, животињским и биљним ткивима, као и у микроорганизмима највећим делом као тиол (редуковани облик, GSH), а ређе као дисулфид (оксидовани облик, GSSG) (Kretzschmar, 1996). Присуство глутатиона у аеробним организмима, а одсуство у анаеробним микроорганизмима, потврђује хипотезу да је појава глутатиона везана за успостављање аеробног метаболизма и појаву митохондрија.

Глутатион је веома важна компонента система ензима антиоксидантне заштите и есенцијални кофактор многих других ензима (формалдехид дехидрогеназа, глиоксалаза, простагландин ендопероксид изомераза). Током еволуције добијао је различите улоге: заштита ћелије од активних слободних радикала, детоксикација ксенобиотика, синтеза еикосаноида, синтеза нуклеинских киселина и беланчевина и учешће у ћелијској сигнализацији, пролиферацији и диференцијацији (Kretzschmar, 1996; Meister, 1988; Pavlović и др., 1994; Shan и др., 1990).

Метаболичке активности ћелије у којима глутатион учествује:

Антиоксидативна заштита: GSH, GSHPx, GST, GSHR и NADPH чине антиоксидантни систем глутатиона у коме су GSHR и NADPH потребни за редукцију оксидованог глутатиона (GSSG) и рециклизацију GSH која се остварује у глутатион редокс циклусу.

Учешће глутатиона у регулацији оксидативног статуса ћелије, без обзира да ли је оксидативни стрес у узрочној или последичној вези са болешћу или поремећајем метаболизма, за крајњу последицу има успоравање процеса старења, атерогенезе, мутагенезе и канцерогенезе.

2. Општи део

Редукција и изомеризација дисулфидних веза у структурним и функционалним протеинима:



Одржавање сулфхидрил/дисулфхидрил односа у ћелији, тј. одржавање редокс пуферског система ћелије: Промена односа GSH/GSSG је значајан фактор регулације ензима не само у процесу посттранслационе модификације протеина, већ и на генском нивоу.

Одржавање интегритета ћелијских мембрана: као и одвијање активног транспорта супстрата и јона, хомеостазу Ca²⁺ и транспорт аминокиселина.

Синтеза и метаболизам еикосаноида: GSH учествује у биосинтези простагландина и леукотриена.

Метаболизам ксенобиотика: количина редукованог глутатиона у ћелијама јетре и активност GST, обезбеђују коњугацију различитих егзогених и ендогених електрофилних једињења у нетоксичне хидрофилне деривате.

Способност излучивања GSH из различитих органа, нарочито јетре (Ookhtens и Kaplowitz, 1998), чини да његова концентрација буде већа у интерстицијуму у односу на концентрацију у плазми, што је од важности у заштити ћелијске мембране од оксиданата у њеном непосредном окружењу. С обзиром да је јетра важан извор GSH за друга периферна ткива, интензиван метаболизам ксенобиотика у овом органу доводи до пада концентрације GSH и резултује опадањем концентрације GSH у другим периферним ткивима што може имати бројне последице по организам (Каретановић и Mieyal, 1997) праћене неким од патолошких стања: HIV, фиброза плућа, дисфункција јетре (Herzenberg и др., 1997; Rahman и MacNee, 1999; Townsend и др., 2003).

Витамин Е

Витамин Е је неензимски липофилни антиоксидант широко распрострањен у природи, како у биљном тако и у животињском свету. Има осам структурних

2. Општи део

изомера, од којих су најважнији: α , β , γ и δ токоферол. α -Токоферол је најактивнији али и најзаступљенији облик витамина Е у храни, који представља значајну карику у антиоксидантној заштити ћелија (Carr и др., 2000; Sies и Stahl, 1995).

Унос већих дневних доза витамина Е смањује ризик од кардиоваскуларних обољења (Pryor, 2000), карцинома желуца и езофагуса (Jacobs и др., 2002), а неопходан је и за нормално функционисање имуног система (Meydani и Beharka, 1996) и превенцију атеросклерозе (Carr и др., 2000; Diaz и др., 1997).

Витамин С (L-аскорбинска киселина)

Витамин С је значајан неензимски хидрофилни антиоксидант, који се синтетише у биљкама, бројним животињским врстама, али због непостојања L-глуконолактон-оксидазе не може се синтетисати код људи (Sies и Stahl, 1995; Levine и др., 1995). Витамин С је значајан извор електрона, неопходних за неутрализацију слободно радикалских форми, те сузбија реактивност OH^\bullet , O_2^\bullet , и $^1\text{O}_2$ (Bendich и Chandra, 1990).

Делује синергистички са GSH-Px у ревитализацији витамина Е и стопирању радикалске ланчане реакције.

Уносом у већим дозама, витамин С испољава прооксидативна својства, мењајући O_2^\bullet као редукционо средство у Haber-Weis-овој реакцији, што указује на стимулативно дејство у генерисању OH^\bullet радикала (Gallie, 2012). Ова особина одређује улогу витамина С у *in vitro* системима одговорним за продукцију слободних радикала, где јоне Fe и Cu у Fenton-овој реакцији одржава у редукованом облику испољавајући антиоксидантну улогу (Hunt и др., 1992). Антиоксидантна активност витамина С може помоћи у превенцији канцерогених стања и кардиоваскуларних обољења (Carr и Frei, 1999).

Каротеноиди

Каротеноиди представљају групу пигмената који се синтетишу у биљним и бактеријским организмима. Најзаступљенији каротеноид у храни је

2. Општи део

β -каротен који поседује двоструко већу активност провитамина А у односу на друге каротеноиде.

Јетра, надбубрези и тестиси су богати каротеноидима, док у односу на друге каротеноиде β -каротена има више у јетри, надбубрезима, бубрезима, јајницима и масном ткиву. Протективно деловање каротеноида и витамина А остварује се кроз њихову антиоксидантну активност (Stahl и Sies, 2003), имуностимулаторна својства (Chew и Park, 2004; Meydani и др., 1995) и антиканцерогено деловање (Eliassen и др., 2012).

Фенолна једињења као антиоксиданти

Током еволуције биљке, али и гљиве су развиле ефикасне одбрамбене механизме против штетних утицаја видљиве, ултраљубичасте светлости и зрачења, који представљају природан извор различитих антиоксидантних једињења типа: фенола, терпеноида итд. (Ferreira и др., 2009).

Најчешћи и најактивнији биљни антиоксиданти поред токоферола и аскорбата су фенолна једињења (фенолкарбонске и фенилпропанске киселине, фенолни дитерпени, флавоноиди, кумарини и полифеноли), која у својој структури имају ароматични прстен са једном или више хидроксилних група и захваљујући томе показују активност како у хидрофилним, тако и у хидрофобним системима.

Ефикасност фенолних једињења у заштити од оксидативног стреса зависи од њихове реактивности у односу на различите ROS врсте, а и од реактивности фенокси радикала у односу на критичне биомолекуле (Sies, 1996).

Сматра се да је антиоксидантна активност првенствено резултат њихове способности да буду доноси водоникових атома као такви уклањају слободне радикале, уз формирање мање реактивних феноксил радикала (Јовановић и др., 1996). Повећана стабилност феноксил радикала приписује се делокализацији електрона и постојању више резонанционих форми. Са повећањем стабилности насталог феноксил радикала, повећава се могућност настајања

2. Општи део

рекомбинатних реакција, које доводе до терминације слободно-радикалских процеса.

Значај природних антиоксиданата је још већи јер је утврђено да су бројни комерцијални синтетски антиоксиданти (ВНА, ВНТ, РГ) повучени из употребе због потенцијалног токсичног, мутагеног и канцерогеног дејства. Наведени биомолекули испољавају своју активност преко различитих механизма: уклањајући слободне радикале, везујући јоне метала, инхибирајући ензимске системе који продукују слободно радикалске форме, повећавајући концентрацију биолошки важних ендогених антиоксиданата и индукујући експресију низа гена одговорних за синтезу ензима који спречавају оксидативни стрес (Primiano и др., 1997). Иако је присуство фенолних једињења пре свега карактеристика многих биљних врста (Balasundram, 2006; Cowan, 1999; Kahkonen и др., 1999), уочено је и код појединих представника гљива (Barros и др., 2007; Karaman и др., 2005; Mattila и др., 2001).

Поједина фенолна једињења испољавају различите физиолошке активности, укључујући антиинфламаторне (Garcia-Lafuente и др., 2009; Gomes Castro и др., 2013; Queiroz, и др., 2010), антиалергијске, антиканцерогене (Ito и др., 1998; Као и др., 2013; Kawaii и др., 1999), антидијабетогене (Conforti и др., 2009; Kim и др., 2009), антихипертензивне (Kosanić и др., 2012), антиреуматске и антимикробне (Barros и др., 2007; Karaman и др., 2014; Rathee и др., 2012).

Фенолне киселине: обухватају једињења која садрже најмање једну фенолну и једну карбоксилну групу. Под овим појмом се обично подразумевају две групе једињења:

Деривати бензоеве киселине: р-хидроксибензоева киселина; гална киселина; сиригинска киселина; протокатехинска киселина; ванилинска киселина; салицилна киселина; гентисинска киселина

Фенил пропаноиди: р-кумарна киселина; синапинска киселина; кафена киселина; ферулна киселина

Највећи број тестова указује да су деривати циметне киселине (C₆-C₃) ефикаснији антиоксиданти у односу на супституисану бензоеву киселину (C₆-C₁), највероватније због настајања слободно-радикалског интермедијера, чија

2. Општи део

стабилност је повећана услед коњугације ароматичног прстена са пропенским бочним низом.

Антиоксидантна активност деривата бензоеве и циметне киселине значајно варирају у зависности од броја хидроксилних група бензеновог прстена. Антиоксидантни потенцијал ових једињења пропорционалан је броју електрон-донорских супституената као и степену стабилизације (броју резонантних структура) насталих слободно-радикалских интермедијера. Као што је очекивано, циметна киселина у већини тестова показује слабију антиоксидантну активност у односу на деривате циметне киселина са две или више хидроксилних група (Natella и др., 1999).

Значај фенолних једињења

Фенолне киселине имају значајне физиолошке функције код гљива (Ferreira и др., 2009; Khatua и др., 2013; Stilinović и др., 2014; Yildiz и др., 2015). Циметна киселина, нарочито хидрокси-циметна киселина, има улогу основног прекурсора у биосинтези различитих биљних фенола. Хидрокси-циметна киселина је значајна и за обезбеђивање градивних блокова лигнина, који су структурни елементи ћелијског зида (Lam и др., 1992). Од хидрокси-циметних киселина најчешће се срећу кафена, ферулна и р-кумарна киселина (Harborne, 1989). Фенолне киселине имају функцију регулатора раста, значајне су као заштитне материје у развоју одређених болести, а важне су и за хлоропласте и за сам процес фотосинтезе.

Кафена киселина делује антиканцерогено и антивирусно (Andrae-Marobela и др., 2013; Lee и др., 2012). Хидрокси деривати циметне киселине су инхибитори 5-липооксигеназе у метаболизму арахидонске киселине и у синтези леукотриена, па се сматра да могу да буду потенцијални антиалергени или антиинфламаторни агенси (Pergola и др., 2011).

Флавоноиди: чине хетерогену групу полифенолних једињења. Основно једињење, по којем је читава група и добила име, изоловао је 1895. године Kostanesku и назвао га „флавор“ (латински флавор значи жут) (Mitić, 2011).

2. Општи део

Прва већа истраживања флавоноидних једињења започињу 1936. године, када је мађарски научник Albert Szent-Gyorgi утврдио синергизам између витамина С и до тада неидентификованог кофактора из лимуна, прво названог „цитрин“, а касније „витамин Р“ (Murray, 1998; Sandhar и др., 2011). Присуство ОН група директно везаних за угљеникове атоме бензеновог прстена, као и двоструке везе између С₂ и С₃, одређује антиоксадитивну улогу флавоноида, фенолних киселина и њихових естера. Нарочито изражену активност показују једињења са две хидроксилне групе, распоређене као код катехола (1, 2 бензендиола) и три хидроксилне групе распоређене као код пирогалола (1, 2, 3 бензелтриола). Разноврсност и велики број флавоноида су последица могућих бројних модификација њихове основне структуре, као што су додатне хидроксилације, О-метилације хидроксилних група, димеризације, везивање неорганског сулфата. Најбитнија модификација је гликолизација хидроксилних група (настајање О-гликозида) или флавоноидног језгра (настајање С-гликозида). Изоловано је преко 6500 флавоноида који су, с обзиром на степен оксидације централног пиранског прстена, подељени у дванаест класа (Boumendjel и др., 2002). Најпознатији флавоноиди су:

флавоноли: кверцетин, рутин, мирицетин, фисетин, кемпферол, морин, госсипетин;

флаволи: кризин, апигенин, лутеолин;

флаванолни: таксифолин, дихидрокверцетин, дихидрофисетин; и

флавоноли: хесперитин, нарингенин и др.

Најраспрострањенији од свих флавоноида су флавоноли (3-хидроксифлаволи) и флаволи којих има нешто преко 1600. Од флавонола у биљкама најзаступљенији су: кверцетин, камферол и мирцетин. Кверцетин се сматра најраспрострањенијом компонентом свих биљних фенола. Међу флавонолима је познато око 200-300 агликона ових једињења. Од флавонола у биљкама најзаступљенији су лутеолин и апигенин. Јављају се у облику О- и С-гликозида. Ова једињења се могу јавити у још једној структурној варијацији, као бифлаволи. Ове димерне компоненте се формирају путем С-С или С-О

2. Општи део

купловања између две флавононе (обично апигенине) јединице (Тарас и др., 2008).

У структурном погледу, за разлику од флавоноида код којих срећемо хромогени систем прстенова, антоцијани садрже бензопирилијум структуру (протоновани бензопирански систем). Антоцијани представљају велику групу биљних пигмената, који су присутни у цветним деловима биљака и плодовима - воћу. Јављају у природи као гликозиди, често као глукозиди чијом се хидролизом добијају обојени агликони- антоцијанидини.

Значај флавоноидних једињења

Фармаколошки ефекат флавоноида у вези је са њиховом антиоксидантном активношћу и инхибицијом одређених ензима. Показују антиинфламаторну активност која је зависна од структуре флавоноида (Garcia-Lafuente и др., 2009; Guardia и др., 2001; Pelzer и др., 1998). Антиинфламаторна активност флавоноида потврђена је и *in vitro* тестирањем способности инхибиције липооксигеназе и циклооксигеназе (Abad и др, 1995; Sadhar и др., 2011). Делују на метаболизам крвних судова и повећавају им отпорност, па се користе у лечењу хеморагије, дијабетеса (Li и др., 2009; Sriram и Subramanian, 2011), хипертензије (Navsteen, 2002) и атеросклерозе (Geleijnse и др., 1999) (најефикаснији су деривати рутина, катехини, флаван-диоли, флавоноли, и изофлавоноли).

Флавоноиди подстичу излучивање жучи својим хепатопротективним деловањем, антагонисти су многим токсичним ксенобиотицима, а показују и антимицробну, антивирусну, антиалергијску, и антитуморску активност (Navsteen, 2002). У експерименталним условима спречава развој карцинома дојке изазваног естрогенима (Takemura и др., 2013). Флавоноиди су прихваћени као нетоксичне супстанце, али у великим концентрацијама могу деловати и прооксидативно, иницирајући слободно-радикалске реакције (Сао и др., 1997).

2. Општи део

2.2.5. Антиоксиданти гљива

Последњих деценија XX века, као и првих деценија XXI века, бројна научна истраживања базирана на биолошкој активности су била усмерена на истраживања антиоксидантима пореклом из биљака, бескичмењака и то превасходно морских организама, али је такође посвећена велика пажња и природним производима пореклом из микроорганизама.

Гљиве су предмет истраживања још од открића првог антибиотика, тачније више од 75 година, пошто су значајан потенцијални извор природних органских једињења са значајним биолошким активностима, како због своје метаболичке, тако и због своје генетичке разноврсности. Слично биљкама, плодна тела неких гљива имају способност продукције различитих класа секундарних метаболита, укључујући: феноле, поликетиде, терпене, токофероле, аскорбинску киселину, каротеноиде, полисахариде и стероиде (Ferreira и др., 2009; Jia и др., 2009; Lee и др., 2013). Неке од предности коришћења гљива у односу на биљке као извор биоактивних једињења су та да плодна тела гљива, али и мицелија у краћем временском периоду могу произвести оптималне количине активних производа и то превасходно у потопљеним културама (Ferreira и др., 2009).

Многи секундарни биомолекули присутни у гљивама (полисахариди, тритерпени и фенолне киселине) имају значајне биолошке и фармаколошке активности, што их чини посебно интересантним за фармацеутску индустрију. Међу наведеним једињењима је и значајан број једињења која која према структурним елементима могу да делују као снажни антиоксиданти те да се користе у превенцији и терапији обољења изазваних оксидативним стресом и неконтролисаним продукцијом ROS-а.

Сматра се да постоји корелација садржаја укупних фенолних једињења и антиоксидантне активности екстраката плодних тела лигницилних гљива (Alves и др., 2013; Ferreira и др., 2009; Karaman и др., 2010; Kim и др., 2008; Lee и др., 2007; Liu и др., 2009; Saltarelli и др., 2009; Stilinović и др., 2014; Yildiz и др., 2015). Иако фенолна једињења у основи испољавају антиоксидантна својства,

2. Општи део

нека од једињења из ове групе имају ту способност да активирају унутарћелијско формирање ROS-а (Wei и Van Griensven, 2008).

Група научника (Barros и др., 2007) је дошла до закључка да је у узорцима појединих јестивих гљива које су прошле кроз процес кувања (*Lactarius deliciosus*, *Macrolepiota mastoidea*, *Macrolepiota procera* и *Sarcodon imbricatus*) значајно смањен садржај антиоксидантних једињења, где се под утицајем топлоте уништава структура полифенола као носиоца антиоксидантне активности. Са друге стране, ниска температура може довести до повећања концентрације фенолних једињења у њима (Barros и др., 2007). И поред великог броја радова из ове области још увек није разјашњено која су једињења одговорна за антиоксидантно деловање гљива. Познато је и да су полинезасићене масне киселине богате антиоксидантима. За поједине врсте гљива рода *Ganoderma* је познато да поседују поред антимикуробног и антиоксидантно својство (Bang и др., 2014; Deepalakshmi и др., 2013; Ferreira и др., 2009; Karaman и др., 2005; Karaman и др., 2009; Li и др., 2012; Mau и др., 2002; Nagaraj и др., 2014; Rajasekaran и Kalaimagal, 2011; Saltarelli и др., 2009; Yildiz и др., 2015; Zhang и др., 2015). С обзиром на податке о деловању ових супстанци у биљкама може се претпоставити да и у гљивама имају сличне ефекте, те је у потпуности оправдано биохемијска истраживања гљива усмерити у том правцу.

2.3. АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ ГЉИВА

Антимикуробне супстанце представљају једињења различитог хемијског састава која су токсична за бактерије, али не и за ћелије домаћина (**Табела 2.12.**). У терапијске сврхе се користе супстанце природног порекла: антибиотици и синтетске супстанце: хемотерапеутици. Заједничко својство ових супстанци је да делују у веома малим концентрацијама, постижући бактерицидне, бактериостатске и бактериолитске ефекте (Petrović и др., 2007). Антимикуробне супстанце су класификоване према хемијском саставу, методи и начину деловања. Највише коришћен антимикуробни агенс је алкохол који

2. Општи део

убија само вегетативне ћелије, док ендоспоре и отпорније бактерије нису обухваћене његовим деловањем. Често се као антисептици употребљавају и халогени елементи (јодиди и хлориди – нпр. тинктура јода је један од првих коришћених антимикуробних агенаса). Такође је и код тешких метала (жива, бакар, сребро и цинк) забележена антимикуробна активност (Petrović и др., 2007).

Табела 2.12. Преглед антимикуробних супстанци пореклом из макрогљива

ВРСТА ЈЕДИЊЕЊА	ПОДВРСТА ЈЕДИЊЕЊА
Фенолна једињења	Флавоноиди Танини Кумарини
Терпеноиди Сесквитерпени	Кариофилени Пунктапоронани Колибиал Протоилудани Марасмани Хидрограмини Кукумани Фоманосани Илудани Илудалани Изоилудани Хирзугани Плеуротелани
Тритерпени	Изолактарами Мерулани Тритерпенски сапонини Фаволон
Полисахариди	Нецелулозни β -гљукани Интрацелуларни полисахариди
Протеини и полипептиди	Ганодермин Плеурострин Трихогин Ерингин Агроцибин
Остала једињења	β -метокси акрилати Полиини Агроциболоктон Лентионин Цинабарин Ласхиатрион Оксална киселина

2.3.1. Антибактеријска активност

Антибиотици (гр. *anti*-против и *bios*-живот) су једињења произведена од стране микроорганизама, која својим природним метаболичким путевима инхибишу или уништавају раст других микроорганизама. Ова дефиниција је обухватала само агенсе које су микроорганизми природно производили, како би се тако правила разлика између њих и хемијски произведених агенаса (нпр. сулфономиди). Данас та граница не постоји и термин се користи како за природне, тако и за синтетски произведене антибиотике (Lorian, 2005).

Антибиотици представљају органска једињења која ферментационим путевима, као секундарне метаболите продукују живи микроорганизми, тј. спорулишуће бактерије и гљиве (*Streptomyces spp.*, *Bacillus spp.*; *Cephalosporium spp.*, *Penicillium spp.* и др.) (Karaman, 2009). Основна улога оваквих једињења је да униште или спрече развој других компетиторних микроорганизама, без штетног утицаја на организам који их синтетише. Антибиотици који делују и на Gram-позитивне, тако и на Gram-негативне бактерије се називају антибиотцима широког спектра деловања, док су антибиотици уског спектра деловања, са друге стране, ефикасни само на мали број организама. У свим случајевима, коришћење антибиотика се заснива на њиховој селективној токсичности, чинећи антибиотике токсичним за микроорганизам, али не и за самог домаћина.

Механизам деловања антибиотика углавном је везан за ометање синтезе ћелијског зида, за модификацију пропустљивости плазма мембране, за ометање фазе репликације хромозома или ометање синтезе протеина (Alves и др., 2012).

Истраживања царства гљива као продуцентата антибактеријских агенаса су обимна и на стотине врста су, до сада, показале широк спектар фармаколошких активности, а будући да су гљиве у свом природном окружењу непрестано изложене различитим патогеним и другим микроорганизмима, разумљиво је да већина једињења пореклом из гљива поседује антибактеријску активност (Hur и др., 2004; Lindequist и др., 2005). Светска

2. Општи део

Здравствена Организација (енгл. WHO) је 2010. године саветовала све земље да спроведу контролне процедуре за пропагацију лекова мултирезистентних бактерија, наглашавајући ризике који су повезани са одсуством алтернативних терапија (Vlagojević, 2013). Истраживања у циљу проналаска нових антимикробних супстанци које су ефикасне против патогених микроорганизама, а који су резистентни на постојеће агенсе, од кључног су значаја. Већина студија које су до данас спроведене на гљивама у циљу проналаска антибактеријске активности фокусирана је на приказивању антибактеријских својстава екстраката гљива у циљу идентификације једињења одговорних за антибактеријску активност (Alves и др., 2012).

У последњим деценијама XX века, започела су интензивнија истраживања макрогљива, што је подразумевало и истраживања структурно различитих метаболита, пореклом из примарног или секундарног метаболизма гљива (полисахарида, гликопротеина, протеоглукана, терпеноида, масних киселина, протеина, лектина, итд. Претпоставља се да су то једињења која припадају хемијској групи терпена, на пример: конфлуентин, грифолин и неогрифолин који су изоловани из полипорне гљиве рода *Albatrellus* и показују антимикробну активност према *Bacillus cereus* и *Enterococcus faecalis* (Liu и др., 2010). Сирови екстракти *G. lucidum*, *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* показују активност на *B. subtilis* (Zjawiony, 2004). Два секундарна метаболита, Ганомицин А и В, који су изоловани из врсте *Ganoderma pfeifferi* показују антимикробну активност према неколико Gram-позитивних и Gram-негативних бактерија, укључујући: *Bacillus subtilis*, *Micrococcus flavus* и *Staphylococcus aureus* (Monthana и др., 2000; Ofodile и др., 2005). Једињења енокиподини А, В, С и D, изоловани из врсте *Flammulina velutipes* делују антибактеријски на *Bacillus subtilis*, али само енокиподини А и С показују активност према *Staphylococcus aureus* (Ishikawa и др., 2001). H₂O екстракти врсте *G. lucidum* инхибирају раст бактерије *Helicobacter pylori* (Yihuai и др., 2003), и утичу на инхибицију и раст 15 врста Gram-позитивних и Gram-негативних бактерија (Nayak и др., 2010; Yoon и др., 1994). Хександихлорметански екстракти четири врсте: *G. colossum*, *G. lucidum*, *G. boninense* и

2. Општи део

G. resinaceum прикупљених на територији Нигерије показују антибактеријску активност на *P. syringae* и *B. subtilis*, за разлику од *Cladosporium herbarum* (Ofodile и др., 2005).

Приликом испитивања осетљивости микроорганизама на антимикуробне супстанце мора се узети у обзир концентрација агенаса којем је дати микроорганизам изложен, при чему се могу утврдити МИС и МВС вредности које су детаљније објашњене у поглављу **3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.**

Услед превелике употребе антибиотика у медицини, ветерини и сточарству, све је чешћа појава антибиотске резистенције, што представља озбиљан терапијски проблем. Отпорност бактерија представља њихов адаптивни одговор у којем микроорганизам почиње да толерише количину антимикуробног агенса, која би уобичајено била инхибиторна, до потпуне резистенције, која се испољава експресијом гена који стопирају деловање агенса, што се испољава у виду мутација (Andersson и Levin., 1999; Woodford и Ellington, 2007).

2.3.2. Антифунгална активност

Антифунгалне сустанце могу бити од велике користи у лечењу инфекција код људи, а од официјелних терапеутика на светском тржишту могу се наћи само антибиотици пореклом из микрогљива. Опортунистичке гљивичне инфекције су увек велики проблем, посебно код имунокомпромитованих пацијената који примају хемотерапију, или у случајевима трансплантације органа или коштане сржи, као и код HIV инфекција.

Последњих десетак година повећан је интерес за једињењима која показују антифунгалну активност, међу којима је први сордарин (трициклични дитерпенски гликозид) први пут изолован још 1971. год. (Inouе и др., 2004, из Karaman, 2009) и нешто потентнији зофимарин изолован први пут 1987. (Inouе и др., 2004). Новија истраживања показују да стероли и триперпени (апланоксидична киселина А, В, F и G) изоловани из *G. annulare* не показују антифунгалну активност на раст *Microsporium cannis* и показују доста слабу

2. Општи део

активност према *Trichophyton mentagrophytes* (Smania и др., 2003). Док је код *G. lucidum* изолован протеин ганодермин који показује антифунгалну активност против: *B. cinerea*, *F. oxysporum* и *P. piricola* (Wanga, 2006). Стероиди као што су 5а-ергоста-7,22-диен-3 β -ол (3) или 5,8-епи-деокси-5а,8а-ергоста-6,22-диен-3 β -ол су слабо активни на мањи број Gram-позитивних и Gram-негативних бактерија (Lindequist и др., 2005 из Karaman, 2009).

2.3.3. Антивирална активност

Како је познато да се бактеријске инфекције могу лечити антибиотицима, тако се вирусне болести не могу лечити антибиотицима него специфичним лековима, као што су антивиотици, вакцине и имуноглобулини. Антивирални ефекти су описани како на екстрактима гљива тако и на једињењима изолованим из истих екстраката (Lindequist и др., 2005; Niedermeyer и др., 2005). Гљиве могу утицати на инхибицију виралних ензима, синтезу виралних нуклеинских киселина или адсорпцију вируса за ћелије сисара (Nosoya и др., 1991).

Најчешће су молекули мале молекулске масе активни код директног антивиралног ефекта, док су индиректни антивирални ефекти остварени кроз имуностимулаторну активност полисахарида, терпеноида или других комплексних молекула (Amaral и др., 2008; Ео и др., 2000; Mothana и др., 2003; Niedermeyer и др., 2005) преко везивања за ћелије, инхибицију везивања самих вируса за ћелије, инхибиције фузије вирус-ћелија (Nosoya и др., 1991).

Једињења мале молекулске масе са антивиралном активношћу: неколико тритерпена из *G. lucidum* (нпр. ганодериол F, ганодерманонтриол и ганодерична киселина В) су активни антивирални агенси против HIV-1 вируса (Mizumoto и др., 1990), али и протеогликани који показују хепатопротективну активност инхибицијом херпес симплекс вируса типа I и II (HSV-1 и HSV-2) (Liu и др., 2004). Ганодермадиол, луцидадиол и апланоксидична киселина G су изоловани тритерпени из врсте *G. pfeifferi* и показују антивиралну активност

2. Општи део

против инфлуенца вируса типа А и HSV-1 (Mothana и др., 2003). Из исте врсте су изолована и следећа тритерпеноидна једињења: ганодерон А, ергоста-7,22-диен-3- β -ол и луциалдехид В који такође делују антивирално на инфлуенца вирус типа А и HSV-1 (Niedermeyer и др., 2005). Сулфоновани полисахариди (карагинан, ксилофуранан сулфат, рибофуранан сулфат и декстран сулфат) су потенцијални антивирални агенси због *in vitro* активности на HIV и HSV (herpes simplex virus) везано за анјонска својства молекула (Ео и др., 2000; Marchetti и др., 1994).

In vitro антивирусна активност на вирусе инфлуенце типа А и В је уочена и код екстракта мицелије гљиве *Kuehneromyces mutabilis*, док су екстракт и две изоловане фенолне компоненте из гљиве *Inonotus hispidus*, као и ергостерол пероксид присутни у више различитих гљива.

Једињења велике молекулске масе са антивиралном активношћу:

Хидрофилни лигнини изоловани из врсте *Inonotus obliquus* инхибирају протеазу са IC₅₀ вредношћу од 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Анти HIV активност је забележена за медијуме потопљене културе гљиве *L. edodes* и хидрофилног лигнина из исте врсте. Протеинско-полисахаридни комплекси (APBP, acidic protein bound polysaccharides) изоловани из *G. lucidum* показују јачу антихерпетичку активност (HSV-1 и HSV-2) у односу на NPBP (neutral protein bound polysaccharides) захваљујући анјонском својству молекула да инхибирају раније фазе вирусне инфекције (напад вируса и пенетрација) (Ео и др., 2000; Marchetti и др., 1994).

Антивирални потенцијал APBP-а изолованих из *G. lucidum* у комбинацији са протеинским антивиралним агенсима интерфероном α (IFN α) и интерфероном γ (IFN γ) указује да је потентнији синергистички ефекат APBP-а са IFN α у односу на IFN γ на HSV-1 и HSV-2 (Kim и др., 2000).

2. Општи део

2.3.4. Једињења са антимицробном активношћу

2.3.4.1. Терпеноидна једињења

Иако биљни организми важе за највећи извор тритерпеноида, последњих година све је више података који указују на присуство ових једињења код појединих представника макрогљива (Akihisa и др., 2005; Boh и др., 2000; Boh и др., 2007; de Silva и др., 2006; Deyrup и др., 2006; Mothana и др., 2003). Изолована терпеноидна једињења из гљива рода *Ganoderma* показују низ различитих биолошких активности:

- антиинфламаторну (Dudhgaonkar и др., 2009; Ко и др., 2008),
- антивиралну (Min и др., 1998; Mothana и др., 2003; Niedermeyer и др., 2005),
- цитотоксичну (Cheng и др., 2010; Sliva, 2006; Yue и др., 2010),
- антихипертензивну (Morigiwa и др., 1986),
- антиалергијску (Kohda и др., 1985),
- антиандрогену (Liu и др., 2007),
- антиоксидантну (Li и др., 2009; Li и др., 2015; Lin и др., 2015; Paterson, 2006; Pillai и др., 2004; Zhu и др., 1999),
- хепатопротективну (Wang и др., 2009),
- антидијабетогену (Fatmawati и др., 2011), имуностимулаторна (Rios, 2010).

Сесквитерпени (C₁₅H₂₄):

Једна од бројних стратегија којима се представници макрогљива служе у циљу заштите од бројних паразита који се хране њиховим плодним телима је продукција токсина, а велики број тих токсина хемијски одговара сесквитерпенима (Wolf-Reiner, 2001 из Karaman, 2009).

За већину Basidiomycota карактеристично је присуство сесквитерпена протоилуданског типа, који воде порекло од хумулена, једињења насталог циклизацијом фарнезилпирофосфата (FPP) иначе ретко присутног код гљива (Clericuzio и др., 2002). Од неколико путева трансформације хумулена,

2. Општи део

најзначајнији је пут синтезе протоилудана, трицикличног једињења које се, због велике реактивности условљене присуством циклобутана, даље трансформише у низ једињења. Неки од ових сесквитерпена показују интересантне биолошке активности, па се сматрају занимљивим објектом проучавања са аспекта медицинске хемије. Неколико група сесквитерпена пореклом из виших гљива показују различите нивое антимикуробног дејства.

Поједини представници родова *Russula* и *Lactarius* синтетишу сесквитерпенске алкоhole који су естерификовани са масним киселинама (Daniewski и Vidari, 1999; Vidari и Finzi, 1995;). Ови естри не показују јаку антибиотску активност, али приликом повреде плодног тела гљиве, долази до цепања естарских веза и ослобађања алкоhole који су веома реактивни, а стога и изузетно токсични за микроорганизме. Због тога се поменути естри могу сматрати продрогама, односно прекурсорима једињења која се метаболичким процесима преводе у активну форму. Антибактеријска активност сесквитерпеноидних хидрохинона-ганомидина је карактеристична за европске врсте гљиве *G. pfeifferi* (Mothana и др., 2000 из Karaman, 2009).

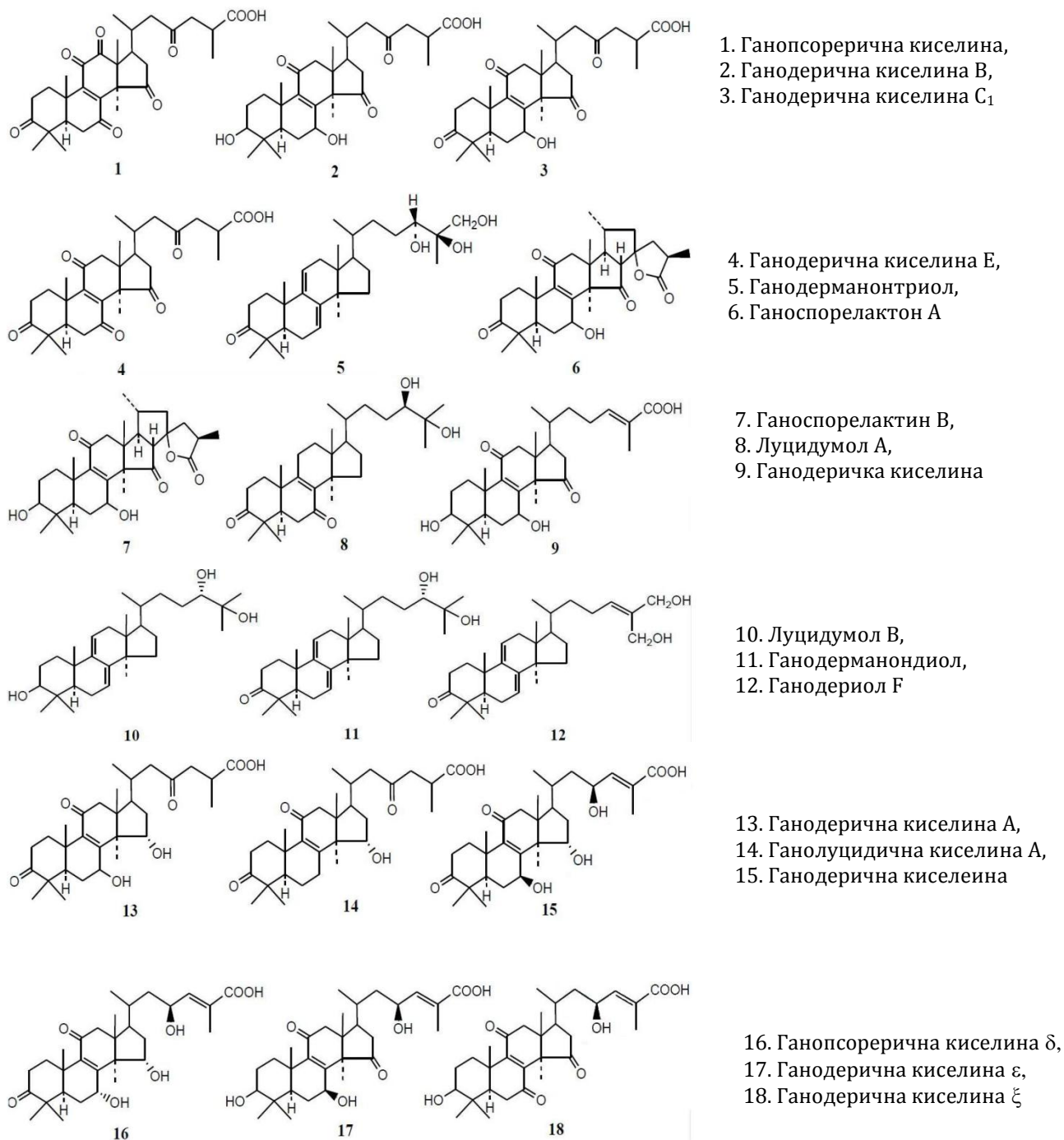
Тритерпени (C₃₀H₄₈):

Тритерпеноидна једињења су заступљена у саставу великог броја гљива, чији екстракти показују антибиотска својства (Aroga, 2004).

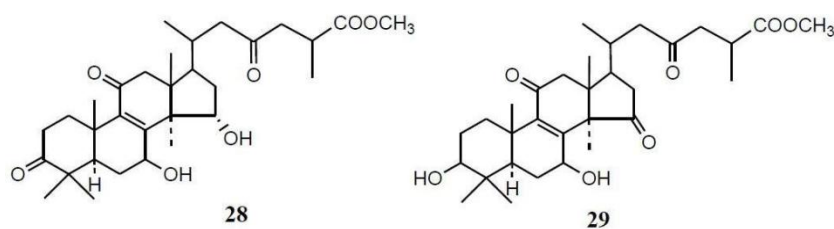
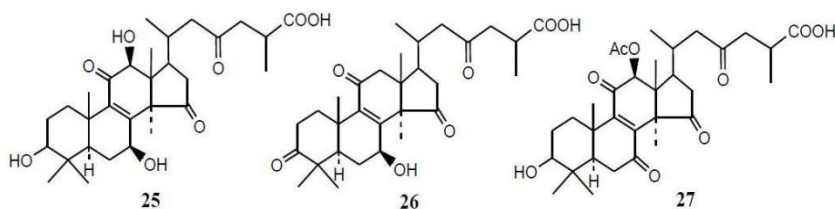
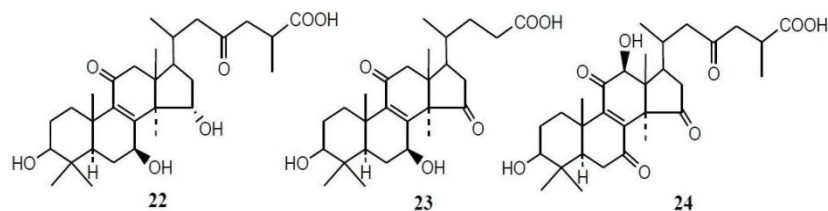
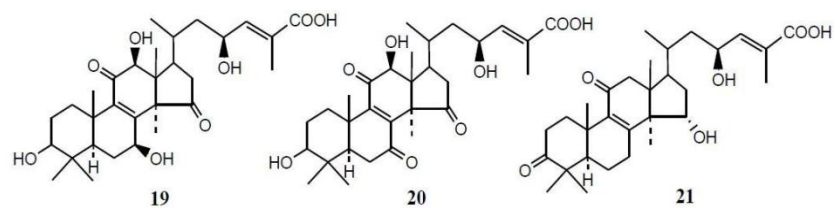
Род *Ganoderma* садржи много врста које су познате по продукцији тритерпенских једињења (Chen и Chen, 2003; Joseph и др., 2011). Иако се сматра да су тритерпеноидна једињења одговорна за антимикуробно деловање ових гљива, ипак постоје подаци који то оповргавају, наводећи пример седам различитих тритерпена изолованих из вијетнамске врсте *G. collosum*, који не испољавају антимикуробно, већ снажно антиинфламаторно деловање (Ofodile и др., 2005). Већина тритерпена које синтетишу представници рода *Ganoderma* припада ланостанском типу (de Silva и др., 2006). До сада је изоловано преко 100 терпеноидних једињења из гљива рода *Ganoderma*, као што су ганодерична (високо оксигеновани C₃₀ ланостански тип тритерпена), луциденична, ганодермична, ганодеренична, ганолудична и апланоксидична киселина,

2. Општи део

луцидони, ганодерали и ганодероли (Вон и др., 2000; Ма и др., 2011) (*Слика 2.18.*), док је преглед тритерпенских једињења изолованих из различитих припадника макрогљива дат у *Табели 2.13.*



2. Општи део



Слика 2.18. Структуре основних класа терпеноидних једињења заступљених код гљива рода *Ganoderma*

2. Општи део

Табела 2.13. Тритерпеноидна једињења пореклом из макрогљива (Karaman, 2009)

Једињење	Порекло	Биолошка активност
Тритерпени ланостанског типа (de Silva и др., 2006)	<i>G. applanatum</i> <i>G. lucidum</i>	
Тритерпени ланостанског типа, масне киселине и ланостански и ергостански деривати (He и др., 2003)	<i>Fomes</i>	антибактеријска и антивирална својства
Тритерпенски лактони-фомлактони А, В, С (He и др., 2003)	<i>Fomes cajanderi</i> (дрвеће Кине)	
Четири нова тритерпенска гликозида: колокозиди А, В, С и D , ферманска класа тритерпеноида	Чести у биљним организмина и лишајевима, три представника: <i>Xylaria</i> са Хавајских острва (Deugur и др., 2007)	умерена антифунгална и инсектицидна активност, колокозид А поседује антибактеријско дејство на <i>B. subtilis</i> и <i>S. aureus</i>
Фускоатрозид и енфумафунгин		Антибактеријско и антивирусно дејство
Тритерпенски сапонини гликозиди са бетулином као агликонском компонентом	<i>P. ostreatus</i>	Улога сигналних молекула при развоју плодног тела гљиве (Magac и Ohara, 2006)
WF11605		Антиинфламаторна својства
Фавалон - тритерпеноид чија циклична структура и начин супституције варирају	<i>Favolaschia</i> (Anke и др., 2004)	Антифунгална активност на: <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>P. notatum</i> , <i>Mucor miehei</i> и др.

2.3.4.2. Фенолна једињења

Детаљан преглед фенолних једињења дат је у поглављу 2.2.4.1. Фенолна једињења су најпре идентификована код биљних врста (Kim и др., 2003; Kris-Etherton и др., 2002), али је њихово присуство убрзо запажено и код гљива (Barros и др., 2007; Karaman и др., 2005; Karaman и др., 2010; Kim и др., 2008; Mattila и др., 2001; Saltarelli и др., 2009; Yildiz и др., 2015; Zengin и др., 2015).

2. Општи део

Антимикробна својства фенолних једињења се тумаче присуством хидроксилних група, а њихова токсичност се повећава повећањем броја хидроксилних група, али и повећањем степена оксидације молекула (Cowan, 1999), тако да се за циметну и кафену киселину може очекивати да због високог степена оксидације показују изузетну антимикробну активност, тј. антибактеријску (Brantner и др., 1996), антивиралну (Wild, 1994) и антифунгалну (Duke, 1985). Антимикробно дејство ових једињења огледа се у способности стварања комплекса са екстрацелуларним растворљивим протеинима и са полипептидима који изграђују ћелијски зид микроорганизама, као и у нарушавању функције биомембранских система (Cowan, 1999). Висок садржај фенола као и њихово антимикробно деловање установљено је и код лигниколних гљива *Meripilus giganteus*, *Ganoderma lucidum* и *Flammulina velutipes* и то у облику кумарина и танина, као и код *Ganoderma applanatum* (Karaman и др., 2010, Karaman и др., 2012). Код различитих врста гљива детектоване су следеће фенолне киселине:

деривати бензоеве киселине: р-хидроксибензоева, протокатехинска, гална, ванилинска и сирингинска киселина (Alves и др., 2013; Barros и др., 2009; Heleno и др., 2011; Karaman, 2009; Kim и др., 2008; Puttaraju и др., 2006; Stilinović и др., 2014; Yildiz и др., 2015; Zhang и др., 2015).

деривати циметне киселине: о-кумарна, кафена, ферулна и хлорогена киселина (Barros и др., 2009; Heleno и др., 2011, Heleno и др., 2012; Yildiz и др., 2015).

флавоноиди: кверцетин, рутин, кризин (Ribeiro и др., 2006; Valentao и др., 2005; Yaltirak и др., 2009) и елагне киселине као представника танина (Ribeiro, и др. 2007).

Изоловане фенолне компоненте показују низ биолошких активности, као што су антиоксидантна, антимуtagenа, антиинфламаторна и антибактеријска (Albayrak и др., 2010; Surh и др., 2002). За 2,4-дихидроксибензоеву и протокатехинску киселину из гљива, доказана је антимикробна активност на Грам-позитивне и Грам-негативне бактеријске сојеве (Alves и др., 2013). Анализама екстраката (n-хексан:диетил етар, хлороформ:ацетон, MeOH)

2. Општи део

представника рода *Ganoderma* утврђено је да и ганомицини А и В, фенолна једињења испољавају антимикуробну активност (Mothana и др., 2003; Ofodile и др., 2005).

2.3.4.3. Полисахариди

Угљенохидратни састав гљива варира од 35-70 % с.м. гљиве (Chang и Miles, 2004; Mau и др., 2001). У овом саставу доминирају олиго- и полисахаридне компоненте (Bano и Rajarathnam, 1988). Полисахариди представљају структурно различиту класу биолошких макромолекула са широким спектром физичко-хемијских својстава (Paterson, 2006). Стога се они сматрају веома важним биоактивним супстанцама гљива, с обзиром да је доказана њихова употреба у различите терапијске сврхе као антитуморски, цитотоксични, хипогликемички, имуномодулирајући, антиоксидативни, као и антимикуробни агенси (Fan и др., 2006). Поред тритерпена, полисахариди чинећи једне од основних компоненти ћелијског зида (Wu и др., 2013) сматрају се најзначајнијим биоактивним компонентама гљива рода *Ganoderma* (Boh и др., 2007; Fan и др., 2012). Већина ових једињења припада класи глукана или хетероглукана, где су први изоловани из екстраката осамдесетих година XX века. До сада је изоловано преко 200 полисахарида пореклом из мицелије, спора, плодних тела као и екстрацелуларних ферментационих медијума *G. lucidum* „Lingzhi“ гљива (Huie и Di, 2004) при чему су најзаступљенији полисахариди из гљива рода *Ganoderma* они који припадају класи β -1-3 и β -1-6-D глукана (Amaral и др., 2008;). Веома је значајно антитуморско дејство поларних молекула високе молекулске масе: гликопротеина, хетерополисахарида, ганодерана А, В и С, али такође и неполарних полисахарида који у знатној мери показују антитуморски ефекат (Paterson, 2006).

Антимикуробна активност β -глукана полисахарида, као и њихово антибактеријско и антифунгално дејство базирано на активирању имуног одговора, па се стога се препоручује да се употребљавају у комбинацији са

2. Општи део

другим антибиотицима и имуностимулаторима у превенцији и лечењу инфективних обољења (Chen и Seviour, 2007).

2.3.4.4. Протеини

Протеински садржај код гљива је обично висок, али варира у зависности од различитих фактора као што су врста гљиве (генотип) и фазе њиховог развоја (Longvah и Deosthale, 1998). Садржај варира од 10-40 % (Barros и др., 2008; Rathee и др., 2012).

Протеини са антимикробном активношћу су чешће заступљени код биљних и животињских врста, док је њихово присуство у гљивама знатно ређе (Wang и Ng, 2006). Први подаци о инхибиторној активности пептида на микроорганизме, потиче још из давне 1942. године (Balls и др., 1942). Протеини који испољавају ову активност су чешће позитивно наелектрисани и поседују дисулфиду везу (Zhang и Lewis, 1997), а механизам њиховог деловања се остварује формирањем јонских канала на мембрани микроорганизама, али и компетитивним везивањем протеина микроорганизама за похисахаридне рецепторе ћелије домаћина (Cowan, 1999)

Из макрогљива је до сада изоловано неколико протеина и пептида чије је дејство претежно антифунгално са ограниченим спектром деловања (Karaman, 2009). Биоактивни протеини су изоловани из различитих врста гљива рода *Ganoderma*, и окарактерисани су различитим хроматографским/електрофоретским техникама (Paterson, 2006). Један од окарактерисаних протеина је и Ling Zhi-8 (LZ-8), изолован из мицелије *G. lucidum* (An и др., 2010). Наведени протеин је полипептид који се састоји од 110 аминокиселинских остатака са ацетилованим N-терминалним крајем и молекулском масом о око 12 kDa (Tanaka и др., 1989). Из *G. carpense* је изолован лектин, који испољава значајну антипролиферативну активност (Ngai и Ng, 2004). Битно је напоменути да се полисахариди, комплекси полисахарид-пептид комплекс као и фенолна једињења сматрају одговорним за антиоксидантну активност гљива рода *Ganoderma* (Paterson, 2006).

2. Општи део

До сада је из бројних биљних и животињских врста изолован велики број антифунгалних протеина, али је далеко мањи број њих изолован из гљива (Ngai и др., 2005; Ngai и Ng, 2003). Године 2006. је изолован *ганодермин*, антифунгални протеин из плодног тела гљиве *G. lucidum* који је структурно доста сличан имуноглобулину, у варијабилним регионима тешких ланаца (Wang и Ng, 2006). Доказана је његова антифунгална активност на: *Physalospora piricola*, *Botrytis cinerea* и *Fusarium oxysporum*. Такође је из гљиве *Pleurotus ostreatus* изолован и *плеурострин* (Ngai и др., 2005). Из *G. lucidum* су изоловани и *лектин* и *рибонуклеаза* (Tanaka и др., 1989; Wang и др., 2004).

2.4. АНТИИНФЛАМАТОРНА АКТИВНОСТ ГЉИВА

2.4.1. Инфламација и метаболизам арахидонске киселине

Одрбрана организма од патогена посредована је раним реакцијама урођеног и каснијом реакцијом адаптивног имуног одговора (Garcia-Lafuente, 2009):

Урођени (неспецифични) имуни одговор се активира непосредно по инфекцији, покреће одговор домаћина на инфицирани организам, даље побуђујући сигнал за адаптивни имуни одговор. Осим тога, има улогу у превенцији напада и оштећења ћелије домаћина током адаптивног одговора. Урођени имуни одговор активира се искључиво на инфекције микроорганизама и развија исти одговор приликом поновљене инфекције. Основне компоненте урођеног имуног одговора су физичке и хемијске баријере, фагоцитне ћелије и ћелије природне убице (NK – Natural Killer cells), протеини из крви, као што су протеини система комплемената, цитокини, итд.

Адаптивни (стечени, специфични) имуни одговор се покреће након што урођени имуни одговор препозна патогена. Њиме се покреће низ реакција специфичних за инвазивни организам, долази до адаптирања према инфекцији, чинећи дејства ћелија и медијатора много ефикаснијим. Адаптивни имуни одговор има „меморијски запис“ о сусрету са патогеном и

2. Општи део

након поновљеног сусрета реакција на исти патоген бива снажнија и бржа (Lesjak, 2011).

Наведени имуни одговори су у сталној интеракцији: неспецифични имунитет одређује врсту специфичног имуног одговора, док специфични даље усмерава и појачава неспецифични.

Инфламација представља неспецифични одговор имуног система на ћелијско оштећење и обично је праћена: црвенилом, болом, повећањем телесне температуре и отоком ткива. Инфламацијом се активира комплексни систем ензимске активности, који укључује: ослобађање медијатора инфламације, излучивање течности ван крвних судова, миграцију ћелија, оштећење и репарацију ткива. Године 1971. постављена је хипотеза да се механизам деловања нестероидних антиинфламаторних лекова заснива на инхибицији синтезе простагландина и од тада је метаболизам арахидонске киселине као прекурсора једињења медијатора инфламације, предмет интензивних истраживања (Deng и др., 2011; Garcia-Lafuente, 2009; Yoon и Baek, 2005).

Постоји низ медијатора инфламације, који у организму настају у току патолошких процеса, а такође су одговорни и за нормално одржавање хомеостазе. У групу фармаколошки значајних медијатора инфламације спадају: хистамин, еикозаноиди, леукотриени (LT), фактор агрегације тромбоцита (PAF), брадикинин (BK), азот-оксид (NO), неуропептиди и цитокини (Abbas и Lichtman, 2006; Nadad и Levy, 2012; Rang и др., 2004).

Традиционална медицина употребом различитих екстраката из биљака и гљива помаже лечењу разлитих поремећаја укључујући акутне и хроничне запаљенске процесе. Од активних компоненти из употребљених екстраката, флавоноидна једињења се издвајају поседовањем бројних биолошких својстава укључујући: антиканцерогена, антимикробна, антиинфламаторна, имуномодулирајућа и антикоагулантна својства (Garcia-Lafuente и др., 2009; Sandhar и др., 2011).

Арахидонска киселина (5, 8, 11, 14-еикосатетраен-киселина) је најчешћи заједнички метаболички прекурсор многих једињења важних за људски

2. Општи део

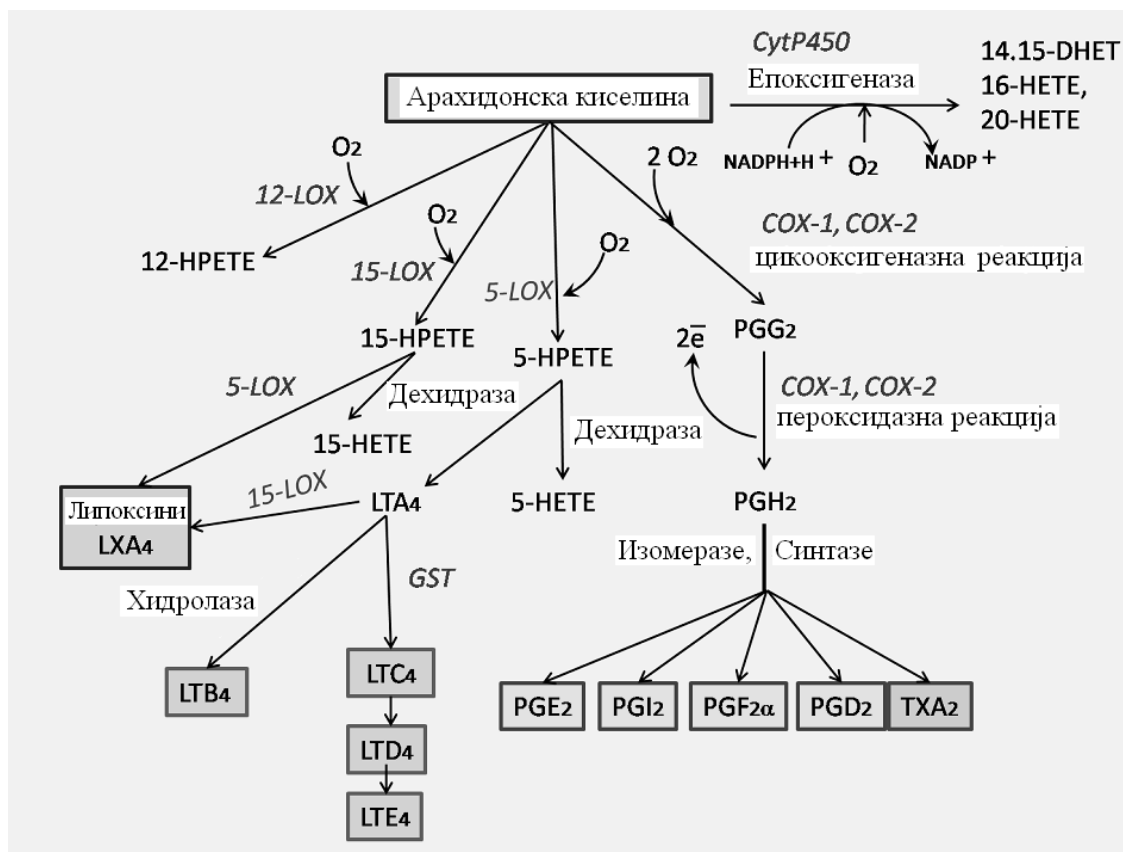
организам, а која учествују у процесу инфламације као што су: простагландини (PG), тромбосани (TX), леукотриени (LT) и липоксини (LX). Ова једињења се једним именом зову еикозаноиди (гр. eicosa-двадест) јер се обично синтетишу из незасићених масних киселина са 20 C-атома и три, четири или пет двоструких веза. Способност синтезе еикозаноида имају све ћелије људског организма осим еритроцита, а њихово присуство је доказано и у животињским и биљним ћелијама. Еикозаноиди су ткивни хормони који настају и делују локално. Синтетишу се и ослобађају из ћелије као одговор на стимулусе, интереагују са рецепторима на суседним ћелијама и брзо се инактивирају.

Арахидонска киселина се у људском организму ствара из линоленске киселине, али ипак већи значај припада њеном уносу преко хране, када се након усвајања у ћелију уграђује у фосфолипиде ћелијске мембране. Ослобађање арахидонске киселине из фосфолипида мембране представља први корак у синтези еикозаноида. Бројни физички, хемијски и хормонски стимулуси могу покренути ослобађање арахидонске киселине директно или индиректно активирајући једну од специфичних фосфолипаза. Из мембране ослобођена арахидонска киселина подлеже оксидацији под дејством ензимских система: епоксигеназног, липооксигеназног који доводи до стварања леукотриена и циклооксигеназног који доводи до стварања простагландина и тромбосана.

2.4.1.1. Метаболички путеви арахидонске киселине

Арахидонска киселина се метаболише преко циклооксигеназа, липооксигеназа и цитохрома P450 (CYP 450). Ови различити метаболички путеви воде до различитих метаболичких продуката као што су простагландини, простациклини, тромбосани или серија хидроксиеикозатетраеноичних, епоксиеикозатриеноичних и дихидрокси еикозатриеноичних киселина (*Слика 2.19.*).

2. Општи део



Слика 2.19. *Метаболички путеви арахидонске киселине (Липоксигеназе (LOX) и циклооксигеназе (COX) оксидују арахидонску киселину до липоксина (LX), леукотриена (LT), простагландина (PG) и тромбосана (TX). Реакције се одвијају преко реактивних интермедијерних једињења, хидроперокси- (HPETE) и хидрокси- (HETE) деривата еикозатетраенске киселине. Арахидонску киселину метаболишу и ензими цитохром P450 (CYTP450) ендоплазматског ретикулума)*

Главни метаболички путеви су циклооксигеназни и липооксигеназни, а цитохром P450 се укључује кроз исхемијско-реперфузионе процесе (срце) и проинфламаторне процесе.

Циклооксигеназни пут је пут који је одговоран за синтезу простаноида (простагландина и тромбосана). Синтеза простаноида укључује потрошњу два молекула O₂ и катализована је простагландин H синтазом (PGHS или циклооксигеназа, COX), која поседује активност два ензима: циклооксигеназе и пероксидазе. Код циклооксигеназе постоје два изоензимска облика: COX-1 и COX-2, који су производи гена локализованих на различитим хромозомима, са

2. Општи део

различитом ткивном локализацијом, специфичностима супстрата и функцијом (Mayes и Botham, 2003).

Нестероидни антиинфламаторни лекови (NSAL): делују антиинфламаторно, аналгетски и антипиретски, најчешће су употребљавани лекови уопште, јер се поред лечења реуматоидних оболења примењују у бројним другим гранама медицине (гинекологија, офтамологија, пулмологија, стоматологија и др.). Према селективности инхибиције ензима циклооксигеназе се деле на неселективне COX инхибиторе и селективне COX-2 инхибиторе. Један од NSAL-а је и аспирин, које је снажан иреверзибилни инхибитор COX-1, и због његовог механизма деловања, аспирин не би требао бити употребљаван као лек код лечења хроничних инфламаторних стања, али је ипак због свог инхибиторног потенцијала на COX-1, у малим дозама (75 mg), он изузетно користан у лечењу кардиоваскуларних оболења пошто инхибира агрегацију тромбоцита.

Многи природни производи (куркумин, омега-3-масне киселине, ресвератрол, флавоноиди и рутин) учествују у смањењу нивоа инфламације преко инхибирања циклооксигеназне активности. Различити флавоноиди укључујући: кверцетин, апигенин, катехин делују антиинфламаторно инхибицијом COX-2 ензима (Тарас и др., 2008).

Липооксигеназним путем метаболизма арахидонске киселине синтетише се велики број продуката одговорних за настајање низа алергијских и запаљенских реакција, као и аутоимуних оболења. Липооксигеназе (LOX) су ензими који припадају групи диоксигеназа, које катализују стереоспецифичну адицију молекулског кисеоника у полинезасићене масне киселине које имају (1Z, 4Z)-пента-1,4-диенски систем.

Постоји више липооксигеназа које учествују у метаболизму арахидонске киселине, од којих свака носи назив n-липооксигеназа, где n представља број C атома који се оксидује (Curtis-Prior, 2004).

У липооксигеназе заступљене у ћелијама сисара спадају:

5-LOX врши адицију O₂ на C₅ арахидонске киселине

12-LOX метаболизује арахидонску киселину у 12-HPETE

15-LOX катализује стварање 15- HPETE

2. Општи део

Липоксини су група коњугованих тетраена насталих у леукоцитима, комбинованим деловањем више од једне липооксигеназе, док су леукотриени фамилија коњугованих триена насталих из еикозаноидних киселина у леукоцитима, ћелијама мастоцита и макрофага липооксигеназним путем (Mayes и Botham, 2003). С обзиром да леукотриени настају сложеним каскадним механизмом уз присуство великог броја различитих ензима, њихова инхибиција би била могућа инхибирањем било ког ензима који учествује у њиховој биосинтези. До данас је извршена инхибиција 5-LOX-а и FLAP-а, или блокадом леукотриенских рецептора. Неки од LOX и COX инхибитора су и: камферол, кверцетин, мирицетин, фисетин (Taras и др., 2008). Бројни природни производи (бајкалеин, ескулетин, госипин, кверцетин и др.) показују 12-LOX инхибиторну активност (Mayes и Botham, 2003) (Halliwell и Gutteridge, 2008) (Taras и др., 2008).

2.4.2. Гљиве као антиинфламаторни агенси

Инфламаторни одговор може бити индукован различитим агенсима, резултујући различитим типовима оштећења ткива. Рецептори који су повезани са регулацијом запаљенских процеса и ангиогенезе су пероксизом-пролифератор-активираним рецепторима (PPAR), који регулишу експресију многих гена, укључујући COX-2, азот моноксид синтазу, као и васкуларно ендотелијални фактор раста (VEGF), између осталог. Запаљенски процеси такође пролонгирају нивое оштећења ћелија ROS-ом, на тај начин узрокујући накупљање оксидативног оштећења у ткивима, с обзиром да су прооксидантна једињења повезана са имуним одговором против патогена (Gomes Castro и др., 2013).

Постоје бројни записи о антиинфламаторном потенцијалу екстраката различитих врста гљива (Joseph и др., 2009; Queiroz и др., 2010; Rathee и др., 2012; Yoon и др., 2013), али и гљива рода *Ganoderma* (Hasnat и др., 2015; Liu и др., 2015;). У великој мери се фенолна и флавоноидна једињења сматрају

2. Општи део

компонентама које у значајној мери испољавају антиинфламаторну активност продукцијом проинфламаторних молекула као што су:

тумор некротички фактор α (TNF- α) и
азот моноксид (NO) (Diaz и др., 2012).

Неколико механизма објашњавају антиинфламаторну активност флавоноида укључујући: антиоксидативну активност, регулацију ћелијске активности ћелијама повезаним са запаљенским процесима, укључујући и модулацију активности ензима који учествују у метаболизму арахидонске киселине (PLA₂, COX, липооксигеназе), азот моноксид синтазе као и модулацију продукције проинфламаторних молекула (Garcia-Lafuente и др., 2009).

У данашње време се у највећој мери као антиинфламаторни агенси користе NSAL, чија примена је праћена бројним споредним ефектима, па се све више ради на проналаску антиинфламаторних агенаса природног порекла који би се могли употребљавати са доста нижим уделом споредних ефеката (Chen, 2001). Kim и сар. су код *G. lucidum* идентификовали присуство следећих ганодеричних киселина: ганодерична киселина А, В, G и H као потенцијалних антиинфламаторних агенаса (Kim и др., 1999). Такође се секундарни метаболити (алкалоиди, антрахинони и стероиди) гљива сматрају потенцијалним компонентама антиинфламаторних и аналгетичких лекова на бази гљива (Ede и др., 2012). У поређењу терпеноидних и стероидних компоненти гљива *G. lucidum* и *G. tsugae*, терпеноиди се сматрају активнијим антиинфламаторним агенсима (Ko и др., 2008). Антиинфламаторна својства супстанци природног порекла имају могу олакшати обољења као што су: артритис, HIV и др. (Sanodiya и др., 2009).

2.5. АНТИПРОЛИФЕРАТИВНА АКТИВНОСТ ГЉИВА

Гајење ћелија у *in vitro* условима присутно је у научно-експерименталном раду већ скоро цели век. С тим у вези, ћелијске културе данас налазе примену у многим научним лабораторијама, а нарочито у биолошким и медицинским испитивањима (Pavlović, 1996).

2. Општи део

Цитотоксичност представља токсичност према ћелијама, а карактеристика је различитих хемијских агенаса, у које спадају и ћелије имуног система и различити природни токсини (змијски отрови или токсини пореклом из паука). Излагање ћелија цитотоксичним једињењима може условити различите процесе (некроза ћелијске мембране, лизирање и ћелијска смрт). Такође може доћи до програмиране ћелијске смрти (апоптоза), карактерисане престанком раста и деобе ћелија, што је условљено бројним процесима како на ћелијском, тако на молекуларном нивоу. Ћелије које у *in vitro* условима подлежу некрози услед недостатка времена или енергије, нису у могућности да покрену механизам апоптозе (Karaman, 2009).

2.5.1. Ћелијски системи

У тестовима цитотоксичности користи се велики број различитих ћелијских линија. Пре одабира одређеног ћелијског система у *in vitro* експерименту, неопходно је узети у обзир карактеристике одабране линије, као и дефинисати оптималне услове раста за ту ћелијску линију.

Примарне ћелијске линије припремају се из ткива или органа узетих директно из организма. Основна ћелијска суспензија се добија механичком дисперзијом ћелија или хемијским путем коришћењем ензима. Ћелије се суспендују у медијуму за гајење и инкубирају минимум 24h. У том периоду ћелије се могу прилепити на површину суда (адхерентни тип раста) или расту у суспензији као појединачне или групе ћелија (неадхерентни тип раста) у зависности од карактеристика узетог ткива. Већина нормалних ћелија се прилепи за супстрат, шири и расте у монослоју. Линије добијене из туморских ћелија и измењене ћелијске линије пролиферишу у монослоју или суспензији (Stark и др., 1986).

Примарне ћелијске културе се веома тешко могу репродуковати пошто вијабилност и раст ћелија варирају у зависности од бројних фактора (нпр. хормонског статуса, старости организма из којег су добијене: ембрион, фетус, одрасла јединка) (Stark и др., 1986). У почетку, примарне ћелијске културе су

2. Општи део

добро издиференциране и имају многе од сложених биохемијских функција ткива из кога су изоловане. Међутим, ћелије у примарној култури имају ограничен животни век. Временом, постају хомогене, мање издиференциране и почињу да губе специфичне ћелијске функције и метаболички капацитет. Стога се у *in vitro* истраживањима користе трајне ћелијске линије које расту уједначено у култури.

Трајне ћелијске линије се изводе из примарне културе у форми диплоидне, континуиране или клониране линије која може да расте у суспензији или као монослој.

Најмање 75 % популације ћелија у диплоидној ћелијској линији садржи исти, нормалан комплемент генетског материјала као и организам из којег је изведена и обично "претрпи" 40 до 50 деоба у култури.

Континуиране ћелијске линије су трајне ћелијске линије које су изведене из туморских ћелија, било непосредно, било индукцијом трансформације примарне или диплоидне ћелијске линије, резултујући бесмртношћу добијене линије. Трансформација се може индуковати вирусима, хемијским мутагенима или озрачивањем, што доводи до настанка наследних морфолошких промена које се преносе из генерације у генерацију код свих ћелијских потомака. Трансформисане ћелије су сличне туморским ћелијама по томе што имају измењену морфологију и недостатак контактне инхибиције, што има за последицу неконтролисану ћелијску пролиферацију у култури (Stark и др., 1986). Свака трансформисана ћелијска линија није безусловно и малигна. Малигно трансформисана ћелијска линија има способност да континуирано расте у култури, а убризгана у животињу способна је да створи тумор у експерименталним животињама. У последњих тридесет година установљен је велики број континуираних ћелијских линија које се користе у *in vitro* истраживањима (Stark и др., 1986).

Клониране ћелијске линије се изводе из појединачних ћелија примарне, диплоидне или континуиране линије у фази митозе, формирајући при томе генетички хомогену сублинију названу ћелијска врста.

2.5.2. Тестови одређивања цитотоксичности

Код одређивања цитотоксичности *in vitro* могу да се одреде различити параметри: ћелијска пролиферација, ћелијска смрт, метаболизам и морфологија ћелије. Методе за одређивање цитотоксичности морају бити специфичне и добро дефинисане, а могу бити квалитативне и квантитативне. Квантитативни резултати испитивања имају предност пошто се могу објективно измерити, а квалитативни подаци пружају важне информације при евалуацији цитотоксичности одређене супстанце. Ћелијска пролиферација (смањење броја ћелија настало услед инхибиције пролиферације или лизе ћелија) се може проценити: микроскопски, коришћењем хемоцитометра или електронског бројача. Мерењем ћелијске пролиферације може да се одреди ниво токсичности третиране супстанце. СуQUANT тест је базиран на флуоресценцији, где се помоћу флуориметра квантификују преживеле флуоресцентне ћелије чији је DNK обојен (Watson и др., 2004).

Тестови који се заснивају на одређивању степена трансформације супстрата у обојени производ или апсорпцијом боје од стране појединих једињења у ћелији, где је интензитет боје директно пропорционалан броју присутних ћелија

Тестови који се заснивају на деградацији ћелијске мембране и изливању садржаја ћелије у ком су присутни ензими чија активност се може одредити додатком одређених супстрата.

Тестови цитотоксичности који користе специјализоване ћелије су нарочито корисни када је већ потврђена *in vivo* токсичност неке супстанце, те се истраживања на специјализованим ћелијским културама врше у циљу расветљавања механизма испољавања токсичних ефеката на циљно ткиво (Ekwall и др., 1990).

2.5.2.1. МТТ тест ћелијске пролиферације

МТТ тест је *in vitro* тест за мерење ћелијске пролиферације, ћелијске вијабилности, односно цитотоксичности испитиваних узорака (Mosmann,

2. Општи део

1983). Принцип методе се заснива на редукцији хидрофилне тетразолијумове соли [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид, МТТ], која се конвертује у нерастворљиве љубичасте кристале формазана цепањем тетразолијумског прстена у присуству митохондријалног ензима сукцинат дехидрогеназе. С обзиром да се ова реакција може догодити само у метаболички активним ћелијама, количина створеног формазана је у корелацији са бројем живих и метаболички активних ћелија. Количина створеног формазана, мерена апсорбанцом спектрофотометријски, директно је пропорционална броју живих ћелија у култури и на основу њене вредности одређује се проценат цитотоксичности. Валидност МТТ теста је проверавана на различитим ћелијским линијама. Скорији докази сугеришу да до редукције МТТ долази посредством NADH или NADPH унутар ћелија и ван митохондрија. Даље модификације иницијалног протокола који је описао Mossmann (1983) предложене су у циљу побољшања поновљивости и осетљивости теста (Fotakis и Timbarell, 2006). У поређењу са LDH тестом показано је да LDH тест прати ћелијску смрт (губитак мембранског интегритета), која се јавља неколико сати након оне која се посматра МТТ тестом (губитак метаболичке активности) (Ossola и др., 2008).

МТТ тест има широку примену у процени и мерењу цитотоксичног / антипролиферативног ефекта потенцијалних антитуморских агенаса (Ekwall, 1981; Wilson, 1989).

2.5.3. Гљиве као антипролиферативни агенси

Популарност додатака исхрани као алтернативне терапије код лечења рака је у знатном порасту у новије време (Shimizu и др., 2009; Slivova и др., 2004). Бројне епидемиолошке студије сугеришу да би употреба гљива, односно препарата на бази гљива у великој мери могла помоћи у превенцији и лечењу гастричног, гастроинтестиналног и канцера дојке док су антиканцерогена својства гљива првенствено асоцирана индиректно стимулацијом имуног

2. Општи део

система полисахаридима (првенствено β -гљукани) и директно ланостанским типом тритерпена на канцер ћелије (Sliva и др., 2012).

С обзиром да су гљиве рода *Ganoderma*, а посебно *G. lucidum* познати додаци исхрани тзв. дијететски суплементи, појашњење механизма њиховог потенцијалног антипролиферативног, односно антиканцерогеног деловања би дало и научно оправдање њене употребе код пацијената оболелих од рака, што се у неким земљама Далеког Истока већ користи (Shimizu и др., 2009). Доказано је да гљива *G. lucidum* делује на инхибицију адхезије, миграције и инвазије MCF-7 и MDA-MB-231 ћелија рака дојке (Hu и др., 2002; Као и др., 2013; Slivova и др., 2004).

Широм света, карцином дојке је водећи тип канцера код жена са чак 25 % удела код жена (World Cancer Report, 2014). У 2011. години је регистровано 230 480 нових случајева инвазивног канцера дојке код жена и 2140 код мушкараца, као и 57 650 случајева не инвазивног (*in situ*) канцера. Карцином дојке се сматра другим водећим узроком смртности код обољења канцера у САД-у (Bowcock, 1999). Карцином дојке најчешће прелази из неметастатичке форме под одговарајућом терапијом у метастатски облик који обично не одговара на прописану терапију (Slivova и др., 2004). Данас се бројне биљке, гљиве и њихови метаболити користе као потенцијални агенси у циљу смањења нежељених последица хемотерапије која се користи код рака дојке (Deeralakshmi и др., 2013; Hu и др., 2002; Slivova и др., 2004). Антипролиферативни ефекти гљива, на ћелијским линијама хуманог порекла, обично су приписани полисахаридним и терпеноидним једињењима (Као и др., 2013). Полисахариди припадају β -гљуканима и испољавају антитуморске ефекте индиректно, повећањем ћелијског имунитета (Kim и др., 1999; Roupas и др., 2012). Епидемиолошке студије код жена које болују од канцера дојке потврђују да је дневни унос гљива (унос гљива је мерен преко упитника фреквенције унесене хране код жена старости од 30 до 65 година оболелих од карцинома дојке) обрнуто сразмеран са ризиком од рака дојке и висока инверзна асоцијација је пронађена у постменопаузалном, за разлику од пременопаузалног периода код жена (Hong и др., 2008). Потенцијални

2. Општи део

механизам може бити узрокован инхибицијом ароматазне активности описане како у *in vitro* тестовима, тако и код испитивања *in vivo* на животињама (Chen и др., 2006). Студије на животињским моделима и хуманим ћелијским линијама (MCF-7 и MDA-MB-231) обезбеђују увид у могуће механизме деловања активних компоненти гљива на рак дојке, и неколико студија је показало да екстракти гљива делују антипролиферативно на ћелијске линије рака дојке (MCF-7 и MDA-MB-231) без утицаја на пролиферацију здравих ћелијских линија (Hu и др., 2002; Liu и др., 2009; Shimizu и др., 2009; Slivova и др., 2004). Испитивања антипролиферативне активности *in vitro* H₂O екстраката гљива: *Coprinus comatus* и *Flammulina velutipes* доказала су инхибицију раста како естроген-позитивних (ER+) тако и естроген-негативних (ER-) ћелија рака дојке MCF-7 ћелијске линије (Roupas и др., 2012). Генерално се тритерпеноидна и полисахаридна једињења сматрају најактивнијим антипролиферативним компонентама код екстраката гљива рода *Ganoderma*, које су у великој мери испитиване последњих деценија (Hu и др., 2002; Liu и др., 2009; Shimizu и др., 2009; Sliva и др., 2012; Slivova и др., 2004).

Бројне подврсте тритерпенских једињења (изоловано око 140 врста) су изоловане из екстраката *G. lucidum* показујући широк спектар биолошких активности укључујући и: антиинфламаторну, антитуморску и хиполипидемичну (Hu и др., 2002; Liu и др., 2009; Shimizu и др., 2009). Ганодеричне киселине Т, D и F изоловане из *G. lucidum* и других врста рода *Ganoderma* показују значајну антиканцерогену активност доказану у *in vitro* и *in vivo* студијама на следећим ћелијским линијама: HeLa, Lewis-ове ћелије карцинома (LLC), Meth-A, Sarcoma-180 као и T-47D ћелијске (Као и др., 2013).

Полисахаридна једињења која су заступљена код гљива рода *Ganoderma* спадају у групу хетерополисахарида и антиканцерогена активност је карактеристична за β-D-гlukanе који садрже (1-3)-, (1-4)- и (1-6)-β-D везе за које је карактеристична јача антитуморска активност и боља апсорпција у односу на друге полисахариде код *G. lucidum* (Kim и др., 1999; Slivova и др., 2004; Sone и др., 1985). На **Слици 2.20.** су приказани потенцијални антиканцерогени ефекти кроз три механизма деловања гљиве *G. lucidum*.

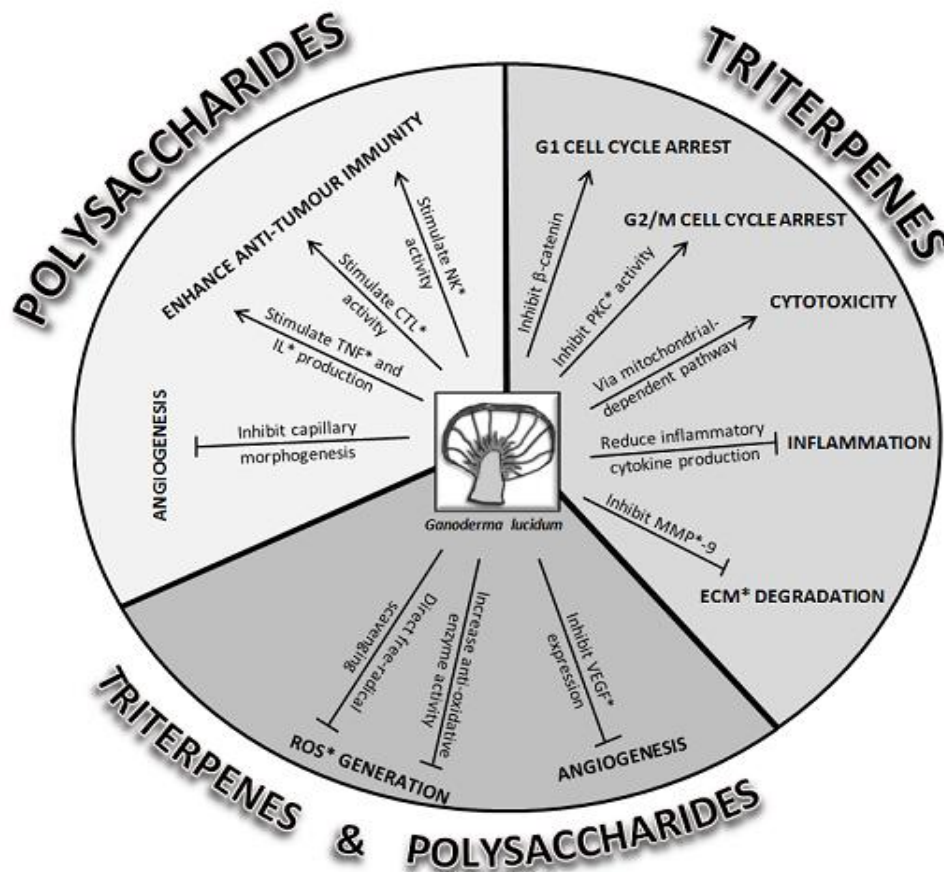
2. Општи део

Доказани су и антипролиферативни ефекти екстракта врста *G. lucidum* и *G. sinense* на следеће ћелијске линије:

- рака дојке (MCF-7 и MDA-MB-231),
- хепатома (HepG2) и
- мијелоидне леукемије (HL-60),

где је за *G. sinense* доказан антипролиферативни потенцијал стеролних једињења, типа ергостерола (Liu и др., 2009).

За четири гљиве рода *Ganoderma*: *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* доказана је недавно и антипролиферативна активност на SCLC (small-cell lung cancer) ћелије (Sadava и др., 2009)

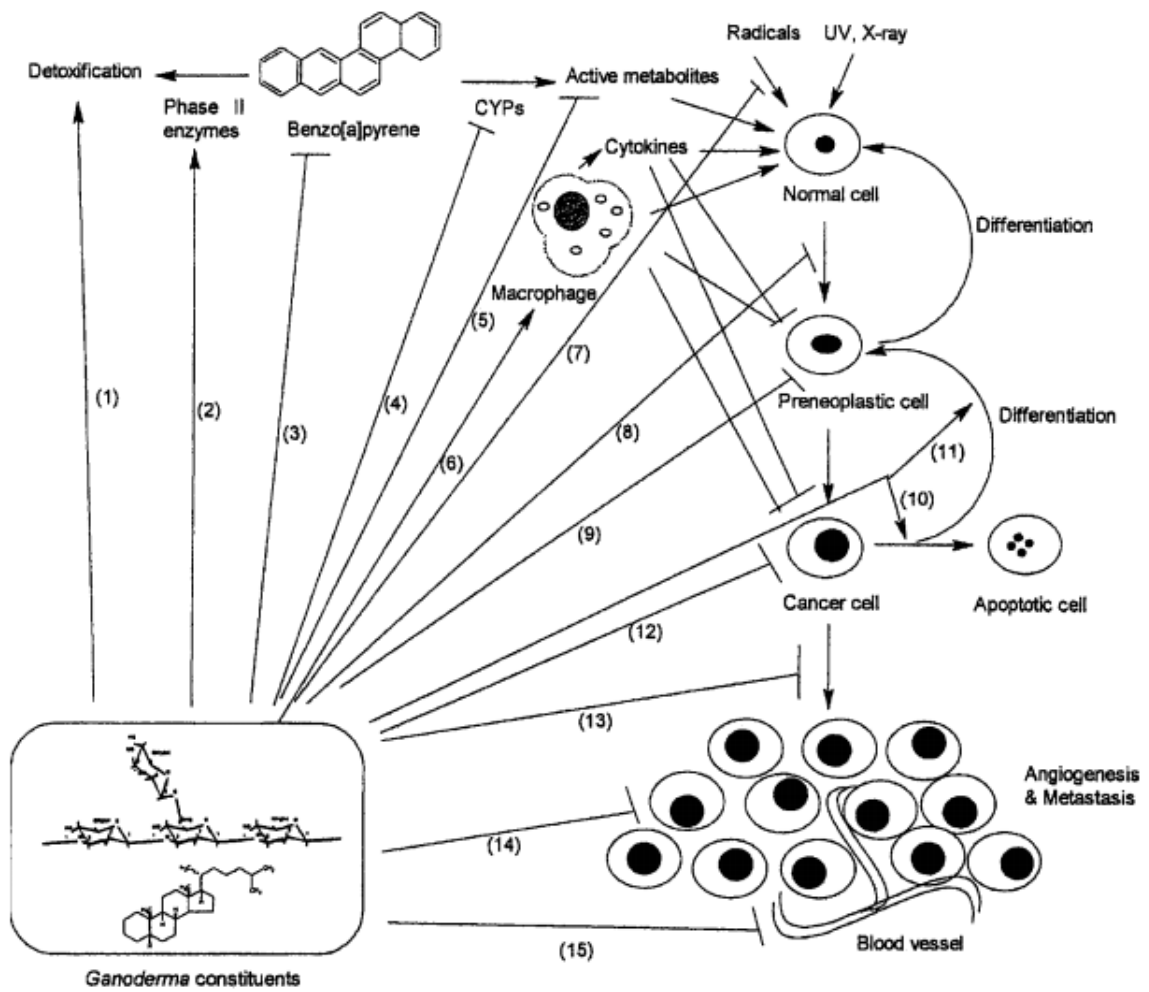


Слика 2.20. Потенцијални антиканцерогени путеви гљиве *G. lucidum* узроковани једињењима типа терпена и полисахарида (CTL- цитотоксични Т-лимфоцити; ECM-екстрацелуларни матрикс; IL-интерлеукин; MMP-металопротеаза; NK- Natural killer cells (ћелије природне убице); PKC-протеин киназа C; ROS: реактивне кисеоничне врсте; TNF-туморни фактор некрозе; VEGF-васкуларни ендотелијални фактор раста) (Као и др., 2013)

2. Општи део

Поред тритерпеноидних једињења и полисахарида и лектини могу бити потенцијални антипролиферативни агенси. Широко су распрострањени код животиња, биљака, бактерија, вируса и гљива. Већина биљних лектина припада групи складишних протеина, са могућом улогом у заштити од инсеката и гљивица (Ngai и Ng, 2004). Лектини пореклом из гљива, укључујући оне из *Agaricus bisporus*, *Boletus satanus*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Tricholoma mongolicum* и *Volvariella volvacea* показују имуномодулаторну и/или антитуморску/антипролиферативну активност (Ngai и Ng, 2004). Што се тиче лектина изолованих из *Ganoderma* врста, структурно су доста слични LZ имуномодулирајућем протеину, који је изолован из *G. lucidum* за разлику од *thermophilous ganoderma*, новог изолованог лектина из врсте *G. capense*, који се доста разликује у односу на претходно изоловане и окарактерисане лектине из гљиве сродне врсте његовој.

2. Општи део



Слика 2.21. Потенцијални механизми антитуморских ефеката *G. lucidum* (Wasser, 2005)

2.6. АНТИДИЈАБЕТОГЕНА АКТИВНОСТ ГЉИВА

2.6.1. Шећерна болест (*Diabetes mellitus*)

Шећерна болест (*Diabetes mellitus*, дијабетес) представља хронично обољење са бројним последицама и компликацијама по здравље милиона људи широм света и постаје значајно обољење у многим земљама (Wild и др., 2004). Дијабетес, је група метаболичких обољења која се одликује повећаним нивоом глукозе у крви као резултат дисбаланса инсулина (Џаро, 2013). Према подацима, 2000. године је код 151 милиона људи дијагностификована ова болест, а с обзиром да је пораст оболелих годишње приближно 6 %, сматра се да је забележени број оболелих 2010. године био 221 милион оболелих, док би тај број до 2025. године могао бити чак 324 милиона (Zimmet и др., 2001). Број људи оболелих од ове болести је у порасту због раста популације, старења, урбанизације, али и повећања преваленције гојазности и недостатка физичке активности (Wild и др., 2004). Инсулин и орални хипогликемички агенси (бигуаниди, сулфониуреа и тиазолидинедиони) су најчешће употребљавани антидијабетогени агенси код контроле дијабетеса, односно хипергликемије али такође битно је напоменути да се могу јавити бројни нежељени, споредни ефекти (Mohamed и др., 2007; Zhang и др., 2003).

Компликације дијабетеса су ретинопатија, неуропатија и бубрежна дисфункција уз мноштво патолошких промена. Према подацима Светске здравствене организације (WHO, СЗО) из 2011, шећерна болест је одговорна за око 2,2 % смртних исхода узрокованих болешћу међу људима. Главна потешкоћа код дијабетеса јесте да дуг временски период бива недијагностификован, а да пацијент већ поседује озбиљна иререверзибилна оштећења кардиоваскуларног система. Дакле, рана дијагноза и здрав стил живота су кључни у смањењу ризика од настанка шећерне болести.

Основа настанка дијабетеса је та да панкреас није у могућности да продукује довољну количину инсулина али и немогућност ћелија да ефикасно реагују на дејство инсулина. Хипергликемија је прекомерни ниво глукозе у крви

2. Општи део

(>10 mmol/L) и најчешћи је симптом неконтролисане шећерне болести. Када је ниво глукозе у крви 15-20 mmol/L тада постају уочљиви симптоми, и долази до озбиљних оштећења нарочито нервног и кардиоваскуларног система.

Постоје три типа дијабетеса:

Тип 1 - Инсулин зависни дијабетес мелитус: настаје као последица немогућности тела да ствара инсулин, и карактерише се губитком инсулин продукујућих β -ћелија Лангерхансових острваца панкреаса са инсулинском дефицијенцијом. Чешће је заступљен код деце због чега се још за овај тип наилази и на назив „јувенилни дијабетес“.

Тип 2 - Инсулин независни дијабетес мелитус: је најчешћи тип дијабетеса, где постоји резистенција на инсулин и самим тим ћелија не може да користи инсулин, а понекад је ово стање удружено са апсолутним недостатком инсулина. Најчешће се јавља у средњој или старијој животној доби, али може да се уочи и код адолесцената и млађих особа проузрокован дечијом гојазности и недостатком физичке активности. Али се такође може код појединих пацијената појавити комбинација ова два типа дијабетеса код деце и млађих адолесцената, и најчешће се помиње под термином дупли или хибридни дијабетес. Ефективни третман код овог типа дијабетеса је инхибиција или одлагање дигестије угљених хидрата.

Тип 3 - Гестациони дијабетес: јавља се код трудних жена које никад нису имале дијабетес и карактерише се повећањем вредности глукозе у крви током трудноће. Сличан је типу 2 дијабетеса, и може се у потпуности контролисати уз адекватну терапију, и углавном се након порођаја у највећем броју у потпуности повлачи.

2.6.2. Медицинске гљиве и шећерна болест

Бројни хемијски и биохемијски антидијабетогени агенси (инсулметформин, розиглитазон, троглитазон и толбутамид) могу имати озбиљне споредне ефекте уз немогућност да допринесу побољшању код компликација ове болести, и из тог разлога данас све више привлаче пажњу антидијабетогени

2. Општи део

препарати природног порекла (Gupta и Mal, 2005). У данашњим, новијим истраживањима доста се ради на моделирању хемијски изазваног дијабетеса препаратима као што су: алоксан и стрептозоцин, где препарати и производи природног порекла показују у великој мери протективни ефекат у погледу очуваности β -ћелија панкреаса, где може чак доћи и до прорегенераторног ефекта ових природних саплемената (Џаро, 2013). Горе поменути алоксан је брз и потентан изазивач дијабетеса код експерименталних животиња услед штетног деловања на инсулин-продукујуће β -ћелије панкреаса, где као последица хипергликемије долази до продукције ROS-а који може довести до оштећења панкреаса (Zhou и др., 2003). Полисахариди гљиве *G. lucidum* делују превентивно као „скевенџери“ насталих слободно-радикалских форми (You и Lin, 2002).

Велики утицај на развој шећерне болести има исхрана и начин живота, тако увођењем исхране која је обогаћена воћем и поврћем, али и гљивама долази до благотворнијих ефеката на дијабетеса (Gallagher и др., 2003; Rouras и др., 2012; Zhang и др., 2003). Дијететски режим исхране који укључује високе вредности нискокалоричних дневних obroка може да смањи ризик од настанка типа 2 дијабетеса и у корелацији је са смањењем хипертензије, метаболичког синдрома и губитка когнитивних функција у средњој животној доби (Hobbs, 2002). Ови ефекти могу бити посредовани полисахаридима (α -и β -гљукани) директним утицајем на излучивање инсулина из β -ћелија панкреаса (Rouras и др., 2012), али и лектинима и тритерпеноидним једињењима (Rathee и др., 2012). Исхрана код дијабетичара која укључује гљиве је веома важна из тог разлога што су гљиве богате протеинима, минералима и витамима, а поседују веома низак садржај масти, холестерола и угљених хидрата (De Silva и др., 2012).

За H_2O екстракте различитих врста гљива (*G. atrum*, *G. lucidum*, *Pleurotus pulmonarius*, и др.) је доказано да поседују хипогликемички и анти-хипергликемички ефекат код алоксан- и стрептозоцин-индукујућег дијабетеса (Cheng и др., 2013; Rouras и др., 2012; Zhu и др., 2013). Поред полисахарида и тритерпеноидна једињења (Ганодерол Б) се сматрају

2. Општи део

антидијабетогеним агенсима (тип 2 дијабетеса) преко инхибиције ензима α -глукозидазе спречавањем дигестије угљених хидрата (Fatmawati и др., 2011).

Доследност између ефеката екстраката гљива код животињских модела дијабетеса и прелиминарни подаци добијени тестирањем на људима, показују да долази до смањења глукозе у плазми, крвног притиска, концентрације холестерола и триглицерида, чиме су поткрепљени докази антидијабетогених ефеката на гљивама и њиховим екстрактима (Roupas и др., 2012).

3.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ

ДЕО



3. Експериментални део

3.1. САКУПЉАЊЕ И ПРИПРЕМА ЕКСТРАКАТА ГЉИВА

Списак макрогљива анализираних у овом раду дат је у **Табели 3.1.**

Гљиве су сакупљене на једном од локалитета Моровићке шуме и са два локалитета града Новог Сада (Новосадски кеј и Лиман) током периода 2010-2011. Материјал је прегледан и детерминисан на Департману за биологију и екологију ПМФ-а у Новом Саду под супервизијом др Маје Караман, ванр. проф. Ваучер врсте су идентификоване класичним поступцима таксономске анализе према миколошким карактерима (плодно тело, пресек хименофора, карактеристике спора) и депоноване у миколошкој збирци на Катедри за микробиологију Департмана за биологију и екологију под следећим бројевима: 12-00714, 12-00715, 12-00723 и 12-00722.

Табела 3.1. Списак гљива анализираних у овом раду

Име врсте	Фамилија	Локалитет	Супстрат	Датум
<i>G. applanatum</i> (Curt.:Fr.) Karst	<i>Ganodermataceae</i>	Моровићке шуме	храст	2011
<i>G. lucidum</i> (W. Curt.:Fr.) P. Karst.	<i>Ganodermataceae</i>	Моровићке шуме	храст	2011
<i>G. pfeifferi</i> (Bres. 1889)	<i>Ganodermataceae</i>	Бегечка јама	врба	2011
<i>G. resinaceum</i> (Boud. in Pat., Bull.1889)	<i>Ganodermataceae</i>	Нови Сад, Лиман, Факултет	врба	2011

3.1.1. Припрема EtOH екстраката гљива:

Припрема EtOH екстраката све четири испитиване врсте гљива рода *Ganoderma* рађена је по следећој процедури: плодна тела гљива су очишћена, осушена на ваздуху и самлевена. Одмерено је по 30 g самлевеног материјала, преливено са 300 ml 96 % EtOH (1:10) и мацерирано 72h на собној температури на тресилици (Sekljalnik S400 W Chopper, Gorenje). Након цеђења преко вате и филтер папира и упаравања на ротационом вакуум упаривачу (Büchi R-210, Switzerland), суви остатак сировог екстракта растворен је у 96 % EtOH, при чему су припремљени основни раствори концентрација 50, 100, 200 или 300 mg/mL. Основни раствори су чувани у замрзивачу у стакленим бочицама на

3. Експериментални део

температури од -20 °C. Од њих је касније припремљена серија разблажења анализирана у експериментима:

растварањем сувог остатка у dH₂O направљени су раствори концентрације 50 mg/mL, који су анализирани код испитивања антидијабетогене активности

растварањем сувог остатка у 96 % EtOH направљени су раствори концентрација 50 и 100 mg/mL, који су анализирани за испитивање антиоксидантног потенцијала

растварањем сувог остатка у диметил сулфоксиду (DMSO, Fluka Chimie) направљени су раствори концентрација 50, 100, 300 и 900 mg/mL који су анализирани код испитивања антиинфламаторног и антипролиферативног потенцијала

растварањем сувог остатка у 50 % EtOH направљени су раствори концентрација 2,5 и 25 mg/mL који су анализирани за одређивање квантитативног састава применом LC-MS/MS технике (течна хроматографија са тандемским масеним детектором)

3.1.2. Припрема H₂O екстраката гљива:

Припрема H₂O екстраката испитиваних гљива урађена је по следећој процедури: плодна тела гљива су очишћена, осушена на ваздуху и самлевена. Одмерено је по 30 g самлевоног материјала, преливено са 300 ml кључале воде и инкубирано на воденом купатилу (Elektromedicine, Ljubljana, Slovenia) на температури од 80 °C у периоду од 1h. Након цеђења преко вате и филтер папира, добијени екстракти су пребачени у стаклене теглице и замрзнути -20 °C. Потом су залеђени узорци лиофилизирани на температури од -70 °C (Christ Alpha 1-2 LD Freeze Dryer, Switzerland), у циљу добијања најбоље очуваног сувог остатка који је потом растворен у неколико система, при чему су припремљени основни раствори концентрација 50, 100, 200 или 300 mg/mL. Основни раствори су чувани у замрзивачу у стакленим бочицама на температури од -20 °C. Од њих је касније направљена серија разблажења анализирана у експериментима:

3. Експериментални део

растварањем сувог остатка у dH₂O направљени су раствори концентрације 50, 100 и 300 mg/mL, који су анализирани код испитивања антидијабетогене и антиоксидантне активности

растварањем сувог остатка у диметил сулфоксиду (DMSO) направљени су раствори концентрација 50, 100 и 300 mg/mL који су потом анализирани код антипролиферативног потенцијала

растварањем сувог остатка у dH₂O направљени су раствори концентрација 2,5 и 25 mg/mL који су потом кориштени за одређивање квантитативног састава применом LC-MS/MS технике (течна хроматографија са тандемским масеним детектором)

3.1.3. Припрема хлороформских екстраката гљива:

Припрема хлороформских (CHCl₃) екстраката гљива рода *Ganoderma* рађена је по истој процедури као што је описано код припреме EtOH екстраката: плодна тела гљива су очишћена, осушена на ваздуху и самлевена. Одмерено је по 30 g самлевоног материјала, преливено са 300 ml хлороформа, добро затворено и мацерирано 72h на собној температури (Sekljalnik S400 W Chopper, Gorenje). Након цеђења преко вате и филтер папира и упаравања на ротационом вакуум упаривачу (Büchi R-210, Switzerland) суви остатак сировог екстракта растворен је DMSO-у, при чему су припремљени основни раствори концентрација 100 или 300 mg/mL. Од њих је касније справљена серија разблажења кориштена код испитивања антиинфламаторног потенцијала. Основни раствори су чувани у замрзивачу у стакленим бочицама на температури од -20 °C.

3. Експериментални део

3.2. ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ИСПИТИВАНИХ ВРСТА ГЉИВА

3.2.1. Одређивање садржаја макро- и микроелемената атомском апсорпционом спектрофотометријом (AAS)

Након издвајања воде из узорка природног порекла (биљке, гљиве) преостаје тзв. апсолутно сува супстанца која се састоји из органских и неорганских једињења. Органски део супстанце чине сва органска једињења присутна у испитиваном природном материјалу (једињења угљеника, азота, кисеоника и водоника). Под минералним делом супстанце (пепелом) подразумева се несагориви део, односно група једињења и елемената који преостају у узорку након процеса минерализације органске материје под дејством високих температура (Maksimović и Рајевић, 2002).

Поступак припреме пепела

На аналитичкој ваги је измерена маса ватросталне посуде и забележена њена маса. У посуду је затим одмерено по 5 g апсолутно суве и претходно самлевене гљиве, и забележена је тачна маса. Посуда са испитиваним материјалом је загревана на решоу до престанка издвајања гасова (CO_2 , H_2O , NH_3 , N_2) у дигестору. Узорак је затим пренет у пећ и подвргнут жарењу на температури од око $650\text{ }^\circ\text{C}$ у периоду од 2-3h, док пепео не постане сивкасто-бео. Посудица са пепелом је након жарења охлађена у ексикатору до собне температуре, а затим је измерена маса посуде са пепелом. Из разлике добијене масе са пепелом и масе празне ватросталне посуде, израчуната је маса пепела.

Поступак припреме матичног раствора

Матични раствор представља раствор минералног дела природног материјала (гљиве) познате почетне масе. Помоћу матичног раствора се одређује садржај елемената који чине минерални део испитиване супстанце. Први корак у припреми матичног раствора је одстрањивање (разарање, минерализација) органске материје из узорка, док је други корак растварање минералног дела.

3. Експериментални део

Разарање се може вршити „сувим“ и „мокрим“ путем. У овом раду је кориштена метода „сувог“ пута, односно деловања високих температура.

Реагенси:

25 % HCl у дестилованој води
1 % AgNO₃ у дестилованој води
дестилована вода

Поступак:

У посуду са охлађеним пепелом додато је 10 ml 25 % HCl и постепено вршено загревање док 1/2 до 1/3 додате киселине није упарено. Циљ овог поступка је претварање пирофосфата насталих у току сагоревања у ортофосфате и растварање пепела. Након тога, раствор је квантитативно пренет на филтер папир плаве траке кључалом водом у одмерну тиквицу од 100 ml. Испирање филтер папира кључалом водом је вршено до престанка реакције на хлориде, што је испитивано додатком AgNO₃, при чему настанак замућења указује на присуство хлоридних јона. Филтрат је потом охлађен на 20 °C и допуњен дестилованом водом до 100 ml у одмерној тиквици и промућкан.

Садржај појединих микро- и макроелемената, а међу њима и тешких метала одређен је атомском апсорпционом спектрофотометријом по стандардној методи Varian-а (Arseniјевић-Максимовић и Рајевић, 2002).

Претходно припремљени узорци су обрађени атомским апсорпционим спектрофотометром (модел FS AAS240/GTA120, Varian) уз коришћење ацетилен/ваздушне пламене технике (са атомизационом температуром од око 2300 °C) за квантификацију јона Cu и Mg и N₂O-ацетиленског пламена (са атомизационом температуром од око 2700 °C) за одређивање јона Ca. Користе се и катодне лампе за одређивање појединих јона метала (Cu, Mg и Ca) на таласним дужинама од 324,8, 285,2 и 422,7 nm изражено у mg/kg суве масе гљива.

3. Експериментални део

3.2.2. LC/MS-MS анализа одабраних фенолних једињења

Одабрана фенолна једињења у испитиваним екстрактима квантификована су применом LC/MS-MS технике. Раздвајање компоненти припремљених екстраката извршено је на течном хроматографу Agilent Technologies 1200 Series Rapid Resolution куплованим са G6410A QqQ MS-MS детектором са електроспреј јонским извором (ESI), контролисан од стране MassHunter ver. B.03.01. софтвера (Agilent Technologies).

За хроматографско раздвајање кориштена је Zorbax Eclipse XDB-C18 RR 4,6 mm x 50 mm x 1,8 μ m (Agilent Technologies) реверсно-фазна колона при температури од 45 °C. Бинарна мобилна фаза састојала се од 0,05 % мравље киселине (A) и метанола (B), а проток је износио 1 mL/min. Примењен је градијентни мод, који је подразумевао следећи однос фаза: 0 min 30 % B, 6 min 70 % B, 9 min 100 % B, 12 min 100 % B, са временом рееквилибрације од 3 min. Инјектована запремина свих узорака била је 5 μ L. ESI параметри били су: гас за сушење (N₂) температуре 350 °C, проток 9 L/min, притисак гаса небулајзера 40 psi, напон на капилари 4 kV, негативан поларитет. Једињења су праћена у динамичком MRM (multiple reactions monitoring) моду. Остали оптимизовани параметри дати су у **Табели 7.3. (Прилог 7.1.2.; Табела 7.3.)**. Калибрациони стандарди концентрација 0,0015 μ g/mL до 25,0 μ g/mL припремљени су секвенцијалним разблаживањем (1:1) основног микса концентрације 100 μ g/mL смешом метанол-вода (3:7). Одређивање садржаја стандардних фенолних једињења у испитиваним екстрактима урађено је на основу стандардне калибрационе криве (функција логаритма површине пика у зависности од логаритма концентрације стандарда, $\log(A)=f \log (C)$), снимљене из серије разблажења микса стандарда.

3.2.3. Одређивање садржаја протеина (Bradford, 1976)

Брадфордова метода је колориметријска метода за одређивање концентрације протеина и заснива се на промени црвене боје Commassie Brilliant Blue G, која је у двоструко протонованој форми, у стабилну плаву која се постиже везивањем

3. Експериментални део

за протеине. Током формирања комплекса Commassie Brilliant Blue G - протеин долази до интеракција које подразумевају два типа веза. Црвени облик боје прво даје протоне (H^+) оним групама протеина које се могу јонизовати (негативно наелектрисани протеини), што доводи до ремећења нативног стања протеина, при чему долази до излагања хидрофобних џепова протеина. Потом се хидрофобни џекови нековалентно везују за неполарне регионе боје van der Waals-овим силама, тако да се позитивне аминокиселинске групе протеина поставе наспрам негативно наелектрисаних делова боје. Веза се затим појачава њиховим јонским интеракцијама и везивање протеина стабилизује плаву форму боје Commassie Brilliant Blue G. Боја формираног комплекса је стабилна 2-30 min, па се читавање апсорбације на 595 nm мора извршити у том периоду.

Реагенси:

Брадфордов реагенс: 50 mg CBBG (Commassie Brilliant Blue G), 25 ml 95 % C_2H_5OH , 50 ml 85 % H_3PO_4 у 500 ml дестиловане воде.

Направљен раствор се пребаци у тамну боцу и чува у фрижидеру (+ 4 °C) и може да стоји око 3 месеца.

Пре употребе реагенс је потребно профилирати кроз филтер папир.

Поступак:

Од почетних концентрација екстраката (2,5, 5 и 10 mg/mL) направљена је серија од три двострука разблажења, и добијен је распон концентрација код свих испитиваних екстраката 500-2000 $\mu g/mL$. Стандардни раствор BSA (Bovine serum albumin) је рађен у распону концентрација 0-3 $\mu g/ml$ (**Табела 3.2.**). Све радне пробе и контроле рађене су у три понављања.

Припремљени су одговарајући раствори (**Табела 3.3.**), развијена је плава боја, и с обзиром да је боја формираног комплекса стабилна 2-30 min читавање апсорбације на 595 nm је извршено у том периоду.

3. Експериментални део

Табела 3.2. Калибрациона крива за одређивање садржаја протеина

Вел	ml стандарда	ml H ₂ O	Брадфорд реагенс (μl)	Количина протеина (μg/велу)
A 1, 2	-	50	200	слепа проба
A 3, 4	-	50	200	0
A 5, 6	2	48	200	0,4
A 7, 8	5	45	200	1,0
A 9, 10	7	43	200	1,4
A 11, 12	10	40	200	2,0
B 1, 2	12	38	200	2,4
B 3, 4	15	35	200	3,0
B 5, 6	17	33	200	3,4
Укупно у велу		250 ml		

Табела 3.3. Раствори припремљени за одређивање садржаја протеина и конструисање стандардне криве (BSA)

РАДНА ПРОБА	КОРЕКЦИЈА	КОНТРОЛА
50 μl екстракта (BSA)	50 μl екстракта (BSA)	50 μl растварача
200μl Брадфорд реагенс	200μl д H ₂ O	200μl Брадфорд реагенс

Принцип рачунања:

Вредности ек. протеина/mL узорка код испитиваних екстраката гљива добијене су на следећи начин:

$$\text{mg ек. протеина/ml узорка} = \text{очитана конц. протеина } (\mu\text{g/ml}) / 50\mu\text{l} \times 1000$$

Концентрација протеина се читава са калибрационе криве.

За сваки испитивани екстракт гљива израчунава се средња вредност добијена за различите концентрације екстракта (Bradford, 1976).

3.2.4. Одређивање садржаја шећера (PSA тест)

С обзиром да не постоји метода за директно мерење полисахаридног садржаја, мерење се врши модификованом методом Monsigny-ја и сар. из 1988, у микроплејту (Masuko и др., 2005).

3. Експериментални део

Циљ теста је одређивање садржаја протеина у екстрактима гљива помоћу фенол-сумпорне киселине (PSA) и издваја се међу колориметријским методама за анализу угљених хидрата као најлакши и најпоузданији. PSA тест је колориметријски метод који се најчешће користи за одређивање укупне концентрације угљених хидрата где се моносахариди, олигосахариди и полисахариди реаранжирају у фурфуралне деривате под утицајем сумпорне киселине и потом реакцијом са фенолом дају обојена једињења (Khamlue и др., 2012). У PSA тесту фенол се сулфонизује *in situ* и настала фенол-сумпорна киселина смањује интензитет боје код неких пентоза и хексоза. Наведени протокол је оптимизован временом шетања и запреминама H_2SO_4 и фенола.

Анализирани шећери су: глукоза, фруктоза, сахароза и ксилоза почетних концентрација 10 mg/mL. Стандардне криве сваког од ових шећера прављене су одговарајућим разблаживањем основног раствора. Узорци су такође разблажени одређени број пута, тако да је апсорбанција узорка између најмање и највеће вредности апсорбанције добијене за стандардну криву.

Овим поступком се одређује садржај укупних угљених хидрата, изражен у mg ек. шећера/ g сувог остатка (с.м.).

Реагенси:

cc H_2SO_4

5 % фенол: 5 ml 100 % фенола у 100 ml дестиловане воде

1 mM глукоза/фруктоза: 0,018016 g глукозе (фруктозе) у 100 ml дестиловане воде

1 mM ксилоза: 0,015013 g ксилозе у 100 ml дестиловане воде

1 mM сахароза: 0,0342297 g сахарозе у 100 ml дестиловане воде

Поступак:

Од почетних концентрација екстраката широког опсега од 1 до 200 mg/mL направљена је серија од три разблажења, тако да је на крају распон радних концентрација код испитиваних екстраката био од 217,39 до 43478,26 $\mu\text{g/mL}$. Почетне концентрације стандардних раствора глукозе, фруктозе, ксилозе и сахарозе су биле од 62,5 до 10000 $\mu\text{g/mL}$. Све радне пробе и контроле су рађене у три понављања, с тим да су радне пробе имале и сопствену корекцију.

Припремљени раствори су приказани у **Табели 3.4.** а апсорбанција је мерена спектрофотометријски на 490 nm за хексозе, 480 nm за пентозу и 750 nm за сахарозу.

3. Експериментални део

Табела 3.4. Раствори припремљени за одређивање укупног садржаја шећера и конструисање стандардних кривих

РАДНА ПРОБА	КОРЕКЦИЈА	КОНТРОЛА
50 µl шећера (екстракта)	50 µl шећера (екстракта)	50 µl растварача
150 µl cсH ₂ SO ₄	150 µl dH ₂ O	150 µl cсH ₂ SO ₄
30 µl 5% фенола	30µl 5 % фенола	30 µl 5 % фенола
	Вортексирање 30 min на собној температури	
	Загревање 10 min на 70 °C у воденом купатилу	
	5 min на собној температури и мери се апсорбанција	

Принцип рачунања:

Све радне пробе рађене су у три понављања, а корекција једном. Стандардна крива се конструира на основу резултата добијених мерењем апсорбанција стандардних раствора шећера. Из разлике апсорбанције радне пробе (A_{sr}), корекције (A_{kor}) и контроле (A_{kon}) израчунате су апсорбанције за сваки испитивани екстракт:

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

Садржај сваког шећера је израчунат на основу калибрационе криве (апсорбанција у зависности од концентрације) стандардног раствора шећера. Резултат је изражен као средња вредност три мерења (mg ек. шећера/ g с.м.) (Masuko и др., 2005).

Вредности ек. шећера/g суве материје код испитиваних екстраката гљива добијени су на следећи начин:

$$\text{mg еквивалента шећера/g с. м.} = \text{очитана конц. шећера / радна конц.} \times 1000$$

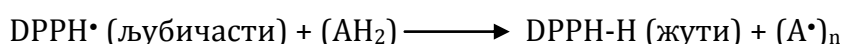
За сваки испитивани екстракт гљива израчунава се средња вредност добијена за различите концентрације екстракта.

3.3. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИОКСИДАНТНЕ АКТИВНОСТИ ГЉИВА *IN VITRO*

3.3.1. Одређивање капацитета „хватања“ DPPH• радикала

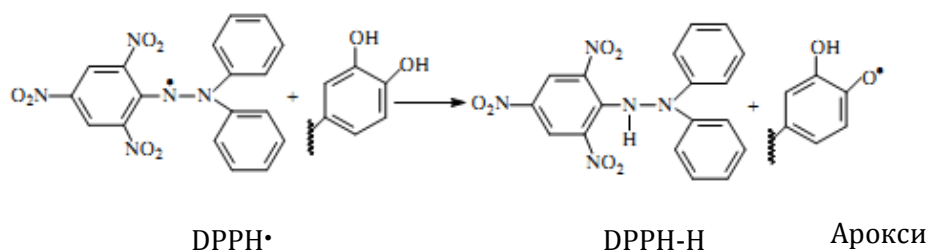
DPPH (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) је органско једињење, тамно-љубичасто обојени кристални прах.

Потенцијал „хватања“ слободних радикала испитиваних екстраката DPPH тестом одређује се мерењем њихове способности да неутралишу 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил радикале (DPPH•). Метода је заснована на губитку љубичасте боје раствора DPPH• радикала у присуству антиоксиданата на 515 nm, при чему настаје редуковани облик жуте боје, DPPH-H (Espin и др., 2000).



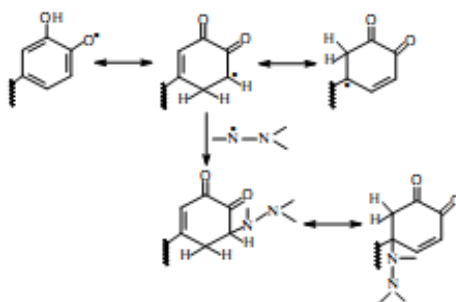
Неутрализацију DPPH• врше првенствено фенолна једињења помоћу два механизма који се симултано одвијају. Најпре, фенолно једињење делује као донор Н-атома при чему настаје редуковани, неутрални DPPH-H облик и арилокси радикал, који је резонантно стабилизован, а затим настали арилокси радикал може реаговати са још једним DPPH• радикалом, при чему долази до њихове кондензације и преласка у неутралан молекул (**Слика 3.1.**).

Предаја Н атома DPPH• радикалима:



3. Експериментални део

„Хватање“ DPPH• радикала:



Слика 3.1. Механизам антиоксидантног дејства фенолних једињења на DPPH• радикал (Espin и др., 2000)

Реагенси:

Основни DPPH реагенс (0,4 mmol/L): 0,0157 g DPPH реагенса у 100 ml EtOH (реагенс је стабилан две недеље и треба га чувати у мраку на 4 °C)

Радни DPPH реагенс (90 μmol/L): 22,5 ml основног DPPH реагенса у 100 ml MeOH (припрема се на дан пробе)

Почетне концентрације узорака: 0,0125, 0,025, 0,03125, 0,05, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5 и 2 mg/mL

Поступак:

Од почетних концентрација екстраката (0,0125, 0,025, 0,03125, 0,05, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5 и 2 mg/mL) направљена је серија од пет двоструких разблажења, тако да је на крају распон радних концентрација код испитиваних екстраката био од 0,5 до 80 μg/mL, у зависности од врсте екстракта и испитиване врсте гљива. Почетне концентрације стандардног антиоксиданта пропил галата (PG) су биле од 2,15625 до 138 μg/mL. Све радне пробе и контроле су рађене у три понављања, с тим да су радне пробе имале и сопствену корекцију.

Припремљени раствори су приказани у **Табели 3.5.**, а апсорбанција је мерена спектрофотометријски на 515 nm након 60 min инкубације у мраку. Све радне пробе и контроле рађене су у три понављања.

3. Експериментални део

Табела 3.5. Раствори припремљени за одређивање капацитета „хватања“ DPPH• радикала

РАДНА ПРОБА	КОРЕКЦИЈА	КОНТРОЛА
60 µl DPPH•	-	60 µl DPPH•
10 µl екстракта (стандарда)	10 µl екстракта (стандарда)	10 µl растварача
180 µl MeOH	240 µl MeOH	180 µl MeOH

Принцип рачунања:

Капацитет „гашења“ DPPH• радикала одређен је из разлике A_{rp} и A_{kor} и добијена је A_{uzorka} :

$$A_{uzorka} = A_{rp} - A_{kor}$$

$$\%RSC = 100 - A_{uzorka} \times 100 / A_{kontrola} \times 100 \%$$

RSC – капацитет „хватача“ слободних радикала

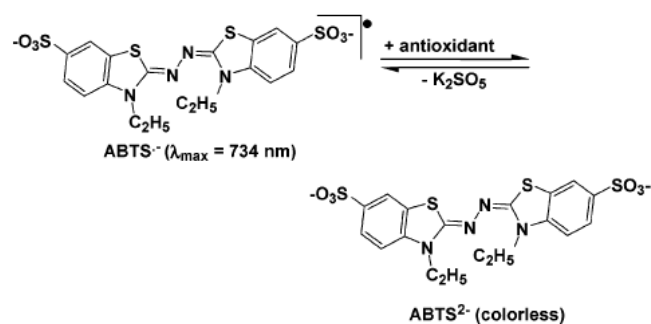
Из вредности добијених за RSC одређене су и IC_{50} вредности (концентрација испитиване супстанце при којој је неутралисано 50 % радикала) читавањем са одговарајућег графика (функција % RSC у зависности од радне концентрације), а резултат је изражен као средња вредност три $IC_{50} \pm SD$ ($\mu\text{g/mL}$) (Espin и др., 2000).

3.3.2. Одређивање капацитета „хватања“ ABTS•+ радикала

Тролокс еквивалент антиоксидантни капацитет први пут је објављен од стране Miller и Rice-Evansa (1993), те је касније модификован од стране Arnao-и сар. (Arnao и др, 2001). У унапређеној верзији ABTS•+, оксидант настаје у реакцији оксидације са персулфатом 2,2-азинобис (3-етилбензотиазолин)-6-сулфонске киселине (ABTS²⁻).

Метода се заснива на спектрофотометријском праћењу трансформације плаво-зелено обојеног катјонског радикала ABTS•+ у неутралну, безбојну форму на 734 nm (*Слика 3.2.*).

3. Експериментални део



Слика 3.2. Неутрализација катјонског синтетичког $ABTS^{\bullet+}$ радикала до безбојне редуковане форме (Arnao и др, 2001)

Реагенси:

Основни ABTS реагенс (7 mM): 38,4 mg ABTS реагенса је пренето у нормалан суд од 10 ml који је потом допуњен дестилованом водом и додат је 2,45 mM $K_2S_2O_7$. Реагенс потом одстоји 16h на собној температури у мраку да би се развила тамно плава боја
Радни ABTS реагенс: припрема се на дан рада разблажењем основног раствора (600 μ l ABTS у 40 ml EtOH)

Тролокс (1 mM): 0,0250 g тролокса у 100ml дестиловане воде

Поступак:

Од екстракта почетних концентрација 0,5, 0,625, 1,25, 2,5 и 5 mg/mL направљена је серија од три разблажења, па је коначни распон радних концентрација био од 16,67 до 166,67 μ g/mL. Све радне пробе и контроле су рађене у три понављања.

Реакциона смеша се добија мешањем 290 μ l свеже направљеног ABTS раствора и 10 μ l испитиваног екстракта, те се апсорбанција радних проба читава на 734 nm након инкубације од 5 min на 30 °C (**Табела 3.6.**). Стандардна калибрациона крива је конструисана као функција апсорбанције ABTS-а у зависности од серије различитих разблажења тролокса (распон концентрација од 0-500 μ M).

Табела 3.6. Раствори припремљени за одређивање садржаја $ABTS^{\bullet+}$ радикала

РАДНА ПРОБА	КОРЕКЦИЈА	КОНТРОЛА	СЛЕПА ПРОБА
290 μ l $ABTS^{\bullet+}$	290 μ l д H_2O	290 μ l $ABTS^{\bullet+}$	290 μ l $ABTS^{\bullet+}$
10 μ l екстракта	10 μ l екстракта	10 μ l растварача	10 μ l EtOH

3. Експериментални део

Принцип рачунања:

Резултати „скевенџер“ активности екстракта према ABTS^{•+} катјонском радикалу изражени су као mg тролокс ек. (TEAC – trolox equivalent antioxidant capacity)/ g суве материје (вредности за TEAC очитане са стандардне криве).

Вредност ек. тролокса (T)/ g суве материје код екстракта испитиваних гљива добијене су на следећи начин:

$$\text{mg ек. T/g с. м.} = \text{очитана конц. T } (\mu\text{g/ml}) / \text{радна конц.} \times 1000$$

За сваки испитивани екстракт гљива израчунава се средња вредност добијена за различите концентрације екстракта.

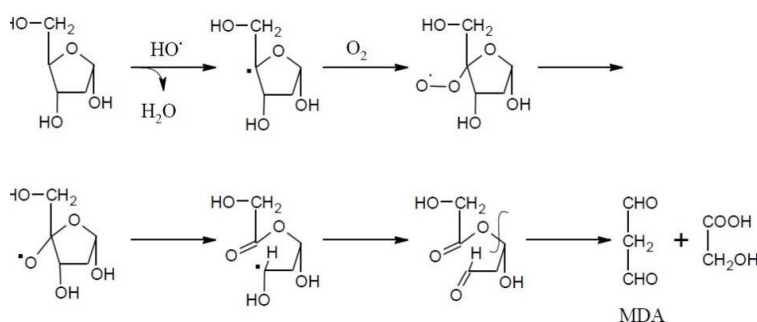
3.3.3. Одређивање капацитета „хватања“ хидроксил радикала (OH[•])

Хидроксил радикал (OH[•]) се одређује праћењем реакције деградације деоксирибозе модификованом методом Gutteridge-a (Halliwell и др., 1987).

Хидроксил радикали се генеришу Фентоновом реакцијом:

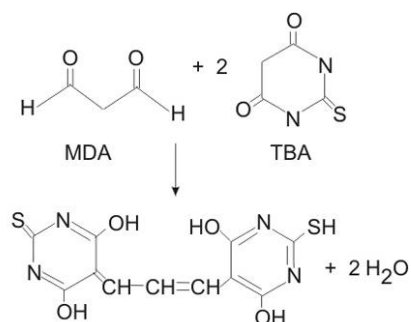


Настали OH[•] радикали започињу реакцију одузимањем Н-атома 2-деоксирибозе у аеробној средини, градећи малондиалдехид (MDA) који потом реагује са тиобарбитурном киселином (ТВА) (Слика 3.3.; Слика 3.4.). Настали обојени производи се одређују спектрофотометријски на 532 nm.



Слика 3.3. Реакција настајања малондиалдехида (MDA) (Cheeseman и др., 1998)

3. Експериментални део



Слика 3.4. Реакција ТВА и МДА

Реагенси:

H_2O_2 (0,015 % раствор): 42 μl 35 % H_2O_2 у 100 ml дестиловане воде
 FeSO_4 (10,0 mmol/L раствор): 0,1390 g $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ у 50 ml дестиловане воде
 2-деокси-D-рибоза (0,05 mol/L раствор): 0,1677 g 2-деокси-D-рибозе у 25 ml фосфатног пуфера (pH 7,4)
 ТВА реагенс: 5,2 ml HClO_4 , 1,5 g тиобарбитурне киселине и 60 g трихлорсирћетне киселине у 400 ml дестиловане воде
 EDTA (0,1 M): 1,86 g у 50 ml дестиловане воде
 Фосфатни пуфер pH 7,4 ($c=0,067$ mol/L): 1,7506 g KH_2PO_4 и 7,6851g Na_2HPO_4 у 1L дестиловане воде

Поступак:

Од екстракта почетних концентрација доста широког опсега од 0,0125 до 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ направљена је серија од најчешће пет раствора разблажења, па је на крају добијен распон радних концентрација екстракта био од 0,020 до 47,98 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Стандардни антиоксидант PG кориштен је у распону почетних концентрација у опсегу од 8,625 до 138 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Све радне пробе и контроле су рађене у три понављања.

Припремљени су одговарајући раствори (**Табела 3.7.**) и инкубирани 60 min на 37 °C. По истеку инкубације, реакционој смеси додат је EDTA и ТВА реагенс, а карактеристична ружичаста боја комплекса (ТВАМДА) развија се након 10 min кувања на 100 °C. Након хлађења до собне температуре, свака проба (200 μL) пренета је у микроплочу и мерена је апсорбанција на 532 nm.

3. Експериментални део

Табела 3.7. Раствори припремљени за одређивање капацитета „хватања“ OH^\bullet радикала

РАДНА ПРОБА	КОРЕКЦИЈА	КОНТРОЛА
100 μl 2-деокси- D-рибоза		100 μl 2-деокси- D-рибоза
10 μl екстракта	10 μl екстракта	10 μl растварача
100 μl H_2O_2		100 μl H_2O_2
100 μl FeSO_4		100 μl FeSO_4
2,7 ml пуфер pH 7,4	3 ml пуфер pH 7,4	2,7 ml пуфер pH 7,4
	Инкубација 60 min на 37 °C	
200 μl EDTA	200 μl EDTA	200 μl EDTA
2 ml TBA	2 ml TBA	2 ml TBA
	Загревање 10 min на 100 °C	

Принцип рачунања:

Из разлике радне пробе (A_{rp}) и корекције (A_{kor}) израчунате су апсорбације узорка (A_{uzorka}) за сваку концентрацију испитиваног екстракта:

$$A_{\text{uzorka}} = A_{\text{rp}} - A_{\text{kor}}$$

Потенцијал неутрализације OH^\bullet радикала ($\text{RSC}_{\text{OH}^\bullet}$) испитиваних екстраката различитих концентрација израчунат је на основу следеће једначине:

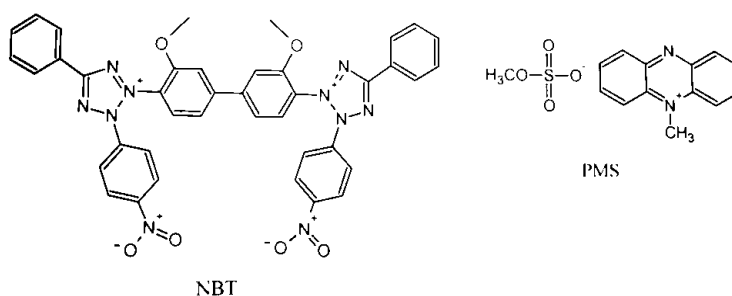
$$\text{Radical Scavenging Capacity}(\text{OH}^\bullet) (\%) = (1 - A_{\text{uzorka}}/A_{\text{kontrola}}) \times 100 \%$$

На основу $\text{RSC}_{\text{OH}^\bullet}$ вредности одређене су IC_{50} вредности (концентрација при којој је неутралисано 50% радикала) читавањем са одговарајућег графикона (функција $\text{RSC}_{\text{OH}^\bullet}$ у зависности од радне концентрације), док је резултат изражен као средња вредност три одређене $\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

3.3.4. Одређивање капацитета „хватања“ супероксид анјон радикала ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

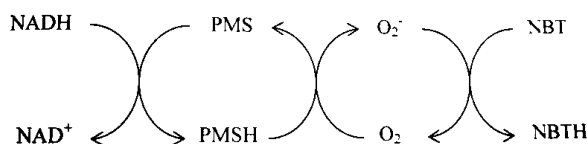
Супероксид анјон радикали генерисани су у систему ксантин/ксантин-оксидаза. Капацитет „хватања“ супероксид анјон радикала испитиваних екстраката гљива одређен је мерењем њихове способности да неутралишу $\text{O}_2^{\bullet-}$ настале аеробном редукцијом нитроблу-тетразолијум плавог (NBT) помоћу NADH у присуству феназинметилсулфата (PMS) (*Слика 3.5.*) (Nishikimi, 1972).

3. Експериментални део



Слика 3.5. Структурне формуле тетразолијум нитро-плавог и феназинметилсулфата

Степен редукције NBT са NADH у аеробним условима је занемарљив (5 %) и линеарно расте са количином додатог PMS-а, који се понаша као преносилац електрона утичући на механизам редукције. Током његове реоксидације кисеоником долази до формирања супероксид анјон радикала који у великој мери (95 %) редукује NBT у формазан (**Слика 3.6.**) (Nishikimi, 1972).



Слика 3.6. Шематски приказ механизма аеробне редукције NBT

NBTH (редуковани облик) је плаве боје, и додатком екстракта који је богат фенолним једињењима долази до неутрализације супероксид анјона и самим тим смањења редукције NBT. Количина неутралисаних радикала се прати спектрофотометријски (560 nm) и пропорционална је смањењу интензитета обојења.

Реагенси:

Нитроблутетразолијум (144 $\mu\text{mol/L}$): 0,0031 g NBT растворено у 25 ml дестиловане воде

Основни раствор феназинметилсулфата (600 $\mu\text{mol/L}$): 0,0046 g PMS-а растворено у 25 ml дестиловане воде (раствор чуван у тамној боци)

Радни раствор феназинметилсулфата (60 $\mu\text{mol/L}$): 0,25 ml основног PMS раствора додато у 2,25 ml дестиловане воде (раствор припремљен непосредно пре мерења)

NADH (677 $\mu\text{mol/L}$): 0,0048 g NADH x 3H₂O растворено у ml дестиловане воде

Фосфатни пуфер (pH 8,3): 0,9321 g Na₂HPO₄ и 0,0182 g KH₂PO₄ растворено у 100 ml дестиловане воде

Поступак:

Од екстракта почетних концентрација доста широког опсега (0,0125 до 20 mg/mL) у зависности од врсте екстракта направљена је серија од пет

3. Експериментални део

разблажења, па је распон радних концентрација екстраката био од 0,08 до 132,45 $\mu\text{g/mL}$. Стандардни антиоксидант PG кориштен је у распону почетних концентрација у опсегу од 2,15625 до 138 $\mu\text{g/mL}$. Све радне пробе су рађене у три понављања.

Након припреме одговарајућих раствора (**Табела 3.8.**), њихова апсорбанција се мери на 560 nm након 5 min инкубације.

Табела 3.8. Раствори припремљени за одређивање капацитета „хватања“ $\text{O}_2^{\bullet-}$ радикала

РАДНА ПРОБА	КОРЕКЦИЈА	КОНТРОЛА
200 μl NBT	-	200 μl NBT
10 μl екстракта	10 μl екстракта	10 μl растварача
100 μl NADH*	-	100 μl NADH*
100 μl PMS*	-	100 μl PMS*
1,1 ml пуфер pH 8,3	1,5 ml пуфер pH 8,3	1,1 ml пуфер pH 8,3

* раствори додати непосредно један за другим!

Принцип рачунања:

Из разлике радне пробе (A_{rp}) и корекције (A_{kor}) израчунате су апсорбанције узорка (A_{uzorka}) за сваку концентрацију испитиваног екстракта:

$$A_{\text{uzorka}} = A_{\text{rp}} - A_{\text{kor}}$$

Потенцијал неутрализације $\text{O}_2^{\bullet-}$ радикала ($\text{RSC}_{\text{O}_2^{\bullet-}}$) испитиваних екстраката различитих концентрација израчунат је на основу следеће једначине:

$$\text{Radical Scavenging Capacity}(\text{O}_2^{\bullet-}) (\%) = (1 - A_{\text{uzorka}} / A_{\text{kontrola}}) \times 100 \%$$

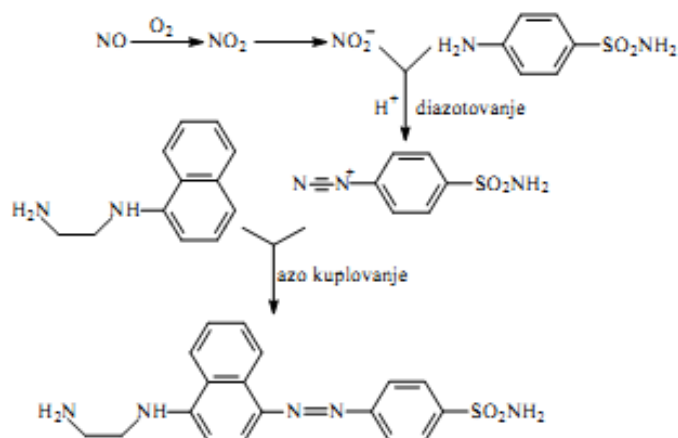
На основу $\text{RSC}_{\text{O}_2^{\bullet-}}$ вредности одређене су IC_{50} вредности (концентрација при којој је неутралисано 50 % радикала) читавањем са одговарајућег графикона (функција $\text{RSC}_{\text{O}_2^{\bullet-}}$ (%) у зависности од радне концентрације ($\mu\text{g/ml}$)), а резултат је изражен као средња вредност три одређене IC_{50} вредности \pm SD ($\mu\text{g/mL}$).

3.3.5. Одређивање капацитета „хватања“ азот моноксид радикала (NO^{\bullet})

Одређивање потенцијала неутрализације NO^{\bullet} радикала EtOH и H_2O екстраката гљива, заснива се на спектрофотометријском мерењу неутрализације формираних нитритних јона. У ову сврху кориштен је H_2O

3. Експериментални део

раствор натријум нитропрусида (SNP) који представља извор NO^\bullet радикала при физиолошком рН, који реагује са кисеоником дајући нитритне јоне. Концентрација нитритних јона одређена је по методи Green-а и сар. (Green и др., 1982), а заснива се на реакцији са Griess-овим реагенсом при чему настаје пурпурно-ружичасти диазо комплекс (*Слика 3.7.*), а интензитет боје мерен је спектрофотометријски (546 nm).



Слика 3.7. Реакција нитритних јона са Griess-овим реагенсом

Реагенси:

Натријум-нитропрусид (10 mmol/L SNP): 0,2980 g SNP растворено у 100 ml фосфатног пуфера рН 7,4

Griess-ов реагенс*: смеша једнаких запремина раствора А и В:

А: NEDA (0,2 % раствор N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохлорид): 0,5 g NEDA растворено у 249,5 ml дестиловане воде

В: SA (2 % раствор сулфаниламида у 4 % фосфорној киселини): 5 g SA растворено у смеси 235,2 ml дестиловане воде и 5,80 ml cc H_3PO_4

* Смеша је стабилна 12h на 4 °C, док су појединачни раствори стабилни четири месеца
Фосфатни пуфер (рН 7,4) (c=0,067 mol/L): 1,7506 g KH_2PO_4 и 7,6851g Na_2HPO_4 у 1L дестиловане воде

Поступак:

Од екстраката почетних концентрација широог опсега од 0,3125 до 300 mg/mL направљена је серија разблажења у распону радних концентрација од 9,24 до 443,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Стандардни антиоксидант PG кориштен је у распону почетних концентрација у опсегу од 2,15625 до 138 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Све радне пробе су рађене у три понављања.

Припремљени су одговарајући раствори (*Табела 3.9.*), и мерена је потом апсорбанција на 546 nm након 90 min.

3. Експериментални део

Табела 3.9. Раствори припремљени за одређивање капацитета „хватања“ NO• радикала

РАДНА ПРОБА	КОРЕКЦИЈА	КОНТРОЛА
500 µl SNP	-	500 µl SNP
30 µl екстракта	30 µl екстракта	30 µl растварача
500µl пуфер pH 7.4	1 ml пуфер pH 7.4	500µl пуфер pH 7.4
Инкубација 90 min на 25 °C (константно светло)		
1 ml Griess-ов реагенс	1 ml Griess-ов реагенс	1 ml Griess-ов реагенс

Принцип рачунања:

Из разлике радне пробе (A_{rp}) и корекције (A_{kor}) израчунате су апсорбанције узорка (A_{uzorka}) за сваку концентрацију испитиваног екстракта:

$$A_{uzorka} = A_{rp} - A_{kor}$$

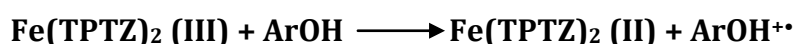
Потенцијал неутрализације NO• радикала ($RSC_{(NO\bullet)}$) испитиваних екстраката различитих концентрација израчунат је на основу следеће једначине:

$$R_{adicalScavengingCapacity(NO\bullet)} (\%) = (1 - A_{uzorka} / A_{kontrola}) \times 100 \%$$

На основу $RSC_{(NO\bullet)}$ вредности одређене су IC_{50} вредности (концентрација при којој је неутралисано 50 % радикала) читавањем са одговарајућег графикона (функција $RSC_{(NO\bullet)}$ (%) у зависности од радне концентрације ($\mu g/ml$)), а резултат је изражен као средња вредност три одређене IC_{50} вредности \pm стандардна девијација ($\mu g/mL$).

3.3.6. Одређивање редокс капацитета**3.3.6.1. FRAP метода** (Ferric Reducing Antioxidant Power Assay) (Benzie и Strain, 1999)

Ова спектрофотометријска метода је заснована на реакцији редукције Fe^{3+} у Fe^{2+} при ниској pH вредности. Формирани фери јони са присутним лигандом граде плаво обојени комплекс Fe^{2+} - TPTZ (гвожђе(II)-2,4,5-трипиридил-S-триазин). Хемијска реакција између Fe^{3+} (TPTZ) и фенолних једињења као донора електрона може да се прикаже на следећи начин:

**Реагенси:**

FRAP реагенс: ацетатни пуфер:TPTZ:FeCl₃ x 6H₂O = 100 ml: 10 ml: 10 ml
FeCl₃ x 6H₂O (20 mmol/L): 0,0541 g FeCl₃ x 6H₂O у 10 ml дестиловане воде

3. Експериментални део

TPTZ (10 mmol/L у 40 mmol/L HCl): 0,0312 g TPTZ у 10 ml 40 mmol/L HCl
 HCl (40 mmol/L): 0,086 ml cc HCl у 25 ml дестиловане воде
 Аскорбинска киселина (1 mmol/L): 0,0176 g аскорбинске киселине у 100 ml дестиловане воде
 Ацетатни пуфер (pH 3,6): 0,31 g CH₃COONa и 1,6 ml cc CH₃COOH у 100 ml дестиловане воде

Поступак:

Разблажења аскорбинске киселине за стандардну криву направљена су у распону концентрација од 12,5 до 500 µg/mL. Раствори екстракта су разблажени у почетне концентрације: 0,25, 0,5, 1,0 и 2,0 mg/mL. Све радне пробе рађене су у три понављања а корекција у једном.

Припремљени раствори приказани су у **Табели 3.10.**, а њихова апсорбанција је мерена спектрофотометријски на 593 nm након 6 min инкубације.

Табела 3.10. Раствори припремљени за одређивање редуционог потенцијала FRAP тестом

РАДНА ПРОБА	КОРЕКЦИЈА	КОНТРОЛА
1 ml K ₃ [Fe(CN) ₆] 10 µl екстракта (аскорбинскекиселине)	- 10 µl екстракта	1 ml K ₃ [Fe(CN) ₆] 10 µl растварача
1 ml пуфер pH 6,6	2 ml пуфер pH 6,6	1 ml пуфер pH 6,6

Принцип рачунања:

Редуциони потенцијал израчунат је на основу калибрационе криве (функција апсорбанције у зависности од концентрације) стандардног раствора аскорбинске киселине (АК). Вредност ек. аскорбинске киселине (АК)/g суве материје код екстракта испитиваних гљива добијене су на следећи начин:

$$\text{mg ек. АК/g с.м.} = \text{очитана конц. АК (µg/ml) / радна конц.} \times 1000$$

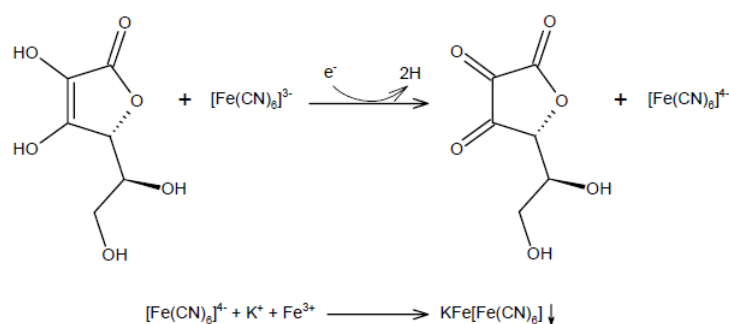
Резултат је изражен као средња вредност три мерења ± SD (mg ек. аскорбинске киселине/g с.м.).

3.3.6.2. АЕАС метода (Ascorbate Equivalent Antioxidant Capacity)

АЕАС метода (Yen и Chen, 1995) се заснива на способности екстракта гљива да редукују Fe³⁺ у Fe²⁺, што је праћено спектрофотометријски на основу грађења комплекса берлинско плавог (KFe [Fe(CN)₆] (**Слика 3.8.**). Редуциони

3. Експериментални део

капацитет изражен је у односу на редокс капацитет аскорбинске киселине као позитивног стандарда.



Слика 3.8. Шематски приказ редукције Fe^{3+} у Fe^{2+} аскорбинском киселином

Реагенси:

Пуфер рН 6,6: 1,1020 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и 1,4350 g KH_2PO_4 у 250 ml дестиловане воде
 Калијум-хексацијаноферат (III) (1 %): 1 g $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ у 100 ml дестиловане воде
 Трихлорсирћетна киселина (10 %): 10 g CCl_3COOH у 100 ml дестиловане воде
 FeCl_3 (0,1 %): 0,0426 g $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ у 25 ml дестиловане воде
 Аскорбинска киселина (5 mg/ml): 1,2500 g аскорбинске киселине у 250 ml дестиловане воде

Поступак:

Разблажења аскорбинске киселине за стандардну криву направљена су у распону концентрација од 0,5 до 3,5 mg/mL. Раствори екстракта су разблажени у распон почетних концентрација од 0,5 до mg/mL. Све радне пробе рађене су у три понављања а корекција у једном.

Реакциона смеша је инкубирана 30 min на 50 °C (**Табела 3.11.**). По истеку периода инкубације, у епрувете је додат по 1 ml Cl_3CCOOH . Смеша је центрифугирана на 3000 o/min 10 min. Након центрифугирања из сваке епрувете је одпипетиран по 1 ml раствора и додат по 1 ml дестиловане воде и 0,2 ml раствора FeCl_3 . Одпипетирано је по 200 μl радних проба у микроплочу и мерена је апсорбанција на 700 nm.

Табела 3.11. Раствори припремљени за одређивање редукционог потенцијала АЕАС тестом

РАДНА ПРОБА	КОРЕКЦИЈА	КОНТРОЛА
1 ml $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	-	1 ml $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
10 μl екстракта (аскорбинскекиселине)	10 μl екстракта	10 μl растварача
1 ml пуфер рН 6,6	2 ml пуфер рН 6,6	1 ml пуфер рН 6,6

3. Експериментални део

Принцип рачунања:

Редукциони потенцијал израчунат је на основу калибрационе криве (функција апсорбанције у зависности од концентрације) стандардног раствора аскорбинске киселине (АК). Вредност ек. аскорбинске киселине (АК)/ g суве материје код екстраката испитиваних гљива добијене су на следећи начин:

$$\text{mg ек. АК/g с. м.} = \text{очитана конц. АК } (\mu\text{g/ml}) / \text{радна конц.} \times 1000$$

Резултат је изражен као средња вредност три мерења \pm SD (mg ек. аскорбинске киселине/g с.м.).

3.3.7. Одређивање садржаја укупних фенола

Садржај укупних фенола одређен је по методи Singleton-а и сар. (Singleton и др., 1999) прилагођеној за микроплоче. Метода је заснована на реакцији фенола са Folin-Ciocalteu-овим реагенсом (смеша Na_2WO_4 , Na_2MoO_4 , HCl , H_3PO_4 и LiSO_4) где се формира обојени комплекс, чија апсорбанција се мери на 760 nm.

Реагенси:

Folin-Ciocalteu реагенс (FC, 0,1 mol/L): 2,5 ml 2M FC реагенса у 50 ml дестиловане воде
 Na_2CO_3 (7,5 %): 75 g Na_2CO_3 у 1L дестиловане воде

Na_2CO_3 (75 g/L): 20,25 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ у 100 ml дестиловане воде

Гална киселина (1 mg/mL): 0,0276 g галне киселине $\times \text{H}_2\text{O}$ у 100 ml дестиловане воде

Поступак:

За израду калибрационе криве кориштена су разблажења основног раствора галне киселине у распону концентрација од 0 до 1000 $\mu\text{g/mL}$. Основни раствори екстраката разблажени су до почетних концентрација у следећем опсегу од 0,625 до 10 mg/mL. Све пробе су рађене у три понављања уз једну корекцију. Припремљене су радне пробе према **Табели 3.12.** и након 2h инкубације на собној температури мерена је апсорбанција спектрофотометријски на 760 nm.

3. Експериментални део

Табела 3.12. Раствори припремљени за одређивање садржаја укупних фенола

РАДНА ПРОБА	КОРЕКЦИЈА	КОНТРОЛА
125 μ l FC реагенса	-	125 μ l ml FC реагенса
25 μ l екстракта (галне киселине)	25 μ l екстракта	25 μ l растварача
100 μ l Na ₂ CO ₃ *	225 μ l дест. воде	100 μ l Na ₂ CO ₃ *

* раствор је додат 10 min након додатка FC реагенса

Принцип рачунања:

Садржај фенола израчунат је на основу калибрационе криве (функција апсорбанције у зависности од концентрације) стандардног раствора галне киселине.

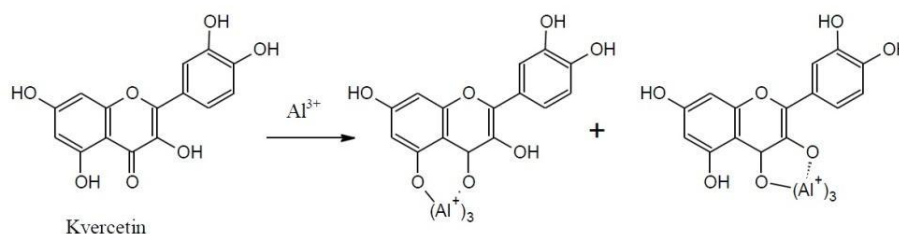
Вредности ек. галне киселине (ГК)/ g суве материје добијене су на следећи начин:

$$\text{mg ек. ГК/g с. м.} = \text{очитана конц. ГК } (\mu\text{g/mL}) / \text{радна конц.} \times 1000$$

Резултат је изражен као средња вредност три мерења \pm SD (mg ек. галне киселине/g с.м.).

3.3.8. Одређивање садржаја флавоноида

Садржај флавоноида одређен је по спектрофотометријској методи Chang-а и сар. (Chang и др., 2002), прилагођеној за микроплоче. Принцип методе се заснива на особинама флавоноида и флавогликозида да са јонима метала дају одговарајуће комплексе, а нарочито је значајан Al-комплекс (Слика 3.9.). Ово је једноставна спектрофотометријска метода која се заснива на грађењу обојеног комплекса са апсорпционим максимумом на 430 nm.

Слика 3.9. Настајање обојеног комплекса Al³⁺ јона и флавоноида

3. Експериментални део

Реагенси:

AlCl₃ (0,75 mol/L): 4,5266 g AlCl₃ x 6 H₂O у 25 ml дестиловане воде
 CH₃COONa (1 mol/L): 3,4020 g CH₃COONa x 3 H₂O у 25 ml дестиловане воде
 Кверцетин (1 mg/mL): 0,0264 g кверцетин x H₂O у 25 ml 80 % MeOH

Поступак:

Разблажења кверцетина за стандардну криву направљена у распону концентрација од 2,5 до 100 µg/mL. Основни раствор екстракта разблажен је различито у зависности од врсте гљиве и растварача у ком је растворена у опсегу почетних концентрација од 0,125 до 6 mg/mL. Припремљене су радне пробе према **Табели 3.13.**, а њихова апсорбанција мерена је спектрофотометријски на 415 nm након 30 min.

Табела 3.13. Раствори припремљени за одређивање садржаја флавоноида

РАДНА ПРОБА	КОРЕКЦИЈА	КОНТРОЛА
30 µl екстракта (кверцетина)	30 µl екстракта (кверцетина)	30 µl растварача (80 % MeOH)
90 µl MeOH	90 µl MeOH	90 µl MeOH
6 µl AlCl ₃	-	6 µl AlCl ₃
6 µl CH ₃ COONa	6 µl CH ₃ COONa	6 µl CH ₃ COONa
170 µl дест. воде	176 µl дест. воде	170 µl дест. воде

Принцип рачунања:

Садржај флавоноида израчунат је на основу калибрационе криве (функција апсорбанције у зависности од концентрације) стандардног раствора кверцетина.

Вредности ек. кверцетина (К)/ g суве материје добијене су на следећи начин:

$$\text{mg ек. К/g с. м.} = \text{очитана конц. К (µg/mL) / радна конц.} \times 1000$$

Резултат је изражен као средња вредност три мерења ± SD (mg ек. кверцетина/g с.м.).

3.4. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИОКСИДАНТНЕ АКТИВНОСТИ ГЉИВА *IN VIVO*

За други део испитивања антиоксидантне активности одабраних екстракта гљива рода *Ganoderma* на експерименталним животињама примењен је прооксидант алоксан у дози од 2 ml/kg интраперитонеално (*i.p.*).

3. Експериментални део

Животиње су добијале алоксан 2h након последње дозе H₂O суспензије гљиве или физиолошког раствора. 24h након примене алоксана вршено је жртвовање. Након жртвовања животињама је узиман 1 g јетре ради одређивања показатеља оксидативног стреса.

Од узетог ткива направљен је хомогенат користећи електрични хомогенизатор типа В, Braun, Potter S (Melsungen, Немачка). Хомогенат јетре је припреман са TRIS HCl пуфером (pH=7,4), у односу 1:3 (један део јетре : 3 дела пуфера) на температури од +4 °C.

Одређивање параметара оксидативног стреса у хомогенату ткива вршено је спектрофотометром Agilent 8453 UV/VIS (Santa Clara, SAD) према процедурама описаним у овом поглаљу.

Хепатопротективни ефекат EtOH и H₂O екстраката гљива *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* испитиван је на белим лабораторијским пацовима соја BALB/C (20-30 g) старости од 2-3 месеца. Животиње су боравиле у штали Завода за фармакологију, токсикологију и клиничку фармакологију Медицинског факултета у Новом Саду. Животиње су имале слободан приступ води и храни током целог дана. Биле су изложене смени дана и ноћи, а температура просторије била је од 21-24 °C. Влажност ваздуха је била 55±1,5 %. Методом случајног избора, животиње су биле подељене у више група.

После седам дана по пет животиња из сваке групе је жртвовано, јетра је брзо извађена, измерена (изражена као релативна маса јетре, PMJ), а затим хомогенизована у Potter хомогенизатору, са пуфером TRIS HCl/сахароза (50 mmol/0,25 ml, pH 7,4) у односу 1:3, на 4 °C. Добијени хомогенат је процеђен кроз газу и одређивани су биохемијски параметри из хомогената јетре, као и GSH из крви: садржај редукованог глутатиона (GSH) (Beuthler и др., 1983; Karetanović и Mיעyal, 1979), активност глутатион-пероксидазе (GSHPx) (Chin и др., 1976), глутатион-редуктазе (GSHR) (Glatzle и др., 1974), липидна пероксидација (LPx) (Buege и Aust, 1978), активност пероксидазе (Px) (Simon и др., 1974), каталазе (CAT) (Beers и Sizer, 1952) и ксантин-оксидазе (XOD) (Bergmeyer, 1970), као и садржај укупних протеина Биуретским тестом.

3. Експериментални део

Осталих пет животиња из сваке групе је примило алоксан *i.p.* (2 ml/kg) и након 24h животиње су жртвоване. У хомогенату јетре ових животиња одређени су набројани биохемијски параметри.

3.4.1. Одређивање интензитета липидне пероксидације (LPx) (Buege и Aust, 1978)

Липидна пероксидација је одређена помоћу тиобарбитурне киселине, при чему је мерена оксидација липида ћелијских мембрана преко реакције липид-пероксидних продуката насталих у реакционом систему са тиобарбитурном киселином на 535 nm (**Прилог 7.3.1.**).

3.4.2. Одређивање садржаја редукованог глутатиона (GSH) (Beuthler и др., 1983; Karpetanović и Mיעyal, 1979)

Садржај GSH одређен је на основу количине не-протеин сулфхидрилних остатака помоћу Ellman-овог реагенса у хомогенату јетре експерименталних животиња, мерењем апсорбанције на 412 nm (**Прилог 7.3.2.**).

3.4.3. Одређивање активности глутатион-пероксидазе (GSHPx) (Chin и др., 1976)

Глутатион пероксидаза катализује редукцију органског пероксида уз настајање оксидованог глутатиона GSSG. GSSG се поново редукује до GSH уз NADPH (као донора редукционих еквивалената), а редукцију катализује ензим глутатион редуктаза (GR). Активност GSHPx се прати спектрофотометријски, посредно праћењем пада апсорбанције на 340 nm која потиче од NADPH (**Прилог 7.3.3.; Табела 7.29.**).

3.4.4. Одређивање активности глутатион-редуктазе (GSHR) (Glatzle и др., 1974)

Глутатион редуктаза катализује редукцију оксидованог глутатиона (GSSG) уз NADPH као донора редукционих еквивалената. Активност GSHR се одређује спектрофотометријски, посредно преко брзине оксидације NADPH, чији максимум апсорбанције се мери на 340 nm (**Прилог 7.3.4.**).

3.4.5. Одређивање активности пероксидазе (Px) (Simon и др., 1974)

Активност Px одрађена је по методи Simon-а и сар. (1974), где је H₂O₂ кориштен као супстрат у присуству гвајакола.

3. Експериментални део

Гвајакол се оксидује при чему настаје обојени производ тетрагвајакол, чија количина се може мерити спектрофотометријски на 436 nm (**Прилог 7.3.5.; Табела 7.30.**).

3.4.6. Одређивање активности каталазе (САТ) (Beers и Sizer, 1952)

Активност каталазе је одређена по методи Beers и Sizer-a (1952). Мерена је апсорбанција неизреагованог H₂O₂, чији је максимум апсорбције на 240 nm (**Прилог 7.3.6.; Табела 7.31.**).

3.4.7. Одређивање активности ксантин-оксидазе (ХОД) (Bergmeyer, 1970)

Активност ХОД одређена је спектрофотометријски на основу промене оптичке густине на 293 nm при прелазу хипоксантина у мокраћну киселину (**Прилог 7.3.7.; Табела 7.32.**).

3.4.8. Одређивање концентрације укупних протеина (Gornall и Nardwall, 1949)

Укупни протеини одређени су биуретском методом модификованом према Gornall -у и Nardwall-у (1949), која се заснива на биуретској реакцији тј. особини пептидне везе да у базној средини са јонима Cu²⁺ гради плаво-љубичасти комплекс са апсорпционим максимумом на 540 nm (**Прилог 7.3.8.; Табела 7.33.**).

Статистичка обрада добијених резултата:

Сви тестови рађени су у три понављања, а резултати су изражени као средња вредност ± SD. Добијени подаци су статистички обрађени *one-way* ANOVA тестом (p < 0.05).

3.5. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИМИКРОБНЕ АКТИВНОСТИ ГЉИВА

Антимикробно (антибактеријско, антифунгално и антивирусно) дејство CHCl₃, H₂O и EtOH екстраката гљива *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. pfeifferi*, *G. resinaceum* је утврђено на референтним сојевима бактерија, вируса и гљива

3. Експериментални део

3.5.1. Бактеријски сојеви

Анализирани су екстрати гљива на шест бактеријских култура: Gram-негативних: *E. coli* ATCC11229, *S. enteritidis* ATCC13076, *K. pneumoniae* HP, *P. aeruginosa* ATCC3554 и Gram-позитивних: *S. aureus* ATCC6538, *B. cereus* DS.

Табела 3.14. Кориштени бактеријски сојеви у експерименталном поступку

Бактеријски сојеви	Ознака	Порекло изолата ATCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IZ-1	35554
<i>Staphylococcus aureus</i>	IZ-2	25923
<i>Enterococcus faecalis</i>	IZ-3	19433
<i>Enterobacter aerogenes</i>	IZ-4	13048
<i>Echerichia coli</i>	IZ-5	11775
<i>Proteus mirabilis</i>	IZ-6	12453
<i>Echerichia coli</i>	JR-1	11229
<i>Staphylococcus aureus</i>	JR-2	6538
<i>Bacillus cereus</i>	JR-6	11778

3.5.2. Суспензије микроорганизама и стандардизација инокулума

Суспензије микроорганизама добијене су додавањем ћелија једнодневних бактеријских култура (24h, 37 °C) израслих на косом хранљивом агару (МРА) у стерилан физолошки раствор. Свеже, чисте културе одржаване су пресејавањем (преношење микроорганизама са једне на другу хранљиву подлогу) у циљу одржавања виталности културе, ради испитивања раста културе на различитим подлогама, производње биомасе под различитим условима средине (Jarak и Đurić, 2004). Пресејавање је вршено методом исцрпљивања у стерилним коморама (ламинарима) у којима је претходно помоћу UV лампе стерилисан ваздух, а радна површина обрисана дезинфекционим средством. За пресејавање је кориштена еза, која је пре и после преношења чисте бактеријске културе стерилисана на пламену да не би дошло до контаминације култура. Након пресејавања, чисте културе у Петријевим посудама стављене су на инкубацију у термостат на 37 °C током 24h.

Након добијања чистих култура на чврстој Mueller Hinton агар подлози, вршен је поступак стандардизације инокулума по McFarland-у. Најчешће

3. Експериментални део

коришћен стандард је 0,5 McFarland-а, што одговара замућењу које настаје у реакцији између 99,5 ml 0,1 M раствора H_2SO_4 и 5 ml раствора 0,2 M $BaCl_2 \times 2H_2O$. Замућење је подешавано фотоелектричним фотометром при чему је кориштен црвени филтер (KOLORIMETAR MA 9504, Metrix). Метода је заснована на мерењу интензитета пропуштене светлости, односно апсорбације (A) или трансмисије (T), уз претходно експериментално дефинисану функционалну везу ових величина са концентрацијом (Krstić и Marjanović, 1998). На овај начин суспензија добија замућење у коме број ћелија апроксимативно износи $1,5 \times 10^8$ CFU (енг. *colony forming units*) које обезбеђује семиконфлуентан раст микроорганизама на Петри плочи са подлогом (раст ћелија у форми тепиха на Петри плочи).

3.5.3. Антибактеријска активност

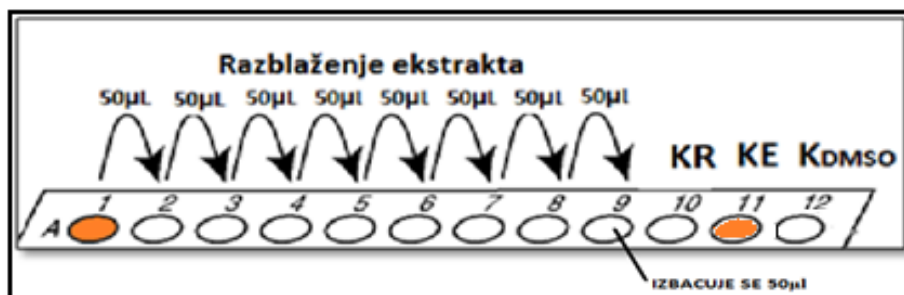
Одређивање MIC и MBC се може спроводити на чврстим или течним подлогама, а најчешће се користи метода разблажења или дилуциона метода која подразумева мешање серије разблажења анализираних узорака са подлогом која је претходно инокулисана тест организмом (Berghe и Vlietinck, 1991).

3.5.3.1. Минимална инхибиторна концентрација (MIC)

Минимална инхибиторна концентрација представља најнижу концентрацију неког антимикуробног агенса, која је потребна да се видно успори (инхибира) раст микроорганизама након 24h инкубације и ова концентрација представља релативну осетљивост микроорганизама на примењени агенс.

Шток раствори су разблажени директно током серије разређења у полипропиленским микротитатар плочама са 96 удубљења према шеми (Слика 3.10.).

3. Експериментални део



Слика 3.10. Шематски приказ серије дуплих микроразређења (KR-контрола раста; KE-контрола ekstrakta; K_{DMSO} -контрола растварача) (Blagojević, 2013)

Контрола раста: 50 μ l инокулисаног *Müller Hinton* бујона МНВ и 50 μ l стерилне dH_2O у циљу контроле виталности и раста тест културе бактерија

Контрола ekstrakta: 50 μ l стерилног ekstrakta и 50 μ l неинокулисаног МНВ због контроле контаминације антимикуробног агенса (ekstrakta) који се анализира

Контрола растварача: 5 μ l 100 % DMSO, 45 μ l стерилне dH_2O и 50 μ l неинокулисаног МНВ при коришћењу 10 %-ог штока у циљу провере утицаја самог растварача на раст и развој модел организама.

Након серије разређења и постављања контрола, дозирано је по 50 μ l инокулисаног МНВ у све велове, осим у контроле. Микротитар плоче су након тога стављене на инкубацију у трајању од 24h на 37 °C.

Након инкубације, у сваки бунарчић је дозиран 1 ml 1 %-ог раствора TTC и микротитар плоче су поново инкубиране 2h на 37 °C. Расвор TTC боји ћелије у ружичасто-црвену боју и омогућава бољу визуелизацију детекције раста бактеријске културе у бунарчићима.

3.5.3.2. Минимална бактерицидна концентрација (МВС)

Минимална бактерицидна концентрација представља најмању концентрацију антимикубног агенса, при којој је убијено 99,9 % тест организама након 24h инкубације, што представља смањење бројности од 99,9 % од финалне бројности бактерија у бујону ($1,5 \times 10^6$) у сваком бунарчићу унутар микротитар плоче.

Овај поступак одређивања МВС се наставља на претходни поступак утврђивања МІС. Микротитар плоче су након 24h инкубације, очитане на МІС

3. Експериментални део

вредности (прва концентрација у којој нема замућења), а затим је садржај сваког појединачног бунарчића (100 µl) засејан на Müller Hinton агар почев од оне концентрације за коју је утврђена MIC, па све до највеће анализиране концентрације антимикробног агенса.

3.5.3.3. Процена вредности MIC и MBC

Након инкубације од 18-24h, вршена је процена вредности MIC у микротитар плочама упоређивањем са количином раста у контролним бунарчићима. Приликом процене, вредност MIC представља прву концентрацију екстракта у чијем присуству у бунарчићу нема преципитације или замућења тј. очљивог бактеријског раста.

За одређивање вредности MBC, по 100 µl смеше из бунарчића у којима није било видног раста засејано је на Петри плоче са МНА и одложено у термостат током наредних 24h. Након инкубације врши се пребројавање израслих бактеријских колонија (CFU/mL) на свакој појединачној Петри плочи. Оптималан број колонија је од 30 до 300 на Петри плочама стандардне величине пречника од 90 mm.

3.5.3.4. Утврђивање антибактеријске активности

У овом делу експеримента упоређене су две класичне методе антимикробног "скрининга" на агаризованој подлози: методом бунарчића и диск-дифузионом техником.

Дифузиони тест у бунарчићима је кориштен за утврђивање антимикробне активности екстракта гљива концентрације од 10 % (w/v). Притом су употребљене следеће хранљиве подлоге:

хранљиви агар (TORLAK, Београд) као коси агар за култивацију бактерија које су чуване на на +4 °C и

Müller Hinton Агар Медијум (TORLAK, Београд) за утврђивање антимикробне активности.

Све чврсте подлоге су припремљене у 90 mm Петри плочама са око 22 ml Müller Hinton Агар медијума (TORLAK, Београд), што је резултовало финалном дебљином од 4 mm према процедури према Kirby-Bauer-овој процедури (Duraković, 1996). После сушења подлоге, агар је избушен са 6 бунарчића

3. Експериментални део

пречника 6 mm. После инкубирања на собној температури у трајању од 2h, плоче су третиране са по 50 μ l сваког појединачног екстракта гљива у четири различите концентрације (w/v-10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %) у три понављања, а затим инкубирани на 35 °C за 18-24h. Подлога је инокулисана са 0,1 ml суспензије тестираног микроорганизама, а разређења екстраката су прављена коришћењем dH₂O, која представља негативну контролу. Пречници инхибиторних зона мерени су након 24h инкубационог периода и изражени као растојање у mm, укључујући иницијалну величину бунарчића (6 mm).

Приликом примене диск-дифузионе технике, поступак је поновљен, али уместо “бушења” подлоге, на хранљиву подлогу су постављани “празни” бели стерилни дискови (HiMedia Laboratories; 0,6 cm) на које је аплициран екстракт (по 25 μ l). Употребљена су иста разређења екстракта (w/v- 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %) за сваки анализирани екстракт у 3 понављања.

3.5.4. Антифунгална активност

Антифунгална активност екстраката је проверена двома стандардним микробиолошким методама са циљем утврђивања минималне фунгицидне активности (MFC), тј. активности при којој долази до инхибиције раста културе гљива: *Aspergillus niger*, *Candida albicans* и *Saccharomyces cerevisiae*.

3.5.4.1. Диск дифузиона метода

Тест за утврђивање антифунгалне активности изведен је у 100 x 15 mm Петри плочама које су садржале сладни агар (Torlak, Србија). На удаљености од 0,5 cm од ивице мицелије постављени су бели стерилни дискови (HiMedia Laboratories; 0,6 cm). На дискове је аплицирана одређена количина екстракта (25 μ l). Плоче су инкубирани на 23 °C током 72h док се мицелијални раст није појавио на дисковима постављеним као контрола. Зона инхибиције око дискова којом се манифестује антифунгална активност јавља се у облику полумесеца (Ngai, 2004)

3. Експериментални део

3.5.4.2. Pour plate метода

Током овог испитивања урађена је још једна метода за одређивање антифунгалног ефекта врста *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*. Метода је кориштена за проверу минималне фунгицидне активности МФС - квантитативног својства. Употребљене су три дозе екстраката (200 μ l, 100 μ l, 50 μ l), различитих разблажења (10 %, 5 %, 1 %) које су додаване у подлогу. Екстракти различитих доза су додавани и помешани брзо у подлогу која је била охлађена на 45 °C. после стерилизације. Пошто је агар охлађен, инокулисана је мицелија централно, отприлике иста количина у сваку Петри плочу. За контролне пробе је кориштена dH₂O. После инкубације од 48h, на 30 °C, пречник мицелијалне колоније се мери и одређује инхибиција фунгалног раста у односу на контролу.

3.5.5. Антивирална активност

Кориштен је један *Bordetella bronchiseptica* специфични бактериофаг – vB_BbrS_LK3 (фамилија *Siphoviridae*). Као оригинални домаћин фага vB_BbrS_LK3 кориштен је референтни сој врсте *Bordetella bronchiseptica* ATCC 10580. Фаги су умножени на одговарајућем домаћину, преципитирани помоћу NaCl (58,4 g L⁻¹) и PEG6000 (1:10 w/v), исталожени центрифугирањем (11000 g 10 min на 4 °C) и пречишћени изопикничким ултрацентрифугирањем у дисконтинуалном градијенту CsCl (Sambrook и Russell, 2001). Након дијализе, суспензија фага у SM пуферу (50 mM Tris HCl [pH 7,5]; 0,1 M NaCl; 8 mM MgSO₄; 1 mg mL⁻¹ желатина) чуване су на 4 °C, а бактеријски сој на - 70 °C, у подлози са 10 %-ним глицеролом. Бактерије су за потребе експеримента гајене на течной Luria-Bertani подлози на 37 °C у току 24h.

Бактериофаги, чија је бројност у финалној запремини износила 1×10⁵ PFU/mL, помешани су са одабраним екстрактима чија се финална концентрација кретала од 0,20 до 300 mg/mL.

Контрола је подразумевала инкубацију бактериофага са највишом концентрацијом растварача, без додатка екстракта или испитиване супстанце. Припремљене смеше фага и екстракта инкубиране су на 37 °C у току 30 min, након чега је ефекат екстраката неутрализован десетостепеним разређивањем

3. Експериментални део

третираних бактериофага у SM пуферу. Контрола је третирана на идентичан начин. Након третмана одређиван је титар фага методом плака (Carlson, 2005), а број вијабилних фага у односу на контролу изражен је у процентима. Све анализе рађене су у трипликату, а резултати су приказани као средња вредност са стандардном девијацијом.

Реагенси:

Хранљиве подлоге: МНА подлога, λ TOP подлога
MPB подлога у којој се налази бактерија (референтни сој *Bordatella bronchiseptica* ATCC 10580)
200 ml vB_BbrS_56.1 вируса
SM пуфер, 120 ml екстракта

МНА подлога: Mueller Hinton agar 38 g у 1000 ml dH₂O

λ TOP: agar 6,50 g, Mueller Hinton бујон 21 g у 1000 ml dH₂O.

SM пуфер:

1. раствор: 5,80 g NaCl, 2 g MgSO₄ × 7H₂O;
2. раствор: 12,10 g 1M Tris HCl (pH 7,4), 100 ml dH₂O и cc HCl за подешавање pH вредности (\approx 5,6 ml)
3. раствор: 5 ml 2 % желатин (0,2 g + 9,8 ml dH₂O)

Помешани раствори 1, 2 и 3 се растворе у 1000 ml dH₂O.

Припремљене МНА подлоге се стерилишу у аутоклаву, потом се охладе на температуру од око 45 °C те разлију танко у петри плоче, и затим оставе да се охладе. За то време се направе разређења екстракта (употребљаване су следеће концентрације у зависности од врсте екстракта: 300, 200, 100, 50, 20, 10, 2, 0,2), и пре уношења вируса се инкубирају на 37 °C током 30 min. Разређења која су коришћена током експеримента су на 10⁻². Добијена разређења се заједно са инокулисаним вирусом (10 μ l) и бактеријом (100 μ l) помешају у полутечној λ TOP подлози и затим прелију преко МНА подлоге. Прави се смеша бактерије и вируса у полутечној λ TOP подлози која претходно стерилисана, и скувана стоји у воденом купатилу на температури од 60 °C. Затим се готова разређења са подлогама стављају на инкубацију на 37°C током 24h. Сутрадан се врши пребројавање вирусних плакова и уноси у табелу ради даље обраде статистичким методама.

3. Експериментални део

Принцип рачунања:

Процент антивиралне активности испитиваних екстраката израчунат је на основу пребројавања вирусних плакова у петријевим плочама.

$$\% \text{ инхибиције} = 1 - N_{\text{третмана}} / N_{\text{контроле}} \times 100$$

$N_{\text{третмана}}$ – број вируса у третману (проби)

$N_{\text{контроле}}$ – број вируса у контроли (растварачу/пуферу)

Резултат је изражен као средња вредност три мерења \pm SD (% антивиралне активности).

3.6. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИИНФЛАМАТОРНЕ АКТИВНОСТИ ГЉИВА

3.6.1. Одређивање броја тромбоцита

Тромбоцити анализирани у експерименту добијени су са Института за трансфузију (Нови Сад). Добијени тромбоцити налазили су се у специјалним кесама које представљају концентрат тромбоцита. Иако су тромбоцити застарели (после 5 дана) за медицинску употребу, и даље су вијабилни али је њихов број смањен. Тромбоцити се чувају, уз непрестано благо мешање на температури од 20 °C до 24 °C. Тачан број тромбоцита одређен је бројањем у Neubauer-овој комори након третирања тромбоцита 1 % $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, при чему се под микроскопом варијабилни тромбоцити уочавају као светлуцаве честице.

Број тромбоцита се одређује на основу димензије коморе и разблажења тромбоцита. Висина коморе износи 0,1 mm, док површина једног квадратића у ком се броје тромбоцити износи 0,04 mm², тако да је запремина у којој се броје тромбоцити 4×10⁻³ mm³ тј. 4×10⁻⁶ ml.

$$\text{Број тромбоцита/ml} = (\text{средња вредност избројаних тромбоцита} \times \text{разблажење (100)}) / (4 \times 10^{-6})$$

3.6.2. Експериментални поступак за одређивање антиинфламаторне активности

Антиинфламаторна активност анализираних екстраката одређена је по модификованој методи Веага и сар. (Веага и др., 2010).

3. Експериментални део

Метода је заснована на одређивању способности инхибиције продукције медијатора инфламације, продуката метаболизма арахидонске киселине (12-ННТ, ТХВ₂ и РГЕ₂ и ензима 12-ЛОХ) у интактном ћелијском систему (хуманим тромбоцитима), где је процес инфламације изазван дејством калцијумове јонофоре А23184 (калцимицин).

Метаболити арахидонске киселине су раздвојени и квантификовани LC-MS/MS методом.

Метода је заснована на одређивању способности инхибиције продукције медијатора инфламације, продуката метаболизма арахидонске киселине, 12-ННТ, ТХВ₂ и РГЕ₂ и ензима 12-ЛОХ, у интактном ћелијском систему (хуманим тромбоцитима), где је процес инфламације изазван деловањем калцијумове јонофоре А23184 (калцимицин).

Реагенси:

Пуфер (рН 7,2): 4,0033 g NaCl, 0,1006g KCl, 0,1361g KН₂PO₄, 0,8899g Na₂HPO₄ × 2 H₂O и 0,4500 g глюкоза монохидрата у 500 ml dH₂O

Основни раствор калцимицина (А23187; 1,9 mmol/L): 1 mg калцимицина у 1 ml DMSO

Радни раствор калцимицина (А23187; 125 μmol/L): 0,6580 ml основног раствора калцимицина допуњено са DMSO-м до 10 ml

CaCl₂ (16,66 mmol/L): 0,0186g CaCl₂ у 10 ml dH₂O

НСООН (1%): 5 ml ссНСООН помешано са 495 ml dH₂O

Основни раствор PGB₂ (0.1mg/mL): 1mg PGB₂ у 10 ml DMSO

Радни раствор PGB₂: 0.6 ml основног раствора PGB₂ допуњено са DMSO до 10 ml

(NH₄)₂C₂O₄ (1%): 1,1450g (NH₄)₂C₂O₄ × H₂O у 100 ml dH₂O

Поступак:

Од екстраката почетних концентрација 200 и 300 mg/mL (растворени у DMSO-у), направљена је серија од шест раствора разблажења, па је распон почетних концентрација екстраката 3,6 до 100, односно од 10 до 300 mg/mL. Стандардни инхибитори продукције испитиваних метаболита арахидонске киселине и ензима 12-ЛОХ, аспирин и кверцетин анализирани су у следећем распону концентрација: 0,01-0,60 mg/mL, односно 0,156-5,0 mg/mL.

Фазе експерименталне процедуре за одређивање инхибиције продукције метаболита 12-ННТ, ТХВ₂ и РГЕ₂ и ензима 12-ЛОХ приказане су у **Табели 3.15.**

На основу односа површине пика метаболита (12-ННТ, ТХВ₂, РГЕ₂ и 12-НЕТЕ) и површине пика интерног стандарда (PGB₂) добијене су вредности R_{гп} (радна

3. Експериментални део

проба), $R_{кор}$ (корекција), $R_{кон}$ (контрола) и $R_{сп}$ (слепа проба) за одговарајуће пробе, а инхибиција продукције метаболита и ензима рачуната је следећом једначином:

$$I (\%) = (1 - (R_{гр} - R_{кор}) / (R_{кон} - R_{сп})) \times 100 \%$$

На основу добијене I вредности, одређене су IC_{50} вредности читавањем са одговарајућег графикона (функција I (%) у зависности од радне концентрације), а резултат је изажен као средња вредност три добијене IC_{50} вредности \pm SD (mg/mL, односно nL/mL).

Табела 3.15. Експериментални поступак за одређивање инхибиције продукције метаболита 12-ННТ, ТХВ₂ и РGE₂ и ензима 12-LOX

РАДНА ПРОБА	КОРЕКЦИЈА	КОНТРОЛА	СЛЕПА ПРОБА
4×10 ⁸ тромбоцита у 2,0ml пуфера рН 7,2	4×10 ⁸ тромбоцита у 2,0ml пуфера рН 7,2	4×10 ⁸ тромбоцита у 2,0ml пуфера рН 7,2	4×10 ⁸ тромбоцита у 2,0ml пуфера рН 7,2
0,1 ml екстракта (стандарда) 0,1 ml А231787	Инкубација 5 min на 37 °C уз благо мућкање 0,1 ml екстракта (стандарда) 0,1 ml DMSO	0,1 ml DMSO 0,1 ml А231787	0,1 ml DMSO 0,1 ml DMSO
0,3 ml CaCl ₂	Инкубација 2 min на 37°C уз благо мућкање 0,3 ml d H ₂ O	0,3 ml CaCl ₂	0,3 ml d H ₂ O
5,8 ml HCOOH (4°C)*	Инкубација 5 min на 37°C уз благо мућкање 5,8 ml HCOOH (4 °C)*	5,8 ml HCOOH (4 °C)*	5,8 ml HCOOH (4°C)*
50µl PGB ₂ 8ml смеше CHCl ₃ :MeOH (1:1)	50µl PGB ₂ 8ml смеше CHCl ₃ :MeOH (1:1) Екстракција (интензивно мућкање, Vortex) 15 min Центрифугирање 7012xg, 15 min на 4 °C Одвајање органског слоја Упаравање Растварање сувог остатка у 0,5 ml MeOH Цеђење преко милипор филтера LC-MS/MS анализа	50µl PGB ₂ 8ml смеше CHCl ₃ :MeOH (1:1)	50µl PGB ₂ 8ml смеше CHCl ₃ :MeOH (1:1)

* у случају да се формира гел, смеша се пре додатка 1 % HCOOH интензивно мућка (Vortex) до течног стања

Оптимизовани LC-MS/MS параметри:

За хроматографско раздвајање коришћена је Zorbax SB-C18 30mm×2,1mm×3,5µm (Agilent Technologies) реверсно-фазна колона при температури од 65 °C. Бинарна мобилна фаза састојала се од 0,6 % сирћетне киселине (А) и метанола (В), а проток је износио 1ml/min. Примењен је градијентни мод који је подразумевао следећи однос фаза: 0min 65 % В, 2 min

3. Експериментални део

100 % В, 3,5 min 100 % В, са пост-временом од 3 min. Инјектована запремина свих узорака је била 5 μ l. ESI параметри били су: гас за сушење (N₂) температуре 350 °C, проток 9l/min, притисак гаса небулајзера 40 psi и напон на капилари 4 kV, а остали оптимизовани параметри приказани су у **Табели 3.16**. Квантификација једињења урађена је у негативном MRM моду.

3. Експериментални део

Табела 3.16. Оптимизовани параметри за квантификацију 12-ННТ, ТХВ₂, 12-НЕТЕ и РГВ₂

Једињење	Мод	Поларитет јона	Јонска врста	Јон прекурсор (m/z)	Јон производ (m/z)	Колизиона енергија (V)	Напон фрагментора (V)
12-ННТ	MRM	NI	[M -H] ⁻	279	261	5	120
ТХВ ₂	MRM	NI	[M -H] ⁻	369	169	15	120
РГЕ ₂	MRM	NI	[M -H] ⁻	351	271	15	120
12-НЕТЕ	MRM	NI	[M -H] ⁻	319	310	7	120
РГВ ₂	MRM	NI	[M -H] ⁻	333	315	13	120

3. Експериментални део

3.7. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЕ АКТИВНОСТИ ГЉИВА

У овом раду испитивана је антипролиферативна активност EtOH и H₂O екстраката гљива на MCF-7 ћелијској линији естроген-зависног (ER⁺) карцинома дојке, праћено колориметријским МТТ тестом (Mosmann, 1983), који се користи за одређивање броја живих ћелија у тестовима пролиферације и осетљивости на различите супстанце. Принцип методе се заснива на редукцији тетразолијумове соли [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид] (МТТ) у плаво обојени производ (формазан), у присуству митохондријалног ензима сукцинат дехидрогеназе. Количина награђеног формаза директно је пропорционална броју вијабилних ћелија, а апсорбанца се одређује спектрофотометријски, на две таласне дужине: 540 и 690 nm.

За испитивање утицаја екстраката гљива на пролиферацију MCF-7 ћелија, направљени су раствори у диметилсулфоксиду (DMSO, Fluka, Chemie) почетних концентрација 50 и 100 mg/mL у зависности од испитиване врсте. Радни раствори прављени су разблаживањем основног раствора у DMSO-у у распону радних концентрација од 0,33 до 1500 µg/mL.

3.7.1. Припрема ћелија

Ћелије континуалне ћелијске линије канцера дојке (MCF-7) употребљене у експерименту добијене су са Института за плућне болести (Сремска Каменица, Нови Сад). Ћелије су гајене у фласку и испиране са 1 ml 0,01 % раствора трипсина, након чега је додато 2 ml 0,01 % раствора трипсина и остављене у инкубатор 5 min да би дошло до одвајања ћелија од зида посуде. Након тога је додато 18 ml одговарајућег медијума (MEM, DMEM) који садржи 10 % FCS, и добијено 20 ml суспензије у којој су ћелије бројене. Број живих ћелија у суспензији одређује се ТВЕ тестом (Trypan Blue Exclusion тест) према наведеној процедури: у 50 µl суспензије ћелија додаје се 50 µl Trypan blue 0,4 %. Мртве ћелије се обоје, јер боја пролази кроз њихову мембрану па се под светлосним микроскопом виде као плаво обојене, док живе ћелије остају необојене. Живе ћелије се броје у Nauber-овој комори за бројање леукоцита. Након одређивања броја ћелија у суспензији,

3. Експериментални део

припрема се потребна количина нове суспензије тако да количина живих ћелија буде 50000/1 ml. Из овако припремљене финалне суспензије ћелије су сађене у микротитар плоче.

3.7.2. Сађење ћелија

Ћелије се саде у микротитар плоче из финалне суспензије ћелија (концентрација 50000 ћелија/1 ml). У сваки вел се додаје 0,1 ml, односно 5000 ћелија. Ћелије се саде само у унутрашње велове, док се у спољашње додаје 0,1 ml одговарајућег медијума. Овако засађене ћелије инкубирају се у CO₂ инкубатору 24h, и током тог периода живе ћелије се причврсте за подлогу плоче и успостављају нормалну метаболичку активност.

Третман:

Након периода опоравка ћелија од 24h, из плоча се након инкубације уклања медијум из велова. У велове намењене за третман додаје се 0,1 ml свежег одговарајућег медијума са 10 % FCS, који садржи одговарајућу концентрацију испитиваног екстракта. Узорци за третман су припремљени сукцесивним разблаживањем основног раствора узорка у медијуму. Као растварач за основни узорак користи се DMSO, док је серија разблажења направљена у одговарајућем медијуму 10 % FCS тако да садржај DMSO у медијуму не прелази 1 %. У велове намењене за слепу пробу и контролне велове додаје се само 0,1 ml свежег медијума. Плоче се затим враћају у инкубатор и инкубирају различит временски период: 24 и 72h.

3.7.3. Мерење цитотоксичности помоћу МТТ теста

По истеку времена инкубације, постојећи медијум се одлива и у све велове се додаје раствор МТТ (10 µl) у концентрацији од 0,5 mg/mL, који се припрема у медијуму непосредно пре додавања. Додаје се 100 µl раствора у сваки вел, тако да се финално добија концентрација 0,05 mg/велу. Следи инкубација у трајању од 3h, у инкубатору, на 37 °C, 5 % CO₂. По истеку инкубационог времена, медијум се

3. Експериментални део

одлива из велова. Додаје се 100 μ l 0,04 М НСl у изопропанолу. Након истека следи инкубација у периоду од 10 min на собној температури. Апсорбанција се мери спектрофотометријски на две таласне дужине: $A_1=540$ nm и $A_2=690$ nm. Коначна апсорбанција се рачуна на следећи начин:

$$A_{uzorka} = A_1 - A_2$$

На основу добијених резултата, цитотоксичност се рачуна према формули:

$$Cit (\%) = (1 - A_{uzorka} / A_{kontrola}) \times 100 \%$$

Статистичка обрада података:

Сви подаци добијени у испитивањима антипролиферативног ефекта екстраката гљива обрађени су помоћу софтверског пакета Microsoft Excel for Windows, v. 2007. Програм је кориштен за израчунавање средње вредности и стандардне девијације (SD), док је одређивање IC₅₀ вредности кориштен Origin 8.0.

На основу Cit (%) вредности одређене су IC₅₀ вредности (концентрација при којој је инхибиран раст 50 % ћелија канцера) читавањем са одговарајућег графикона (функција Cit (%) у зависности од радне концентрације (μ g/ml)), а резултат је изражен као средња вредност три одређене IC₅₀ вредности \pm SD (μ g/mL).

3.8. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИДИЈАБЕТОГЕНЕ АКТИВНОСТИ ГЉИВА

3.8.1. Експерименталне животиње

У огледу су анализирани здрави, бели лабораторијски пацови, оба пола, соја Wistar, телесне масе 200-370 g, који су одабрани методом случајног избора из окота Војно-медицинске академије у Београду. Лабораторијске животиње су боравиле у Uni-Protect (Ehret, Emendigen, Немачка) ормарима за чување лабораторијских животиња са системом филтера за проток ваздуха, у Заводу за фармакологију, токсикологију и клиничку фармакологију Медицинског факултета у Новом Саду. У ормарима је температура ваздуха одржавана између 20 и 25 °C, уз контролу влажности ваздуха и одржавање циркадијалног ритма (смена дана и ноћи у трајању од 12h). Животиње су имале приступ води и храни за ситне

3. Експериментални део

лабораторијске животиње (Ветеринарски институт Земун, Србија). Животиње нису имале приступ храни 6h пре мерења нивоа гликемије.

Извођење огледа је одобрено на седници одржаној 05.10.2009. од стране Етичке комисије Универзитета у Новом Саду за рад на експерименталним животињама.

3.8.1.1. Третман и подела експерименталних група

У оквиру испитивања у циљу праћења антидијабетогеног ефекта екстракта гљива *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*, животиње су биле подељене у две експерименталне групе. Експерименталне групе су формиране методом случајног избора, при чему је свака група бројала по пет подгрупа. Испитиване животиње су насумично подељене на експерименталне и контролне групе, при чему је свака подгрупа бројала по шест животиња. Све животиње су биле подвргнуте мерењу телесне масе, као и гликемије непосредно пре почетка огледа и након завршетка огледа. *Per os* третман животиња је вршен назогастричном сондом.

Распоред експерименталних група је био следећи (**Прилог 7.7.; Табела 7.48.-8.50.**):

1. Експериментална група:

Контролна група (физиолошки), која је третирана физиолошким раствором у дози од 1 ml/kg *per os* током 5 дана

Нормогликемична група *G. pfeifferi*, EtOH, која је третирана EtOH екстрактом гљиве *G. pfeifferi* у дози од 1 ml/kg *per os* током 5 дана.

Нормогликемична група *G. pfeifferi*, H₂O, која је третирана H₂O екстрактом гљиве *G. pfeifferi* у дози од 1 ml/kg *per os* током 5 дана.

Нормогликемична група *G. resinaceum*, EtOH, која је третирана EtOH екстрактом гљиве *G. resinaceum* у дози од 1 ml/kg *per os* током 5 дана.

Нормогликемична група *G. resinaceum*, H₂O, која је третирана H₂O екстрактом гљиве *G. resinaceum* у дози од 1 ml/kg *per os* током 5 дана.

2. Експериментална група:

Контролна група (алоксан), која је третирана алоксаном у дози од 150 mg/kg, а затим физиолошким раствором у дози од 1 ml/kg *per os* током 5 дана

Хипергликемична група *G. pfeifferi*, EtOH, која је третирана алоксаном у дози од 150 mg/kg, а затим EtOH екстрактом гљиве *G. pfeifferi* у дози од 1 ml/kg, *per os* током 5 дана.

Хипергликемична група *G. pfeifferi*, H₂O, која је третирана алоксаном у дози од 150 mg/kg, а затим H₂O екстрактом гљиве *G. pfeifferi* у дози од 1 ml/mg, *per os* током 5 дана.

3. Експериментални део

Хипергликемична група *G. resinaceum*, EtOH, која је третирана алоксаном у дози од 150 mg/kg, а затим EtOH екстрактом гљиве *G. resinaceum* у дози од 1 ml/kg, *per os* током 5 дана.

Хипергликемична група *G. resinaceum*, H₂O, која је третирана алоксаном у дози од 150 mg/kg, а затим H₂O екстрактом гљиве *G. resinaceum* у дози од 1 ml/kg, *per os* током 5 дана.

Последњег дана огледа, 2h након примене последње дозе гљиве, односно извођења предвиђених фармакодинамичких тестова, животиње су анестезиране 25 % раствором уретана (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA), у дози од 5 ml/kg интраперитонеално (*i.p.*). Након губитка рефлекса усправљања, животиње су жртвоване ексангвинацијом (кардиопункцијом) у циљу узимања узорака крви и других ткива за даља испитивања.

3.8.2. Фармакодинамичка испитивања

За испитивање утицаја EtOH и H₂O екстраката гљива *G. pfeiffei* и *G. resinaceum* на гликемију здравих и дијабетичких животиња кориштена су два теста: индукција трајне хипергликемије алоксаном и тест оралног оптерећења глукозом.

3.8.2.1. Индукција трајне хипергликемије алоксаном

За овај тест кориштен је алоксан (alloxan monohydrate, Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA), нестабилна хидрофилна супстанца са кратким полуживотом (1,5 min) структурно слична глукози. Алоксан се везује за GLUT2 глукозне транспортере смештене на површини β-ћелија панкреаса, улази у исте где стварањем ROS-а доводи до селективног оштећења ћелија. Смрт β-ћелија коју изазива алоксан је тип некрозе, за разлику од смрти β-ћелија настале код оболелих од *D. melitusa* типа 1 која је тип апоптозе, зато се овај тип дијабетеса назива алоксански дијабетес (Etuk, 2010; Lenzen, 2008; Szkudelski, 2001).

Алоксан је растваран у физиолошком раствору непосредно пре апликације и припремљен у дози од 150 mg/kg једнократно интраперитонеално (*i.p.*). 48h након примене алоксана одређује се ниво гликемије у циљу провере да ли је дошло до оштећења панкреаса. Животиње које су тада имале гликемију вишу од

3. Експериментални део

15 mmol/L биле су укључене у даљи ток испитивања, односно примењивани су им EtOH и H₂O екстракти анализираних гљива.

3.8.2.2. Тест оралног оптерећења глюкозом

2h након примене последње дозе физиолошког раствора или екстракта гљиве, животињама 2. *Експерименталне групе* (нормогликемичне животиње) дат је раствор глюкозе (0,5 g/mL) у дози од 3 g/kg. Непосредно пре примене засићеног раствора глюкозе, одређена је стартна гликемија. 30 min касније поново је измерен ниво глюкозе у крви како би се утврдило да ли употребљени екстракти гљива утичу на смањење нивоа гликемије и у којој мери.

3.8.2.3. Мерење глюкозе у крви

Концентрација глюкозе у капиларној крви, узете из репне вене пацова, одређивана је комерцијалним китовима на апарату Accu-check Active (Roche Bazel, Швајцарска). Концентрација глюкозе у крви нормогликемичних животиња мерена је непосредно пре почетка третмана и 2h након последње дозе примењеног екстракта гљиве или физиолошког раствора. Концентрација глюкозе у крви хипергликемичних животиња (2. *Експериментална група*) је одређивана непосредно пре примене алоксана, 48h од примене алоксана и 2h након примене последње дозе екстракта гљиве или физиолошког раствора.

3.8.3. Морфолошка испитивања

3.8.3.1. Хистолошка техника обраде ткива

Све јединке су жртвоване увођењем у општу анестезију помоћу уретана у концентрацији од 0,8 g/kg телесне тежине интраперитонеално (*i.p.*). Након еутаназије од сваке јединке узето је ткиво јетре, бубрега и спленичног региона панкреаса за хистолошку анализу. Узорци су фиксирани у 4 % пуферисаном формалину током 24h, потом дехидрирани у растућим концентрацијама изопропанола и калупљени у парафин. Користећи ротациони микротом марке Leica (Немачка) ткиво је сечено при дебљини од 5 μ m и бојено методом хематоксилин и еозин (ХЕ). Добијени хистолошки препарати анализирани су на

3. Експериментални део

оптичком микроскопу DM LB марке *Leica* (Немачка) при увеличању објектива од 20x и окулару од 10x, и фотографисани камером MC190HD марке *Leica* (Немачка), а добијене фотографије обрађене у програму LAS марке *Leica* (Немачка).

3.8.3.2. Статистичка обрада података

Статистичка значајност разлика одређених група је испитивана Tukey-евим тестом (ANOVA). Вредности су изражене преко средње вредности \pm SD три понављања.

Статистичке хипотезе су тестиране на нивоу статистичке значајности ($p < 0,05$, односно $p < 0,01$).

3.8.4. Одређивање биохемијских параметара и испитивање функције бубрега и јетре

Од биохемијских параметара у серуму одређивана је концентрација липида (липидни статус). У циљу праћења јетрене и бубрежне функције у серуму испитиваних животиња одређивана је ензимска активност аспартат аминотрансферазе (AST) и аланин аминотрансферазе (ALT) и концентрације урее и креатинина. Све анализе су рађене према стандардним спектрофотометријским методама на аутоматском систему за хемијске анализе Olympus AU 400 (Hamburg, Немачка).

3.8.4.1. Липидни статус

Концентрација укупног холестерола одређивана је методом CHOD-POD (холестерол/оксидаза/пероксидаза). Индикатор је хинонимин настао у реакцији 4-аминопирина, фенола и водоник пероксида катализоване пероксидазом (Мајкић-Sing и др., 1995; Spasić и др., 2003).

Одређивање концентрације укупних триглицерида вршено је ензимском CPO-POD (глицерол-3-фосфат/оксидаза/пероксидаза) методом након ензимског раздвајања помоћу липопротеин липазе. Индикатор је хинонимин, настао у реакцији 4-аминоантипирина, 4-хлорфенола и водоник пероксида катализоване пероксидазом (Мајкић-Sing и др., 1995; Spasić и др., 2003).

3. Експериментални део

Одређивање концентрације HDL холестерола вршено је методом СНЕ-СНО-POD (холестерол/естераза/оксидаза/пероксидаза). Хиломикрони, липопротеини веома ниске густине (VLDL) и LDL честице из узорка крви исталоже се деловањем 12-волфрамфосфорне киселине и јона магнезијума и након центрифугирања у супернатанту остају само HDL честице. Садржај холестерола у HDL честицама се потом одређује ензимском методом помоћу холестеролског реагенса (Мајкић-Sing и др., 1995; Spasić и др., 2003).

Одређивање вредности LDL холестерола вршено је емпиријски, рачунањем помоћу Friedewald-ове формуле. За рачунање LDL холестерола путем ове формуле кориштене су добијене вредности укупног холестерола, HDL холестерола и укупних триглицерида. Индекс атеросклерозе је добијен из односа LDL холестерола и HDL холестерола (Мајкић-Sing и др., 1995; Spasić и др., 2003).

Friedewald-ова формула:

$$\text{LDL (mmol/L)} = \text{укупни холестерол} - \text{HDL} - 0,45 \times \text{укупни триглицериди}$$

3.8.4.2. Параметри бубрежне функције

Концентрација уреје у серуму животиња одређивана је методом GLDH-UV. У првој реакцији уреа под утицајем ензима уреазе хидролизује на амонијак и угљендиоксид. У индикаторској реакцији формиран амонијум јони реагују са α -кетоглутаратом, у реакцији катализованој од стране глутамат-дехидрогеназе (GLDH), где истовремено долази до оксидације NADH. Смањење концентрације NADH је директно пропорционално са концентрацијом уреје у узорку (Spasić и др., 2003).

Концентрација креатинина у серуму животиња је одређивана методом Jaffe. У реакцији креатинина са алкалним пикратом настаје Јановски комплекс, који је црвено-наранџасте боје. Мерењем апсорбанције одређена је концентрација креатинина (Spasić и др., 2003).

3.8.4.3. Параметри јетрене функције

Калитичка концентрација аспатат аминотансферазе (AST) у серуму животиња је мерена методом IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and

3. Експериментални део

Laboratory Medicine). У реакцији трансминације, између L-аспартата и 2-кетоглутарата настаје оксалоацетат. Оксалоацетат у следећој реакцији, катализованој од стране малат дехидрогеназе оксидује NADH. У наведеној методи промена брзине оксидације NADH у индикаторској реакцији пропорционална је концентрацији AST (Мајкић-Sing и др., 1995; Spasić и др., 2003).

Каталитичка концентрација аланин аминотрансферазе (ALT) у серуму животиња је мерена IFCC. У реакцији трансминације, између L-аланина и 2-оксоглутарата настаје пируват. Пируват у следећој, индикаторској реакцији, катализованој од стране лактат-дехидрогеназе, оксидује NADH. У овој методи промена брзине реакције оксидације NADH и индикаторској реакцији је пропорционална концентрацији ALT (Мајкић-Sing и др., 1995; Spasić и др., 2003).

4.

РЕЗУЛТАТИ

И

ДИСКУСИЈА



4. Резултати и дискусија

4.1. ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И КВАНТИТАТИВНА АНАЛИЗА ЕКСТРАКТА ГЉИВА

4.1.1. Одређивање садржаја макро- и микро-елемената атомском апсорпционом спектрофотометријом (AAS)

AAS спектрофотометријском техником у испитиваним гљивама *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* детектовани су макро- и микроелементи чији је садржај приказан у **Прилогу 7.1.1.**; **Табеле 7.1.** и **7.2.** и на **Хистограму 4.1** и **4.2.** У **Табели 7.1.** претстављени су резултати детекције макроелемената у гљивама рода *Ganoderma*, по mg детектованог макроелемента по g суве материје испитиване гљиве (mg/g с.м.). Овим експериментом је утврђено да су јони Ca^{2+} и K^{+} присутни у већим количинама у односу на јон Mg^{2+} код свих врста гљива (осим *G. resinaceum* где је утврђено да је јон K^{+} присутнији у дупло већим количинама у односу на Ca^{2+} и Mg^{2+} (1,90 mg/g), што је у сагласности са претходно објављеним резултатима (Chittaragi и Naika, 2014; Nagaraj и др., 2013).

С обзиром да су К и Р једни од главних конституената гљива са око 60 % (Mattila и др., 2001), низак садржај наведених макроелемената код гљива рода *Ganoderma* може се сматрати разлогом због чега се ове врсте убрајају у Polyporus фамилију која је споријег раста и мање обogaћена јонима К (Nagaraj и др., 2013).

Разлике међу врстама су према количини присутних макроелемената биле статистички значајне (издвојене су 4 групе), са изузетком јона Mg^{2+} чији садржај између врста *G. lucidum* и *G. pfeifferi* није статистички значајан (**Прилог 7.1.1.**; **Табела 7.1.**, Tuckey тест, ANOVA).

G. applanatum је најбогатија јоном Ca^{2+} (2,62 mg/g), иако је веома сличан садржају K^{+} није много мањи (2,18 mg/g), док је количина присутног јона Mg^{2+} око 2 пута мања (0,91 mg/g). Код *G. lucidum* и *G. pfeifferi* најприсутнији испитивани макроелемент је био Ca^{2+} (3,66, односно 5,55 mg/g), док је Mg^{2+} детектован у око 2 пута мањој количини, а K^{+} за око 4, односно 5 пута.

У поређењу са претходно објављеним резултатима (Baldrian, 2003; Chittaragi и Naika, 2014; Karaman и Matavulj, 2005; Nagaraj и др., 2013), може се рећи да еколошко станиште доста утиче на садржај макроелемената код лигниколних

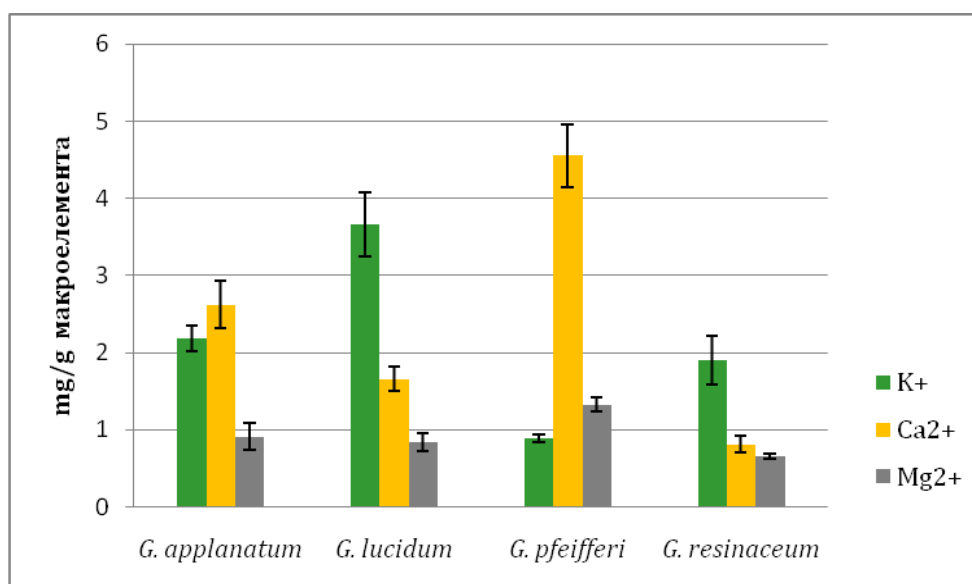
4. Резултати и дискусија

гљива, с обзиром да добијени резултати за врсте *G. applanatum* и *G. lucidum* много више корелирају са добијеним резултатима за исте врсте гљива са територије Фрушке Горе (Karapan и Matavulj, 2005), у односу на врсте са територије Индије (Chittaragi и Naika, 2014; Nagaraj и др., 2013).

У прегледаним литературним подацима, доминира садржај испитиваних макроелемената код врста *G. applanatum* и *G. lucidum*, док за врсте *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* нема доступних резултата.

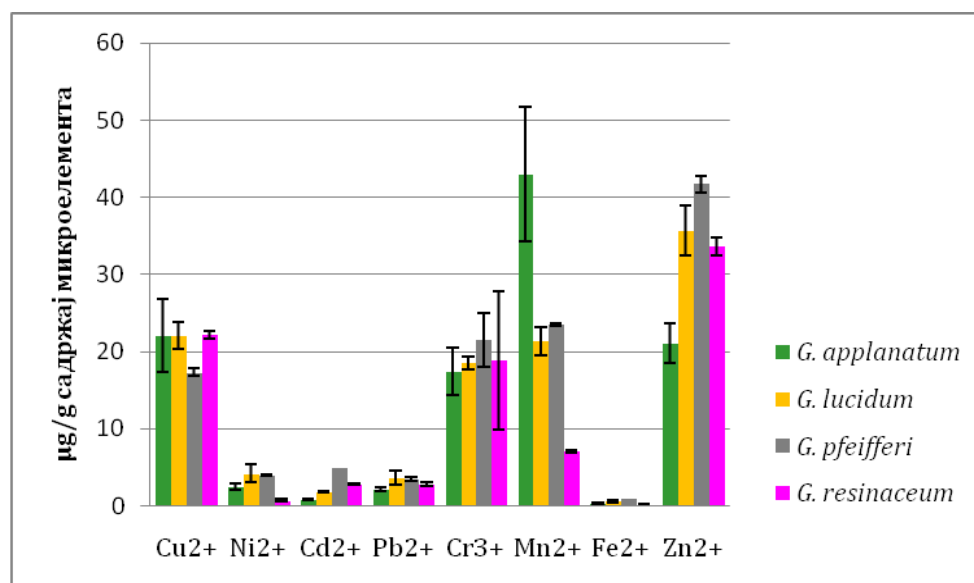
Количина одређених микроелемената такође је представљена у **Прилог 7.1.1.**; **Табела 7.2.** и на **Хистограму 4.2.** у јединици ($\mu\text{g/g}$ с.м. – mg детектованог микроелемента по kg суве материје испитиване гљиве). Све четири испитиване врсте су запажене као врло добри акумулатори јона Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} и Cu^{2+} , нешто слабији акумулатори јона Pb^{2+} и Cd^{2+} , док је јон Fe^{2+} детектован у врло малим количинама ($0,19\text{-}0,94 \mu\text{g/g}$).

Хистограм 4.1. Садржај испитиваних макроелемената (mg/g) у сувим остацима гљива ААС техником



4. Резултати и дискусија

Хистограм 4.2. Садржај испитиваних микро елемената ($\mu\text{g/g}$) у сувим остацима гљива ААС техником



Количине присутних микроелемената су истог реда величине код врста *G. applanatum* и *G. lucidum* што је вероватно последица заједничког локалитета (Моровићке шуме, Фрушка Гора), али не постоје нека велика одступања код преостале две испитиване врсте, што иде у прилог чињеници да лигниколне гљиве апсорбују материје како из дрвне материје на којој расту директно, тако и земљишта, индиректно, чиме одређују свој минерални састав (Ayaz и др., 2011).

Од тешких метала су одређени садржаји следећих елемената: Cr, Pb и Cd, међу којима Cr значајно доминира по концентрацији (17,46-21,49 $\mu\text{g/g}$). Уопштено говорећи, *G. lucidum* и *G. pfeifferi* су се показале као нешто бољи акумулатори микроелемената него друге две анализиране врсте. У погледу садржаја тешких метала у нашем раду, у односу на друге литературне податке, испитиване гљиве се могу сматрати суперакумулаторима јона Cr³⁺ (17,48-21,49 $\mu\text{g/g}$), али и врстама са нижим садржајем јона Pb²⁺ (2,22-3,70 $\mu\text{g/g}$) (Chittaragi и Naika, 2014; Karaman, 2002; Karaman и Matavulj, 2005). Ово се може тумачити есенцијалношћу елемента Cr³⁺ у односу на неесенцијални јон Pb у метаболизму гљива

Као добар акумулатор јона Cd²⁺ и Pb²⁺ може се сматрати *G. lucidum*, што је у сагласности са претходно објављеним резултатима (Stilinović и др., 2015). *G. applanatum* се показала као врста са најнижим садржајем јона Pb (2,22 $\mu\text{g/g}$),

4. Резултати и дискусија

који у нижим концентрацијама није опасан иако може испољити токсично дејство у вишим концентрацијама. Само неки тешки метали су са једне стране есенцијални за метаболизам гљива, док је са друге стране за неке од њих није позната биолошка улога иако чине кофакторе ензимских реакција, али је познато и њихово токсично дејство уколико су присутни у сувишку. Разумевање механизма токсичности јона тешких метала може бити од користи при дизајнирању нових антифунгалних агенаса која могу наћи своју примену у заштити дрвета, у циљу селективног спречавања дрвне трулежи без последица по животну средину (Ayaz и др., 2011; Falandysz и Borovička, 2012). Концентрација и доступност јона тешких метала је генерално много већа у земљишту него у дрвету, а такође може бити знатно повишена као последица индустријског загађења (Baldrian, 2003).

Иако се гљиве сматрају добрим акумулаторима јона Zn^{2+} , резултати добијени у нашем раду су и до 2x нижи у односу на резултате добијене за гљиве са подручја Индије (21,09, односно 52,80 $\mu\text{g/g}$ за врсту *G. lucidum*) што може бити последица директног утицаја окружења на раст гљива тј. раста на другачијем саставу супстрата (земљишта, дрвета) који утиче на састав ових елемената у плодним телима (Chittaragi и Naika, 2014; Manzi и др., 1999).

Анализом добијених резултата, од испитаних микроелемената анализиране врсте рода *Ganoderma* се могу сматрати суперакумулаторима јона Zn^{2+} (21,09-41,70 $\mu\text{g/g}$). Анализом садржаја јона Pb^{2+} за испитиване врсте (2,22-3,70 $\mu\text{g/g}$), и добијеног опсега може се закључити да постоји ниска тенденција за акумулацијом јона Pb^{2+} , чији би се већи садржај могао очекивати у загађенијим подручјима у близини прометнијих путева.

Чињеница је да сапротрофне врсте могу мењати физичко-хемијске карактеристике животне средине, утичући тако и на доступност других елемената у подлози раста, а самим тим и на њихово нагомилавање (суперакумулатори) у метаболички активним хифама (Falandysz и Borovička, 2012).

Иако у природи постоји више од 2000 врста гљива, само се неколицина употребљава у исхрани. Уколико се пореде са поврћем, њихова употреба је доста

4. Резултати и дискусија

лимитиранија због потенцијално високих концентрација појединих тешких метала (Cd, Cr, Hg и Pb) који могу представљати опасност по људско здравље.

У циљу истраживања нутритивних и лековитих вредности и потенцијалне употребе испитиваних макрогљива у људској исхрани или као додатака исхрани, добијени резултати су поређени са препорученим дневним уносом минерала. Препоручени дневни унос јона Fe износи 14,8 mg за жене и 8,7 mg за мушкарце, а испитиване гљиве се не могу дефинисати као суплементи богати овим јонима. Препоручени дневни унос јона Zn износи 9,5 mg, Cu 900 mg и Cr 35 µg и у одређеним концентрацијама испитиване гљиве би могле задовољити основне дневне потребе људског организма. Препоручени дневни унос јона Mg износи 300 mg, Ca 1000 mg и K 4,7 g, а из резултата овог истраживања закључује се да ове испитиване гљиве слабо могу задовољити дневне потребе организма.

По *Правилнику о количинама пестицида, метала и металоида и других отровних супстанција, хемиотерапеутика, анаболика и других супстанција које се могу налазити у намирницама Републике Србије* (<http://zivinarstvo.com/wp-content/uploads/2014/03/PRAVILNIK-O-KOLICINAMA-PESTICIDA-METALA-I-METALOIDA-I-DRUGIH-OTROVNIH-SUPSTANCIJA-HEMIOTERAPEUTIKA-ANABOLIKA-I-DRUGIH-SUPSTANCIJA-KOJE-SE-MOGU-NALAZITI-U-NAMIRNICAMA.pdf>) дозвољена максимална концентрација јона Pb²⁺ износи 1 mg/kg (свеже гљиве) и 5 mg/kg (суве гљиве), а јона Cd²⁺ 0,5 mg/kg (свеже гљиве) и 3 mg/kg (суве гљиве). Поредиши са добијеним резултатима из овог истраживања, испитиване гљиве поседују високу концентрацију ових јона чија вредност је на самој граници дозвољених максималних вредности.

С обзиром да су гљиве рода *Ganoderma* нејестиве врсте и не потребљавају се као храна, али је зато развијена њихова употреба као додатака исхрани, у облику чаја, кафе и другим облицима, захваљујући бројним биоактивним компонентама које поседују у свом саставу те би њихова употреба требало да подлеже детаљној контроли њиховог хемијског састава у циљу безбедних производа за људску исхрану.

4. Резултати и дискусија

4.1.2. LC-MS/MS анализа одабраних фенолних једињења

Ради утврђивања разлика у квалитативном и квантитативном садржају 45 одабраних фенолних једињења у H₂O и EtOH екстрактима 4 врсте гљива рода *Ganoderma*, примењена је LC-MS/MS техника (**Поглавље 3.2.2.**) и доказано је присуство само дванаест (p-хидроксибензоева киселина, протокатехинска киселина, p-кумаринска киселина, ванилинска киселина, гална киселина, ескулетин, кафена киселина, хинска киселина, сиригинска киселина, кризоериол, изорамнетин и хлорогенска киселина).

Концентрације детектованих једињења приказане су у **Табели 4.1**. Све вредности које су испод границе квантификације означене су као < LoQ (LoQ је граница квантификације за дато једињење). С обзиром да не можемо тврдити да дата једињења која нису била у могућности бити квантификована, нису уопште присутна у испитиваним екстрактима, кажемо да је њихов садржај у испитиваним узорцима испод доње границе квантификације.

4. Резултати и дискусија

Табела 4.1. Приказ детектованих фенолних једињења у EtOH и H₂O екстрактима гљива

Фенолне киселине	Врста гљиве							
	концентрација једињења (g/kg с.м.)							
	<i>G.appl.</i> EtOH	<i>G.appl.</i> H ₂ O	<i>G.lucidum</i> EtOH	<i>G.lucidum</i> H ₂ O	<i>G.pfeifferi</i> EtOH	<i>G.pfeifferi</i> H ₂ O	<i>G.resinaceum</i> EtOH	<i>G.resinaceum</i> H ₂ O
р-хидрокси бензоева киселина	0.00382	<0.0003*	0.0083	0.0019	0.0330	0.0030	0.0022	<0.0003*
протокатехинска киселина	0.0064	0.0014	0.0222	0.0009	0.0075	0.0089	0.002	0.0006
р-кумаринска киселина	0.000316	<0.0002*	0.0005	<0.0002*	0.0015	0.0002	0.0002	<0.0002*
ванилинска киселина	0.0114	0.0045	0.0063	<0.0040*	0.0076	<0.0040*	<0.0040*	<0.0040*
гална киселина	0.0021	0.0004	0.0005	<0.0008*	0.0005	<0.0008*	<0.0008*	<0.0008*
ескулетин	0.0047	0.0009	0.0009	<0.0002*	<0.0002*	<0.0002*	<0.0002*	<0.0002*
кафена киселина	0.0019	<0.0002*	0.0017	<0.0002*	0.001	0.0005	0.0003	<0.0002*
хинска киселина	0.0029	0.0025	0.0062	0.0025	0.0109	0.0066	0.0069	<0.0004*
сирингинска киселина	0.0098	0.0030	0.0036	<0.0016*	<0.0016*	<0.0016*	<0.0016*	<0.0016*
кризоериол	<0.0002*	<0.0002*	<0.0002*	<0.0002*	0.0001	<0.0002*	<0.0002*	<0.0002*
изорамнетин	<0.0008*	<0.0008*	<0.0008*	<0.0008*	0.0004	<0.0008*	<0.0008*	<0.0008*
хлорогенска киселина	<0.0003*	<0.0003*	<0.0003*	<0.0003*	0.0003	0.0004	<0.0003*	<0.0003*

Болдовани бројеви: садржај одређених фенолних једињења у испитиваним екстрактима

* број: доказано присуство једињења (детектован пик) чија је концентрација нижа од LoQ (Limit of quantification, граница квантификације), али виша од LoD (Limit of detection, граница детекције)

4. Резултати и дискусија

Фенолни профил гљива рода *Ganoderma*, у научној литератури је углавном представљен кроз квалитативну анализу фенолних киселина као најдоминантнијих компоненти (Alves и др., 2013; Paterson, 2006; Zjawiony, 2004).

Поред фенолних киселина, у лигниколним гљивама утврђено је присуство и других фенолних једињења, који су такође значајни за њихову потенцијалну примену као додатака исхрани, функционалне хране са циљем превенције бројних обољења делујући: антиоксидантно, антиинфламаторно, антимулагено и антимикуробно (Alves и др., 2012).

Из резултата добијених LC-MS/MS анализом може се закључити да је већи садржај фенолних киселина присутан код EtOH екстраката врста *G. applanatum*, *G. lucidum* и *G. pfeifferi*, где се издвајају р-хидроксибензоева, протокатехинска и ванилинска киселина. Доминантне фенолне компоненте могу бити одговорне за јачи антиоксидантни потенцијал анализираних екстраката гљива.

Од 45 фенолних стандарда у испитиваним екстрактима гљива утврђено је присуство 11 у H₂O екстрактима (*G. resinaceum* садржи само протокатехинску киселину), док је у EtOH екстрактима детектовано 12 (**Табела 4.1.**). Екстракти *G. applanatum* и *G. pfeifferi* садрже значајнију количину ових једињења у односу на екстракт *G. resinaceum*, код кога је детектовано најмање фенолних једињења.

Код свих 8 анализираних екстраката гљива утврђено је присуство протокатехинске киселине, чији је највећи садржај забележен код EtOH екстракта *G. lucidum* (0,0222 g/kg), док је најмањи садржај код H₂O екстракта *G. resinaceum* (0,0006 g/kg).

Од преосталих 8 фенолних киселина код анализираних екстраката забележена је већа заступљеност р-хидроксибензоеве, р-кумаринске, хинске и кафеке киселине код EtOH екстраката, где је највећи садржај прве три фенолне киселине забележен код *G. pfeifferi* (**Табела 4.1.**), док је највећи садржај кафеке киселине забележен код *G. applanatum* (0,0019 g/kg) (**Табела 4.1.**).

Већи квантитативни садржај анализираних фенолних киселина, одређен је у екстрактима, како H₂O тако и EtOH *G. applanatum* и *G. pfeifferi*, али и EtOH екстракту *G. lucidum*, при чему се издвојила ванилинска киселина у EtOH

4. Резултати и дискусија

екстрактима *G. applanatum* (0,0114 g/kg), *G. pfeifferi* (0,0076 g/kg) и *G. lucidum* (0,0063 g/kg).

У литературним подацима доминирају подаци о врстама *G. applanatum* и *G. lucidum* (Alves и др., 2013; Karaman и др., 2010; Kim и др., 2008; Sheikh и др., 2015; Stilinović и др., 2015; Yildiz и др., 2014; Zhang и др., 2015; Zengin и др., 2015) где је поред фенолних киселина, одређено присуство ескулетина, деривата циметне киселине као и два флавоноида (кризоериол и изорамнетин, код EtOH екстракта *G. pfeifferi*) (**Табела 4.1.**). У истраживањима Karaman и сар. (2010) и Yildiz и сар. (2015) могу се наћи подаци да су гална и ванилинска киселина доминантније компоненте, што је и у сагласности са истраживањима добијеним у овој тези, с тим да према добијеним резултатима доминира протокатехинска киселина (0,0006-0,0222 g/kg). Zengin и сар. (2015) су детектовали 6 фенолних једињења у H₂O екстрактима *G. resinaceum* и добијени резултати указују на далеко већи број једињења у односу на анализирани H₂O екстракте где је доказано присуство само протокатехинске киселине (0,0006 g/kg), а разлог томе може бити другачији начин припреме екстракта, као и њихово порекло (Köyseğiz, Muğla, Турска).

Из резултата добијених LC-MS/MS анализом може се закључити да је већи садржај фенолних киселина присутан код EtOH екстракта врста *G. applanatum*, *G. lucidum* и *G. pfeifferi*, где се издвајају р-хидроксибензоева, протокатехинска и ванилинска киселина које као доминантне фенолне компоненте могу бити одговорне за јачи антиоксидантни потенцијал наведених екстракта гљива.

Као и код фенолних киселина већи садржај ескулетина (дериват циметне киселине) и флавоноидних једињења кризоериола и изорамнетина је одређен код врста *G. applanatum* и *G. pfeifferi* (0,0001-0,0047 g/kg), што указује на то да и ова једињења могу у значајној мери допринети биолошким активностима (антиоксидантна, антимицробна, антипролиферативна и сл.) гљива рода *Ganoderma* (Gao и др., 2003; Kim и др., 2008; Sakthivigneswari и Dharmaraj, 2013). С обзиром да су овом раду детектована само два флавоноида (кризоериол и изорамнетин), то и није у сагласности са претходно објављеним резултатима где је доказано присуство већег броја фенолних једињења (Kim и др., 2008). Објашњење се може наћи у чињеници да је кориштена друга метода за

4. Резултати и дискусија

одређивања садржаја флавоноида (HPLC), али и различити начини припреме екстракта. Наши резултати су у сагласности са резултатима спектрофотометријског одређивања садржаја флавоноида (Chang и др., 2002), где је забележен доста низак ниво наведених компоненти.

У нашем раду је детектовано присуство кумарина, ескулетина (дериват циметне киселине), код гљива са територије Моровићких шума, чије присуство није одређено у прегледаним литературним подацима (Stilinović и др., 2014; Yildiz и др., 2015; Zhang и др., 2015; Zengin и др., 2015).

EtOH екстракт *G. applanatum* садржи највећи број фенолних једињења као и највећу концентрацију појединачних фенола (**Прилог 7.2.8.; Табела 7.26.**).

С обзиром да је познато да састав фенолних једињења зависи од бројних фактора, али и од интеракција међу самим фенолним компонентама, разних физиолошких и биохемијских процеса, овакве разлике у садржају фенолних једињења нису изненађујуће, али их је понекад тешко објаснити због сложености многобројних механизма до којих долази у ћелијама гљива.

Досадашња истраживања везана за микохемијски „скрининг“ гљива рода *Ganoderma*, базирана су на квантитативној анализи, што је био циљ и овог истраживања, као и процедура утицаја фенолних једињења на детектоване биолошке активности гљива.

4.1.3. Одређивање садржаја протеина (Bradford, 1976)

Једна од најзначајнијих група једињења са биоактивним својствима гљива рода *Ganoderma* јесу протеини, који су детектовани разним методама електрофорезе (Jin и др., 2006; Murugesan и др., 2007; Saltarelli и др., 2009) и PCR-ом (Li и др., 2015; Vijay и др., 1991), док се квантитативни састав најчешће одређује Брадфордским тестом (Bradford, 1976).

Резултати испитивања концентрације протеина методом по Брадфорду (1976) добијени су помоћу калибрационе криве стандардног раствора BSA (bovine serum albumine) (**Прилог 7.1.3.; Табела 7.4.; Графикон 7.1.**). Резултат је изражен као средња вредност три мерења (mg ек. протеина/ml).

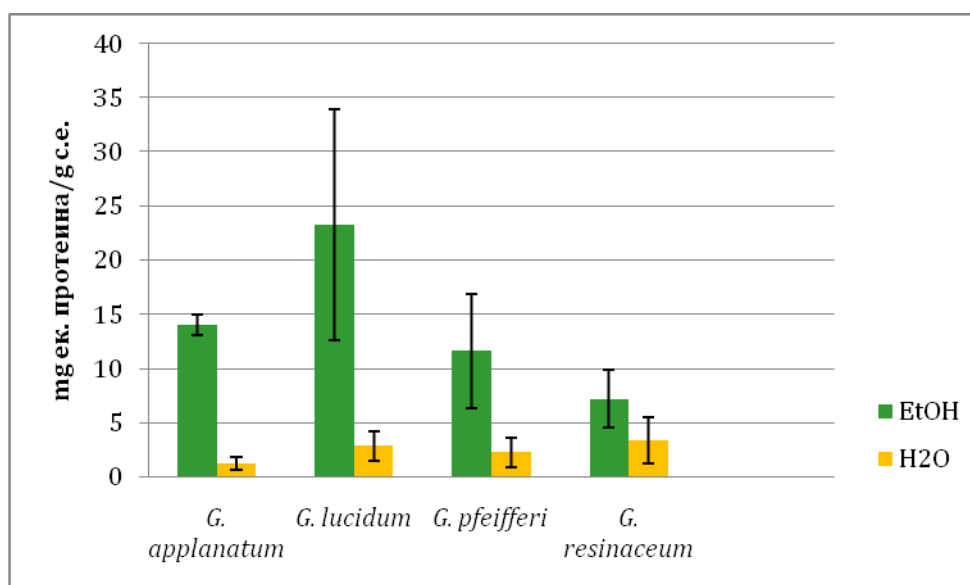
4. Резултати и дискусија

Резултати добијени 2D електрофорезом за *G. lucidum* са територија Италије и Кине указују на присуство 21-37 протеинских изолата, и слабо су упоредиви иако се ради о истој врсти с обзиром да свака од гљива има другачије услове раста, што указује на то да је протеински профил изолат специфичан (Saltarelli и др., 2009).

Неки од биоактивних протеина су: *ганодермин*, *лектин* и *рибонуклеаза* са антифунгалном активношћу (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* и *Physalospora piricola*) (Wang и Ng, 2006), имуномодулирајући гликопротеини: LZ, GMI FIPS (фунгални имуномодулирајући протеин) са могућношћу примене као додатака исхрани или терапеутских агенаса у превенцији и третману канцера и аутоимуних обољења (An и др., 2010; Hsin и др., 2011; Jinn и др., 2006).

На **Хистограму 4.3.** дат је упоредни приказ испитиваних екстраката гљива на основу средњих вредности mg ек. протеина/ml узорка. Може се уочити да је највећа концентрација протеина присутна у EtOH екстракту *G. lucidum* (23,31 mg ек. протеина/ml), док је у H₂O екстракту гљиве *G. applanatum* забележена најмања концентрација (1,16 mg ек. протеина/ml).

Хистограм 4.3. Приказ средњих вредности mg ек. протеина/ml узорка добијених Брадфордвом методом за одређивање садржаја протеина за испитиване екстракте гљива



4. Резултати и дискусија

Код EtOH екстраката средње вредности ек. протеина/ml су од 7,17-23,31, док су код H₂O екстраката биле од 1,16-3,37 mg ек. протеина/ml узорка.

EtOH екстракти код свих испитиваних врста гљива показали су присуство веће концентрације протеина, што је у сагласности са литературним подацима (Kozarski и др., 2012), где су вредности за дијализоване EtOH екстракте биле за врсте *G. applanatum* и *G. lucidum* 39, односно 27 mg ек. протеина/ml узорка, док су H₂O екстракти анализираних истих врста гљива у овом раду садржали протеине у већим концентрацијама (1,16, односно 2,82 mg ек. протеина/ml узорка, у односу на 0,1 mg ек. протеина/ml за обе врсте) (Kozarski и др., 2012).

Ипак, поредећи са радом Kozarski и сар. (2011), добијени резултати се у великој мери разликују, с обзиром да су добијене вредности укупног садржаја протеина за H₂O екстракте биле у опсегу резултата наших EtOH екстраката (26 mg ек. протеина/ml за *G. lucidum*). Разлог може бити различит начин припреме екстраката, с обзиром да су у том експерименту употребљени полисахаридни екстракти (екстракција врелом водом) који садрже мешавину/комплекс полисахарида, протеина и полифенола (Kozarski и др., 2012), који потенцијално могу утицати на више вредности апсорбанци, а самим тим и на могућност постизања „лажно“ позитивних резултата. Разлог томе може бити и чињеница да услед полисахаридне екстракције долази до оштећења талуса гљиве и везивања ензима тирозиназе за фенолне компоненте у екстракту, па су оксидовани феноли и даље присутни у екстракту тиме што су ковалентно везани за полисахариде (Fenoll и др., 2000).

Према доступним подацима из литературе (Kim и др., 1999; Kozarski и др., 2011; Kozarski и др., 2012; Murugesan и др., 2007; Saltarelli и др., 2009), укупан садржај протеина методом по Брадфорду у гљивама *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* до сада је слабо испитан.

4.1.4. Одређивање садржаја шећера (PSA тест)

Уопштено, плодна тела гљива садрже око 39,9 % угљених хидрата, 17,5 % протеина и 2,9 % масти (изражено на с.м. гљиве) (Chittaragi и Naika, 2014).

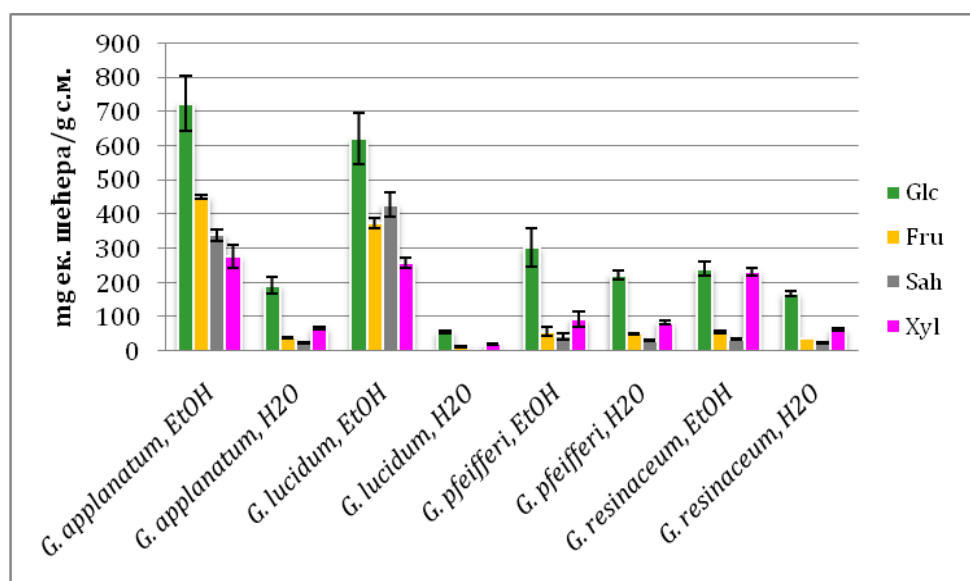
4. Резултати и дискусија

Полисахариди и тритерпени су највише истраживане компоненте из врста рода *Ganoderma* са широким спектром испољених биоактивних својстава (имуномодулаторно, антитуморско, антимикумно, антиоксидантно, антихипертензивно, хепатопротективно и др.) (Boh и др., 2000; Cheng и др., 2010; Cheng и др., 2012; Ео и др., 2000; Fan и др., 2012; Као и др., 2013; Ко и др., 2008; Kozarski и др., 2012; Mothana и др., 2003; Nie и др., 2013; Paterson, 2006; Xie и др., 2012).

Из гљива рода *Ganoderma* екстраховани су α - или β -1-3 и β -1-6-D глукани као најдоминантније полисахаридне компоненте, али и хетерополисахариди са комбинацијом глукозе, манозе, галактозе, ксилозе, фукозе и арабинозе (Huie и др., 2004; Nie и др., 2013; Pan и др., 2012). Глукоза се сматра најдоминантнијим моносахаридом у полисахаридном саставу (Kozarski и др., 2012; Nie и др., 2013; Paterson, 2006).

Приликом одређивања садржаја шећера применом PSA теста, резултати су добијени помоћу калибрационе криве стандардних раствора глукозе, фруктозе, сахарозе и ксилозе (**Прилог 7.1.4.; Графициони 7.2.-7.5.**). Резултат је изражен као средња вредност три мерења (mg ек. шећера/g с.м.).

Хистограм 4.4. Приказ средњих вредности садржаја шећера (mg ек. стандарда/g с.м.) добијених PSA тестом



4. Резултати и дискусија

Резултати показују да су EtOH екстракти богатији полисахаридним садржајем, где се као најдоминантнији моносахарид издваја глукоза (241,35 до 724,94 mg ек. Glc/g с.м.), док је овај опсег за H₂O екстракте био 55,75 до 222,33 mg ек. Glc/g с.м.

Код EtOH екстракта гљиве *G. applanatum* показан је највећи садржај глукозе (724,94 mg ек. Glc/g с.м.).

Код EtOH екстраката средње вредности кретале су се у опсегу од 54,91 до 452,00, а код H₂O од 12,66 до 50,98 mg ек. Fru/g с.м. И овде је код EtOH екстракта *G. applanatum* показан највећи садржај фруктозе (452,00 mg ек. Fru/g с.м.).

Код EtOH екстраката средње вредности кретале су се у опсегу од 35,60 до 427,60, а код H₂O од 7,95 до 30,69 mg ек. Sah/g с.м. За разлику од хексоза, дисахарид сахароза је најзаступљенији код EtOH екстракта *G. lucidum* (427,60 mg ек. Sah/g с.м.), док је код H₂O најмање заступљена (7,95 mg ек. Sah/g с.м.).

Код EtOH екстраката средње вредности су се кретале у опсегу од 93,16 до 277,93, а код H₂O од 21,04 до 83,84 mg ек. Xyl/g с.м. EtOH екстракт *G. applanatum* највише садржи и наведене пентозе (277,93 mg ек. Xyl/g с.м.).

Поредећи са литературним подацима (Kozarski и др., 2012), резултати добијени PSA тестом за глукозу за H₂O екстракте врста *G. applanatum* и *G. lucidum* су истог реда величине као и за анализиране EtOH (635, односно 566 mg ек. /g с.м.), што није у сагласности са вредностима добијеним за нализирание H₂O екстракте које су биле доста ниже.

Разлог неусаглашених резултата може бити у томе што су у наведеној литературној референци кориштени полисахаридни екстракти преципитирани са 65 %-ним EtOH, а анализирани су екстраховани у 96 % EtOH, и отуда сличне бројне вредности за различите типове екстраката, док су анализирани H₂O екстраховани искључиво у води. Слично је и приликом поређења полисахаридних екстраката врсте *G. atrum*, где је такође за глукозу добијена бројчана вредност од 683 mg/g с.м. (Chen и др., 2008) што је у сагласности са анализираним EtOH екстрактима. Zhao и сар. (2010) су радили на EtOH (полисахаридним) екстрактима *G. lucidum* у циљу одређивања њиховог антипролифертивног потенцијала одређен је и садржај различитих пентоза и

4. Резултати и дискусија

хексоза, и глукозе између осталог и добијени резултати су такође у сагласности са нашим EtOH (601,10 до 680,40 ек. Glc/g с.м.).

Такође је у овом раду урађена анализа полисахаридних фракција где је одређено да се састоје примарно од глукозе и галактозе као најприсутнијих моносахаридних компоненти, али и мањих количина манозе, рамнозе и фукозе што је у сагласности са претходно публикованим резултатима (Chen и др., 2008).

Уколико се одређује глукоза у егзополисахаридним екстрактима, где EtOH служи као средство за преципитацију H₂O екстракта, добијени резултати су такође у сагласности са нашим EtOH екстрактима првенствено код *G. applanatum* (744 mg/g с.м.) (Wagner и др., 2004). Heleno и сар. (2012) су радили и на одређивању садржаја фруктозе, сахарозе поред глукозе и њихов садржај је био доста нижи у односу на анализирани EtOH и H₂O екстракте (опсег од 4,70 до 64,30 mg ек. шећера/g с.м.).

Висок садржај шећерних компоненти код EtOH екстракта може бити последица својстава органских растварача (нпр. етанол) да доведу до елиминације ниско-молекуларних једињења и дисолуције (одвајања) полисахарида из ћелијског зида (Saltarelli и др., 2009), што није случај код других типова екстракција (микроталасна, ултразвучна или комбинација и једне и друге) где долази до прекида у ћелијском зиду и смањеног садржаја полисахарида у екстрактима (Saltarelli и др., 2009).

Према литературним подацима мало се зна о укупном садржају шећера код гљива *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*. Silva и сар. (2013) су радили на испитивањима врсте *G. resinaceum* и дошли до података да је укупан садржај шећера око 6,04 mg/g с.м. што је доста ниже у односу на наше резултате (**Хистограм 4.4.**).

Битно је да се напомене да PSA тест није у потпуности адекватан за диференцирање појединачних шећера, с тога би га било најбоље користити као доказни тест за присуство угљених хидрата у екстрактима. За добијање тачнијих и валиднијих резултата неопходно је користити неку од метода за квантификацију угљено-хидратних компоненти у испитиваним екстрактима

4. Резултати и дискусија

као што је Fouier transform infrared spectroscopy (FTIR) (Han и др., 2008; Pan и др., 2012).

4.2. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИОКСИДАНТНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА ГЉИВА *IN VITRO*

У овом раду испитан је антиоксидантни потенцијал EtOH и H₂O екстраката одабраних макрогљива рода *Ganoderma* мерењем њихове способности да неутралишу следеће радикале: DPPH•, ABTS•, OH•, O₂⁻ и NO• као и способност редукције јона Fe применом FRAP и А.Е.А.С. теста (**Прилог 7.2.; Табела 7.14.**). Такође је упоредно испитана и активности потентног, синтетичког антиоксиданта PG, који се често користи као адитив у прехранбеним, фармацеутским, козметичким и бројним другим производима.

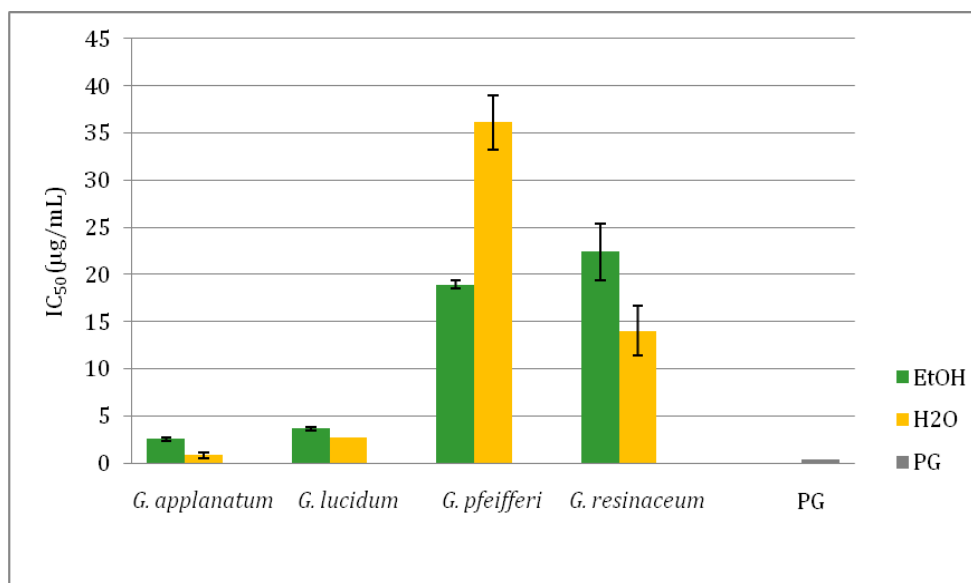
С обзиром да су фенолна једињења, али и флавоноиди међу фенолним једињењима, група природних производа који су изузетно потентни антиоксидантни агенси, одређен је њихов укупни садржај у испитиваним екстрактима, а затим је урађена и регресиона анализа у циљу испитивања корелације садржаја ових једињења и добијене антиоксидантне активности (**Табела 4.2.**).

4.2.1. Одређивање капацитета „хватања“ DPPH• радикала

Резултати спектрофотометријског одређивања способности неутрализације DPPH• радикала испитиваним екстрактима гљива приказани су на **Хистограму 4.5.** За процену реактивности испитиваних екстраката са слободно радикалским врстама кориштен је DPPH тест у ком је мерена способност екстракта да врше неутрализацију стабилног азот-центрираног 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил-радикала, који је комерцијално доступан. Сви испитивани екстракти су показали способност „хватања“ DPPH• радикала (**Прилог 7.2.1.; Табела 7.15.**), при чему се вредност концентрације екстракта потребне за неутрализацију 50 % DPPH радикала кретала од 0,50 до 40,00 µg/mL (**Хистограм 4.5.**).

4. Резултати и дискусија

Хистограм 4.5. Поређење способности „хватања“ DPPH• радикала EtOH и H₂O екстраката врста рода *Ganoderma*



Као што се види на основу приказаних IC₅₀ вредности, већу способност неутрализације DPPH• радикала показали су H₂O екстракти. H₂O екстракт гљиве *G. applanatum* показао је најбољи протективни (антиоксидантни) ефекат према DPPH• радикалу (IC₅₀=0,80 µg/mL), чија је IC₅₀ била дупло мања у односу на синтетски антиоксидант (PG) (IC₅₀=0,38 µg/mL). Нешто слабију способност неутрализације DPPH• показали су и H₂O и EtOH екстракти врсте *G. lucidum* (IC₅₀=2,75, односно 3,74 µg/mL), али и EtOH екстракт *G. applanatum* (IC₅₀=2,57 µg/mL). Четири од осам испитиваних екстраката (екстракти врста *G. applanatum* и *G. lucidum*) (IC₅₀ вредности у опсегу од 0,85-3,64 µg/mL) нису показали статистички значајно бољу активност од синт. антиоксиданта PG (IC₅₀=0,39 µg/mL), чије IC₅₀ вредности су биле веће од 0,38 µg/mL (p<0,01, Tukey тест, ANOVA) (**Прилог 7.2.1.; Табела 7.15.**).

H₂O екстракт гљиве *G. applanatum* показао је најбољи протективни (антиоксидантни) ефекат према DPPH• радикалу (IC₅₀=0,85 µg/mL), чија је IC₅₀ била дупло мања у односу на синтетски антиоксидант (PG) (IC₅₀=0,39 µg/mL). Нешто слабију способност неутрализације DPPH• показали су H₂O и EtOH екстракти врсте *G. lucidum* (IC₅₀=2,75, односно 3,64 µg/mL), али и EtOH екстракт *G. applanatum* (IC₅₀=2,55 µg/mL) која није статистички значајна. Четири од осам

4. Резултати и дискусија

испитиваних екстраката (екстракти врста *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*) су показали статистички значајну разлику ($p < 0,01$) од синтетског антиоксиданта PG, чије IC₅₀ вредности су биле од 18,92 до 22,38 µg/mL (**Прилог 7.2.1.; Табела 7.15.**). Посебно се може издвојити H₂O екстракт *G. pfeifferi* (IC₅₀=36,12 µg/mL) који се статистички значајно разликује од свих испитиваних екстраката и који је испољио најслабију антирадикалску активност према DPPH•.

С обзиром на недостатке литературних података о антиоксидантној активности врсте *G. pfeifferi* и чињеницу да су се до сада код ове врсте углавном изоловани и окарактерисани терпеноиди одговорни за испољавање антивиралне активности (Mothana и др., 2003; Niedermeyer и др., 2005), ови резултати могу да допринесу популаризацији и широј примени ове до сада слабије истражене макрогљиве.

Вода као поларније екстракционо средство, показала се бољом у односу на мање поларан EtOH екстракт, код ког је доминантнији садржај фенолних компоненти (како фенолних киселина, тако и садржаја укупних фенола, односно флавоноида), као групе једињења којој се углавном приписује антиоксидантна активност (Barros и др., 2007; Paterson и др., 2006; Yildiz и др., 2014). H₂O екстракти *Ganoderma* врста садрже у великој мери полисахаридна, односно терпеноидна једињења за које постоје литературни подаци о антиоксидантном деловању (Nie и др., 2013; Wang и др., 2013; XiaoPing, 2009). Гљиве које у свом саставу садрже ове природне антиоксиданте се већ дужи низ година користе како у прехранбеној индустрији у Кини, тако и у медицини између осталог због њиховог антиоксидантног деловања превенцијом оксидативног стреса (Fan и др., 2012).

Резултати наших истраживања указују на знатно јачу антиоксидантну активност гљива испитиваних у овој дисертацији према DPPH• у односу на раније објављене резултате за врсте рода *Ganoderma* из Италије, Кине, Кореје, Португала, Србије и Турске (Fan и др., 2012; Heleno и др., 2012; Karaman и др., 2010; Kim и др., 2008; Kozarski и др., 2011; Saltarelli и др., 2009; Wang и др., 2013; XiaoPing и др., 2009; Yildiz и др., 2015; Zengin и др., 2015).

4. Резултати и дискусија

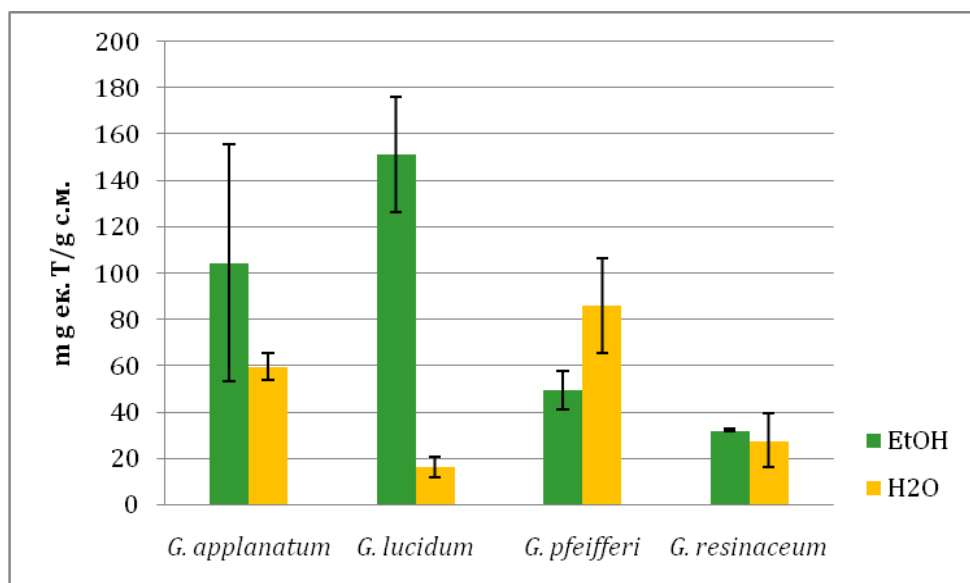
Антирадикалска активност испитаних екстраката гљива према DPPH• радикалу према подацима из литературе првенствено се приписује различитим класама фенолних једињења као што су фенолне киселине или у мањој мери флавоноиди (Barros и др., 2008; Heleno и др., 2012; Heleno и др., 2015; Karaman и др., 2009). Антиоксидантна активност је такође последица деловања и полисахаридних компоненти у мањој мери (Fan и др., 2012; XiaoPing и др., 2009).

4.2.2. Одређивање капацитета „хватања“ ABTS•⁺ радикала

Способност „хватања“ ABTS•⁺ радикала одређена је методом по Arnao и сар. (2001) употребом тролокса као стандардног реагенса, а укупна антиоксидантна способност испитиваних екстраката изражена је у mg ек. тролокса/g с.м. Сви испитивани екстракти испољили су способност хватања ABTS•⁺ радикала, док су се вредности кретале у опсегу 16,34 до 159,84 mg ек. тролокса/g с.м. (*Прилог 7.2.2.; Табела 7.17.; Хистограм 4.6.*). ABTS тест представља другу линију антирадикалске одбране екстраката преко супресије иницијације и/или пропагације ланчаних реакција (Sheena и др., 2005)

4. Резултати и дискусија

Хистограм 4.6. Поређење способности „хватања“ $ABTS^{\bullet+}$ радикала $EtOH$ и H_2O екстраката врста рода *Ganoderma*



Највећу способност „хватања“ $ABTS^{\bullet+}$ радикала показао је такође $EtOH$ екстракт врсте *G. applanatum* (159,84 mg ек. тролокса/g с.м.), док је H_2O екстракт врсте *G. lucidum* био најмање активан (16,34 mg ек. тролокса/g с.м.). $EtOH$ екстракти су и до три пута активнији од H_2O екстраката, што указује на то да су једињења одговорна за антиоксидантну активност ($ABTS$ тест) заступљенија код $EtOH$ у односу на H_2O екстракте. Између $EtOH$ и H_2O екстраката *G. resinaceum* нису уочене велике разлике у вредности $ABTS$ теста, али је ипак већа способност неутрализације показана такође за $EtOH$ екстракт (32,18, односно 27,74 mg ек. тролокса/g с.м.). Изузетак је као и код $DPPH$ теста $EtOH$ екстракт врсте *G. pfeifferi* где је забележена боља способност неутрализације $ABTS^{\bullet+}$ радикала (32,18 mg ек. тролокса/g с.м.). Статистички је значајан једино резултат H_2O екстракта *G. resinaceum* у односу на преосталих седам (27,74 mg ек. тролокса/g с.м.) ($p < 0,01$, Tukey тест, ANOVA) (Прилог 7.2.2.; Табела 7.17.).

Уколико се пореде резултати добијени у овом раду (гљиве са територије Србије) са резултатима добијеним за исте врсте гљива са територије Азије (Малезија и Индија) уочава се да екстракти добијени за аутохтоне гљиве са истраживане територије показују знатно већу способност „хватања“ $ABTS^{\bullet+}$ радикала у случају врста *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*, обе врсте екстраката али и H_2O екстракта *G. lucidum* (Deeralakshmi и др., 2013; Sheena и

4. Резултати и дискусија

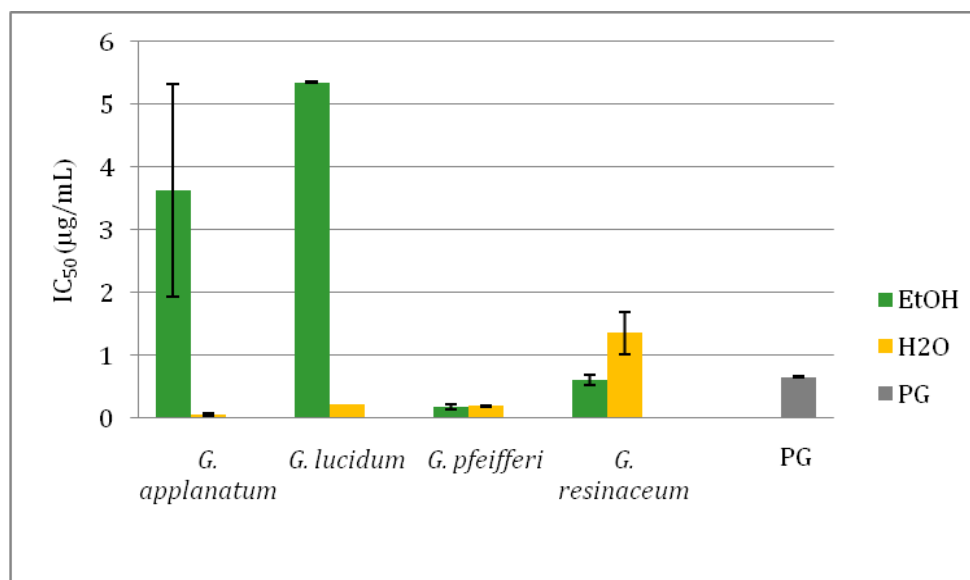
др., 2005; Sudheer и др., 2016; Zengin и др., 2015), које су се уједно показале и као најбољи „хватачи“ ABTS^{•+} радикала. Карактеристика ABTS теста је да екстракт делује или по механизму инхибиције или „хватања“ ABTS^{•+} радикала (Deeralakshmi и др., 2013).

4.2.3. Одређивање капацитета „хватања“ OH[•] радикала

Способност екстраката гљива да смање продукцију и изврше неутрализацију OH[•] радикала, који су најреактивније а самим тим и најтоксичније радикалске врсте у људском организму, испитана је методом по Halliwell-у и сар. (1987).

На **Хистограму 4.7.** приказани су резултати спектрофотометријског читавања способности неутрализације OH[•] радикала EtOH и H₂O екстрактима гљива рода *Ganoderma*.

Хистограм 4.7. Поређење способности „хватања“ OH[•] радикала EtOH и H₂O екстраката врста рода *Ganoderma*



Из добијених резултата неутрализације OH[•] радикала и на основу њих израчунатих IC₅₀ може се уочити да је H₂O екстракт врсте *G. applanatum* испољио најбољу антиоксидантну активност (IC₅₀=0,06 µg/mL). Најмању измерену антиоксидантну активност испољио је EtOH екстракт врсте

4. Резултати и дискусија

G. lucidum ($IC_{50}=5,07 \mu\text{g/mL}$). Такође је и преосталих 7 узорака испољило способност неутрализације OH^\bullet радикала, али је та способност нешто виша за H_2O екстракте *G. applanatum* и *G. lucidum* са локалитета Моровићких шума али и EtOH екстракте врста са територије града Новог Сада: *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* ($IC_{50}=0,20$, односно $1,36 \mu\text{g/mL}$). Између добијених резултата не може се уочити законитост између активности екстраката гљива и врсте екстракционог средства.

Уколико се пореде резултати добијени за EtOH и H_2O екстракте, може се уочити да су H_2O екстракти донекле испољили бољу активност која није статистички значајна у односу на синтетски антиоксидант PG , осим у случају врсте *G. resinaceum* ($IC_{50}=1,36 \mu\text{g/mL}$) (**Прилог 7.2.3.; Табела 7.18.**) ($p<0,01$, Tukey тест, ANOVA).

Уколико се анализирају резултати претходних истраживања, способности екстраката гљива да изврше неутрализацију OH^\bullet радикала може да се утврди да је мало доступних резултата за врсте *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* (Deeralakshmi и др., 2013; Mau и др., 2002; Rajasekaran и др., 2011; Sheena и др., 2005; XiaoPing и др., 2009). Резултати из ове дисертације говоре у прилог већим способностима за неутрализацију OH^\bullet радикала за EtOH екстракте, с обзиром да су ранија истраживања углавном базирана на испитивању H_2O екстраката, где је акценат на врсти *G. pfeifferi*, као изузетном „хватачу“ OH^\bullet радикала, за коју је до сада углавном из доступних резултата рађено на испитивању антивиралне активности.

Механизам „хватања“ OH^\bullet радикала је везан за транзицију јона метала, у чијем одсуству је водоник пероксид прилично стабилан. Молекули који могу да хелирају јоне метала чинећи их неактивнима у Фентоновој реакцији могу да делују као „хватачи“ OH^\bullet радикала (Fan и др., 2012). С обзиром да је овај радикал један од потентнијих оксиданата који може да реагује са већином биомолекула из живих система, веома је битно да се дође до података о потенцијалним антиоксидантима природног порекла (фенолна једињења, полисахариди).

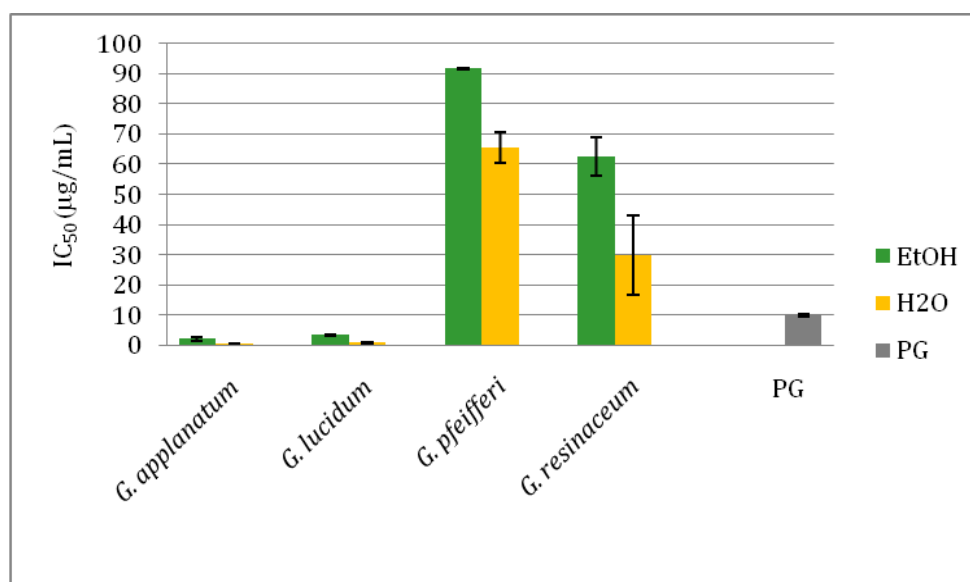
4. Резултати и дискусија

4.2.4. Одређивање капацитета „хватања“ $O_2^{\bullet-}$ радикала

Степен неутрализације $O_2^{\bullet-}$ радикала испитиваних екстраката одређен је методом по Nishikimi-ју (1972) где се мери способност неутрализације $O_2^{\bullet-}$ насталих аеробном редукцијом нитро-блутетразолијум плавог (NBT) помоћу NADH у присуству феназинметилсулфата (PMS).

На **Хистограму 4.8.** приказани су резултати способности неутрализације $O_2^{\bullet-}$ радикала, насталог у ксантин/ксантин оксидаза систему екстрактима гљива.

Хистограм 4.8. Поређење способности „хватања“ $O_2^{\bullet-}$ радикала EtOH и H₂O екстраката врста рода *Ganoderma*



Добијене IC₅₀ вредности у погледу „хватања“ $O_2^{\bullet-}$ радикала кретале су се у опсегу од 0,44 µg/mL (H₂O екстракт *G. applanatum*) до 91,89 µg/mL (EtOH екстракт *G. pfeifferi*). Најбоље резултате су испољили H₂O екстракти (IC₅₀=0,44 до 65,71 µg/mL), док су EtOH екстракти испољили слабију активност (IC₅₀=2,20 до 91,89 µg/mL).

H₂O екстракт врсте *G. applanatum* показао је најбољи протективни (антиоксидантни) ефекат према $O_2^{\bullet-}$ радикалу (IC₅₀=0,44 µg/mL), чија је IC₅₀ била много мања у односу на синтетски антиоксидант (PG) (IC₅₀=10,00 µg/mL), што указује на јачи антиоксидантни потенцијал анализираних екстраката. Нешто слабију способност неутрализације $O_2^{\bullet-}$ показао је такође H₂O екстракт

4. Резултати и дискусија

исте врсте ($IC_{50}=0,75 \mu\text{g/mL}$) која такође није статистички значајна, као и вредност H_2O екстракта *G. applanatum* (**Прилог 7.2.4.; Табела 7.19.**). 4 од 8 испитиваних екстраката (екстракти врста *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*) су показали статистички значајну разлику од синтетског антиоксиданта PG, чије IC_{50} вредности су биле у опсегу од 29,96 до 91,89 $\mu\text{g/mL}$ (**Прилог 7.2.4.; Табела 7.19**) ($p<0,01$, Tukey тест, ANOVA). Код свих испитиваних екстраката је показана концентрацијски-зависна активност, као и код стандардног антиоксиданта PG.

Као и код претходног теста, тако је и овде најјача антиоксидантна активност забележена код врста са територије Фрушке Горе (*G. applanatum* и *G. lucidum*) и њихове како H_2O тако и EtOH екстракте, и наведени екстракти су испољили јачу активност и од PG ($IC_{50}=10,00 \mu\text{g/mL}$) која није била статистички значајна.

Снажна антиоксидантна активност H_2O екстраката може да буде последица присуства високог садржаја полисахарида у њима, који је у високој корелацији са антиоксидантном активношћу према $O_2^{\bullet-}$ радикалу (Li и др., 2011). Други фактори: моносахариди али и садржај протеина, чије присуство је доказано код испитиваних врста, могу да утичу на хелирајуће способности полисахарида и на тај начин утичу на антиоксидантна својства наведених једињења (Fan и др., 2012). Иако је $O_2^{\bullet-}$ радикал релативно слаб оксидант, може учествовати у формирању јачих ROS врста (синглет кисеоник, OH^{\bullet}), које могу иницирати ћелијско оштећење, липидну пероксидацију, али и патолошка стања као што су: артритис и Алцхајмерова болест (Yuan и др., 2008).

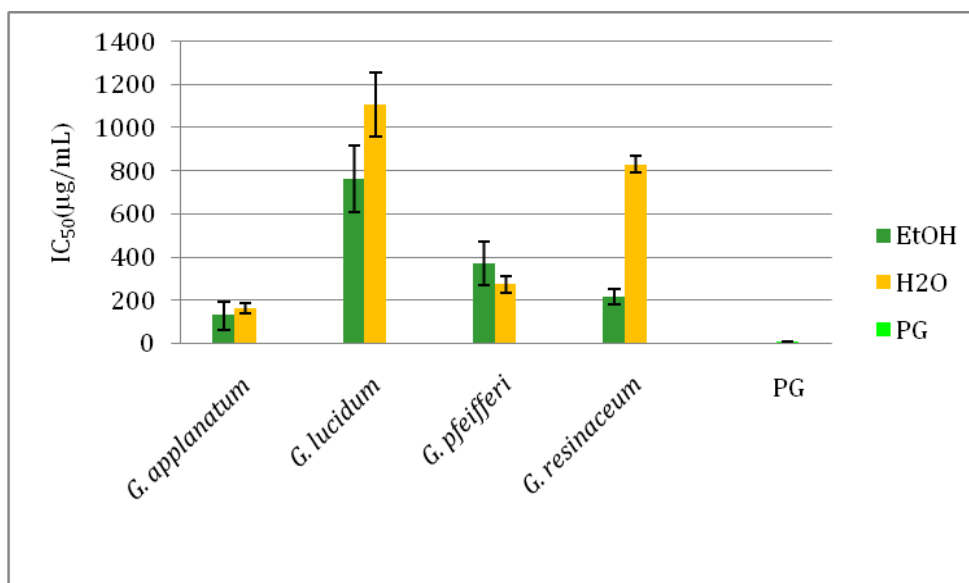
4.2.5. Одређивање капацитета „хватања“ NO^{\bullet} радикала

Способност екстраката за неутрализацију NO^{\bullet} радикала, спонтано генерисане из натријумнитропрусида у H_2O раствору при физиолошком pH, одређена је спектрофотометријском методом по Green-у и сар. (1982) са Griess-овим реагенсом.

На **Хистограму 4.9.** дат је упоредни приказ IC_{50} вредности за испитиване екстракте.

4. Резултати и дискусија

Хистограм 4.9. Поређење способности „хватања“ NO• радикала EtOH и H₂O екстраката врста рода *Ganoderma*



Екстракти врсте *G. lucidum* су показали веома слабу активност „хватања“ NO• радикала, па је у испитиваном опсегу концентрација (18,47-4433,50 µg/mL) достигнута IC₅₀ вредност од 805,02 за EtOH односно 891,00 µg/mL за H₂O екстракт. Нешто снажнију способност „хватања“ NO• радикала показали су екстракти врсте *G. applanatum* (IC₅₀=116,09 µg/mL за EtOH, односно IC₅₀=154,73 µg/mL за H₂O), док су остали испитивани екстракти показали умерену NO-RSC (код појединих врста је достигнута само IC₂₅), али свакако доста слабију од синтетског антиоксиданта (PG), ког кога се IC₅₀ вредност постигла при концентрацији од 6,66 µg/mL. Као и при неутрализацији претходних слободно-радикалских врста кстрактима гљива тако и при неутрализацији NO• радикала, и стандардни антиоксидант PG (радна концентрација од 0,59 до 37,70 µg/mL) су показали концентрацијски-зависну активност.

Екстракти су показали доста слаб антиоксидантни потенцијал постижући IC₅₀ вредности у распону од 128,12 до 1108,31 µg/mL, док три екстракта нису достигла IC₅₀ вредност већ IC₂₅ при опсегу од 215,18 до 830,81 µg/mL. Од осам испитиваних екстраката, код три је испољена статистички значајна активност при неутрализацији NO• радикала у односу на PG (IC₅₀=6,10 µg/mL) и то код оба екстракта *G. lucidum* и H₂O екстракта *G. resinaceum* у опсегу IC₅₀ вредности од

4. Резултати и дискусија

765,06 до 1108,31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ која је уједно и најслабија антирадикалска активност (**Прилог 7.2.5.; Табела 7.20.**) ($p < 0,01$, Tukey тест, ANOVA).

На основу добијених резултата, може се претпоставити да горе наведена једињења имају утицај при неутрализацији NO^\bullet радикала, с обзиром да је баш код EtOH екстраката доказан већи садржај фенолних једињења али и добијени високи корелациони фактори (**Табела 4.2.**).

У поређењу са литературним подацима, анализирани екстракти су много слабији „хватачи“ NO^\bullet радикала више од 100 пута за све осим код EtOH као најпотентније врсте *G. applanatum* 2 пута (Samarakoon и др., 2013; Sheikh и др., 2014; Stilinović и др., 2014). Велике варијације забележене код анализираних екстраката, а и у односу на друге публиковане резултате могу бити последица употребе како различитог екстракционог средства тако и другачијих услова екстракције, али и био-еколошких разлика испитиваних врста - географско порекло, врста дрвног супстрата (Rajasekaran и Kalaimagal, 2011).

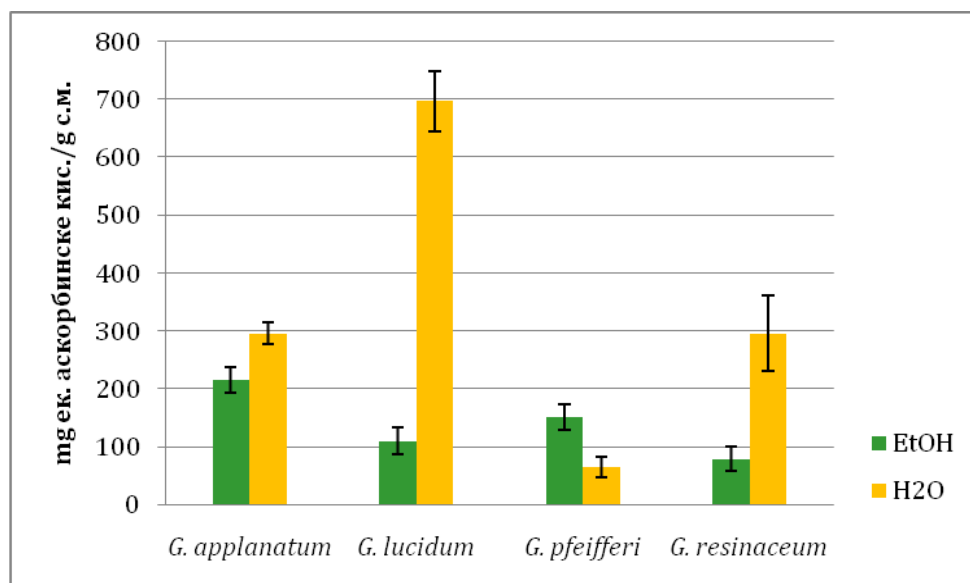
4. Резултати и дискусија

4.2.6. Одређивање редукционог потенцијала екстраката

4.2.6.1. FRAP (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power) тест

На *Хистограму 4.10.* су приказани резултати редукционог потенцијала јона гвожђа FRAP тестом, изражено у mg ек. аскорбинске киселине/g с.м.

Хистограм 4.10. Поређење укупног редукционог потенцијала (FRAP тест) EtOH и H₂O екстраката врста рода *Ganoderma*



Из горе приказаних резултата може се закључити да су H₂O екстракти показали најјачи редукциони потенцијал, а одмах затим и њихови EtOH екстракти, са изузетком *G. pfeifferi* где јачи редукциони потенцијал показује EtOH екстракт (151,53 mg ек. аскорбинске киселине/g с.м.). Синтетички антиоксидант (PG) није активан код FRAP-а. Најјачи редукциони потенцијал показао је H₂O екстракт врсте *G. lucidum* (697,78 mg ек. аскорбинске киселине/g с.м.), док је најмањи показао H₂O екстракт врсте *G. pfeifferi* (65,23 mg ек. аскорбинске киселине/g с.м.). Код анализираних екстраката гљива, H₂O екстракти су били статистички значајно различити у односу на редукциони потенцијал EtOH екстраката, где се издваја H₂O екстракт *G. lucidum* (697,78 mg ек. аскорбинске киселине/g с.м.) која је показала најјачи редукциони потенцијал ($p < 0,01$, Tukey тест, ANOVA) (*Прилог 7.2.6.; Табела 7.22.*).

4. Резултати и дискусија

У ранијим студијама забележен је редукциони потенцијал за три испитиване врсте, док за *G. pfeifferi* нема досупних података.

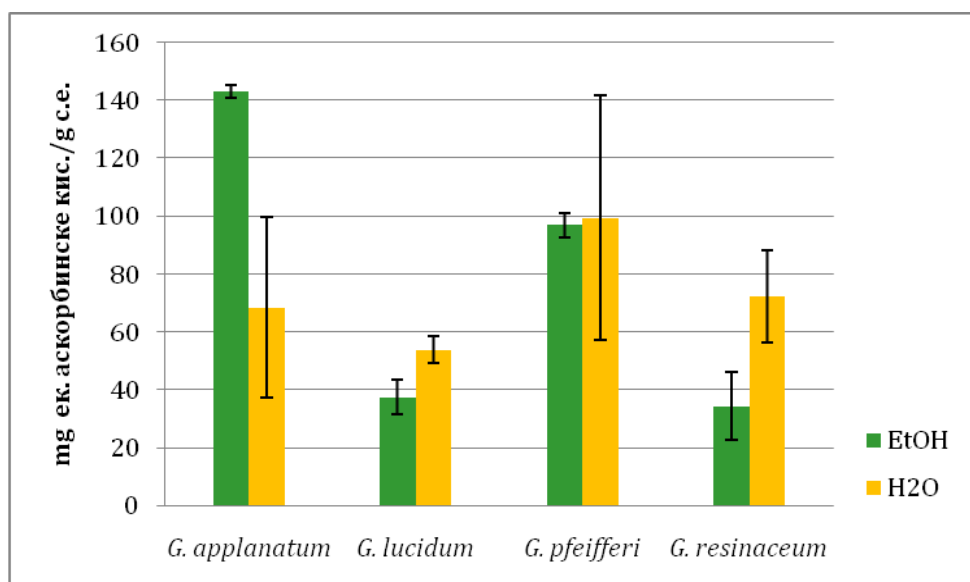
Добијене вредности за H₂O екстракт (55,02 mg ек. аскорбинске киселине/g с.м.) и MeOH екстракт (по поларности сличан EtOH) (37,61 mg ек. аскорбинске киселине/g с.м.) врсте *G. resinaceum* показују 5 пута, односно 2,5 пута слабији редукциони потенцијал у односу на врсту испитивану у овој студији (Zengin и др., 2015). Редукциона моћ макрогљива се заснива на њиховој способности да делују као донори водоника (Nagaraј и др., 2014; Sudheer и др., 2016)

Посматрајући испитиване екстракте гљива, H₂O екстракти су се показали као јачи редукциони агенси (изузетак EtOH екстракт *G. pfeifferi*) у односу на EtOH, што је супротно од добијеног редукционог потенцијала у истраживању Zhang-a и сар. (2015) али и у сагласности са истраживањима Zengin-a и сар. (2015).

4.2.6.2. АЕАС (Ascorbate Equivalent Antioxidant capacity) тест

На *Хистограму 4.11.* су приказани резултати редукционог потенцијала јона гвожђа АЕАС тестом, изражено у mg ек. аскорбинске киселине/g с.м.

Хистограм 4.11. Поређење укупног редукционог потенцијала (АЕАС тест) EtOH и H₂O екстраката врста рода *Ganoderma*



На *Хистограму 4.11.* може да се види да је EtOH екстракт врсте *G. applanatum* показао најјачи редукциони потенцијал (143,09 mg ек. аскорбинске киселине/g

4. Резултати и дискусија

с.м.). Остале врсте су према својој редукционој моћи биле нешто слабије и распоредиле су се у следећем низу: *G. pfeifferi*, H₂O > *G. pfeifferi*, EtOH > *G. resinaceum*, H₂O > *G. applanatum*, H₂O > *G. lucidum*, H₂O > *G. lucidum*, EtOH > *G. resinaceum*, EtOH.

Код испитиваних екстраката гљива, H₂O екстракти су показали статистичко значајнији редукциони потенцијал од EtOH екстраката ($p < 0,01$, Tukey тест, ANOVA) (**Прилог 7.2.7.; Табела 7.24.**). Иако је статистички значајнији резултат забележен за H₂O екстракте, ипак најјачи редукциони потенцијал испољава EtOH екстракт *G. applanatum* (143,09 mg ек. аскорбинске киселине/g с.м.).

На основу резултата приказаних за оба теста одређивања укупног редукционог потенцијала за екстракте гљива рода *Ganoderma*, може се закључити да је већином као и код неутрализације слободно радикалских врста код EtOH екстраката доказана боља антиоксидантна активност што је донекле и у сагласности са претходно публикованим резултатима (Sheikh и др., 2014; Zhang и др., 2015).

У циљу одређивања најпотентнијег антиоксидативног средства између осам испитиваних екстраката, извршено је поређење добијених вредности (IC₅₀, IC₂₅, mg ек. стандардног реагенса/g с.м.) и утврђен је следећи однос међу њима:

Капацитет „хватања“ DPPH• радикала:

Етанолни екстракти:

G. applanatum (2,55 µg/ml) > *G. lucidum* (3,64 µg/ml) > *G. pfeifferi* (18,92 µg/ml) > ***G. resinaceum*** (22,38 µg/ml)

H₂O екстракти:

G. applanatum (0,85 µg/ml) > *G. lucidum* (2,75 µg/ml) > *G. resinaceum* (14,03 µg/ml) > ***G. pfeifferi*** (36,12 µg/ml)

Одређивање „скевенцер“ активности ABTS•+ радикала:

Етанолни екстракти:

4. Резултати и дискусија

G. applanatum (159,84 mg ек. тролокса/g с.м.) > *G. lucidum* (151,35 mg ек. тролокса/g с.м.) > *G. pfeifferi* (49,55 mg ек. тролокса/g с.м.) > *G. resinaceum* (32,18 mg ек. тролокса/g с.м.)

H₂O екстракти:

G. pfeifferi (86,09 mg ек. тролокса/g с.м.) > *G. applanatum* (59,70 mg ек. тролокса/g с.м.) > *G. resinaceum* (27,74 mg ек. тролокса/g с.м.) > *G. lucidum* (16,34 mg ек. тролокса/g с.м.)

Капацитет „хватања“ OH• радикала:

EtOH екстракти:

G. pfeifferi (0,18 µg/ml) > *G. resinaceum* (1,36 µg/ml) > *G. applanatum* (3,63 µg/ml) > *G. lucidum* (5,35 µg/ml)

H₂O екстракти:

G. applanatum (0,06 µg/ml) > *G. pfeifferi* (0,20 µg/ml) > *G. lucidum* (0,23 µg/ml) > *G. resinaceum* (1,36 µg/ml)

Капацитет „хватања“ O₂⁻ радикала:

EtOH екстракти:

G. applanatum (2,20 µg/ml) > *G. lucidum* (3,38 µg/ml) > *G. resinaceum* (62,47 µg/ml) > *G. pfeifferi* (91,89 µg/ml)

H₂O екстракти:

G. applanatum (0,44 µg/ml) > *G. lucidum* (0,75 µg/ml) > *G. resinaceum* (29,96 µg/ml) > *G. pfeifferi* (65,71 µg/ml)

Капацитет „хватања“ NO• радикала:

EtOH екстракти:

G. applanatum (128,12 µg/ml) > *G. resinaceum* (215,18 µg/ml, IC₂₅) > *G. pfeifferi* (369,51 µg/ml, IC₂₅) > *G. lucidum* (765,06 µg/ml)

H₂O екстракти:

G. applanatum (162,83 µg/ml) > *G. pfeifferi* (273,79 µg/ml, IC₂₅) > *G. resinaceum* (830,81 µg/ml) > *G. lucidum* (1108,31 µg/ml)

4. Резултати и дискусија

Одређивање редукционог потенцијала екстракта (FRAP тест):

EtOH екстракти:

G. applanatum (215,96 mg ек. АК/g с.м.) > *G. pfeifferi* (151,53 mg ек. АК/g с.м.) > *G. lucidum* (110,70 mg ек. АК/g с.м.) > *G. resinaceum* (80,17mg ек. АК/g с.м.)

H₂O екстракти:

G. lucidum (697,78 mg ек. АК/g с.м.) > *G. resinaceum* (296,68 mg ек. АК/g с.м.) > *G. applanatum* (296,19 mg ек. АК/g с.м.) > *G. pfeifferi* (65,23mg ек. АК/g с.м.)

Одређивање редукционог потенцијала екстракта (АЕАС тест):

EtOH екстракти:

G. applanatum (143,09 mg ек. АК/g с.м.) > *G. pfeifferi* (97,06 mg ек. АК/g с.м.) > *G. lucidum* (37,65 mg ек. АК/g с.м.) > *G. resinaceum* (34,43 mg ек. АК/g с.м.)

H₂O екстракти:

G. pfeifferi (99,61 mg ек. АК/g с.м.) > *G. resinaceum* (72,42 mg ек. АК/g с.м.) > *G. applanatum* (68,71 mg ек. АК/g с.м.) > *G. lucidum* (53,90 mg ек. АК/g с.м.)

Садржај укупних фенола:

EtOH екстракти:

G. applanatum (265,38 mg ек. ГК/g с.м.) > *G. lucidum* (81,95 mg ек. ГК/g с.м.) > *G. resinaceum* (44,01 mg ек. ГК/g с.м.) > *G. pfeifferi* (43,69 mg ек. ГК/g с.м.)

H₂O екстракти:

G. pfeifferi (23,13 mg ек. ГК/g с.м.) > *G. applanatum* (18,73 mg ек. ГК/g с.м.) > *G. resinaceum* (11,43 mg ек. ГК/g с.м.) > *G. lucidum* (4,26 mg ек. ГК/g с.м.)

Садржај укупних флавоноида:

EtOH екстракти:

G. lucidum (73,02 mg ек. К/g с.м.) > *G. applanatum* (54,02 mg ек. К/g с.м.) > *G. pfeifferi* (26,29 mg ек. К/g с.м.) > *G. resinaceum* (22,99 mg ек. К/g с.м.)

H₂O екстракти:

G. applanatum (166,10 mg ек. К/g с.м.) > *G. lucidum* (14,90 mg ек. К/g с.м.) > *G. pfeifferi* (10,12 mg ек. К/g с.м.) > *G. resinaceum* (4,38 mg ек. К/g с.м.)

4. Резултати и дискусија

У циљу одређивања корелација фенолног садржаја и антиоксидантне активности анализираних екстраката (**Табела 4.2.**), извршено је поређење анализираних екстраката на основу корелационих фактора (R^2):

DPPH тест:

G. lucidum, H₂O > *G. lucidum*, EtOH > *G. pfeifferi*, EtOH > *G. pfeifferi*, H₂O > *G. applanatum*, H₂O > *G. applanatum*, EtOH > *G. resinaceum*, EtOH > *G. resinaceum*, H₂O

ABTS тест:

G. lucidum, H₂O > *G. applanatum*, EtOH > *G. pfeifferi*, H₂O > *G. applanatum*, H₂O > *G. lucidum*, EtOH > *G. resinaceum*, EtOH > *G. resinaceum*, H₂O > *G. pfeifferi*, EtOH

OH тест:

G. lucidum, H₂O > *G. resinaceum*, EtOH > *G. applanatum*, H₂O > *G. applanatum*, EtOH > *G. lucidum*, EtOH > *G. resinaceum*, H₂O > *G. pfeifferi*, H₂O > *G. pfeifferi*, EtOH

O₂^{•-} тест:

G. lucidum, H₂O > *G. applanatum*, H₂O > *G. pfeifferi*, H₂O > *G. applanatum*, EtOH > *G. resinaceum*, H₂O > *G. lucidum*, EtOH > *G. resinaceum*, EtOH > *G. pfeifferi*, EtOH

NO тест:

G. lucidum, H₂O > *G. applanatum*, H₂O > *G. lucidum*, EtOH > *G. applanatum*, EtOH > *G. pfeifferi*, H₂O > *G. resinaceum*, EtOH > *G. resinaceum*, H₂O > *G. pfeifferi*, EtOH

FRAP тест:

G. lucidum, H₂O > *G. applanatum*, H₂O > *G. applanatum*, EtOH > *G. pfeifferi*, H₂O > *G. pfeifferi*, EtOH > *G. resinaceum*, EtOH > *G. lucidum*, EtOH > *G. resinaceum*, H₂O

AEAC тест:

G. lucidum, H₂O > *G. applanatum*, H₂O > *G. pfeifferi*, H₂O > *G. resinaceum*, EtOH > *G. lucidum*, EtOH > *G. applanatum*, EtOH > *G. pfeifferi*, EtOH > *G. resinaceum*, H₂O

4. Резултати и дискусија

Табела 4.2. Корелација резултата антиоксидантних тестова и садржаја укупних фенола

Тест	<i>G. applanatum</i>		<i>G. lucidum</i>		<i>G. pfeifferi</i>		<i>G. resinaceum</i>	
Корелација са фенолним садржајем (R²)								
	EtOH	H₂O	EtOH	H₂O	EtOH	H₂O	EtOH	H₂O
DPPH	0,76 *	0,81 *	0,98 *	1 *	0,86 *	0,82 *	0,57 *	0,53 *
А.Е.А.С	0,99 *	0,84 *	0,81 *	1 *	0,24	0,95 *	0,77 *	0,34
OH	0,73 *	0,96 *	0,32	0,99 *	0,05	0,16	0,99 *	0,23
O₂⁻	0,90 *	0,98 *	0,65 *	1 *	0,02	0,94 *	0,04	0,67 *
NO	0,96 *	0,98 *	0,97 *	0,99 *	0,03	0,91 *	0,89 *	0,52 *
FRAP	1 *	1 *	0,68 *	1 *	0,75 *	0,98 *	0,71 *	0,26
АЕАС	0,76 *	0,99 *	0,78 *	1 *	0,55 *	0,93 *	0,85 *	0,43

* статистички значајни су они резултати који деле исти суперскрипт (p<0,05)

4. Резултати и дискусија

Узимајући у обзир добијене резултате, применом регресионе анализе израчунати су корелациони фактори између садржаја укупних фенола и антиоксидантних активности, изражених као реципрочне вредности израчунатих IC_{50} (односно IC_{25}), осим у случају ABTS-а, FRAP-а и AEAC-а где су кориштене директне вредности (**Табела 4.2.**).

Ради утврђивања утицаја фенолних једињења (чије је присуство доказано код свих испитиваних екстраката, у већој или мањој мери) на испољену антиоксидантну активност утврђена је корелација укупног садржаја фенолних једињења према IC_{50} вредностима добијеним код DPPH теста (**Табела 4.2.**). На основу вредности корелација између укупног садржаја фенола и DPPH теста већа корелација се уочава за H_2O екстракте врста *G. applanatum* и *G. lucidum* ($R^2=0,81$, односно $R^2=1$), који су показали и најјачи антиоксидантни потенцијал. Висока корелација је уочена и код EtOH екстракта врсте *G. pfeifferi* ($R^2=0,86$). Најслабије корелације између укупних фенола и DPPH теста су код EtOH и H_2O екстраката *G. resinaceum*, ($R^2=0,57$, односно $R^2=0,53$).

На основу вредности корелација између укупног садржаја фенола и ABTS теста, висока корелација се уочава код EtOH екстраката врста *G. applanatum*, *G. lucidum* и *G. resinaceum* ($R^2=0,77$ до $0,99$) али и H_2O екстракта врсте *G. lucidum* ($R^2=1$), тј. код екстраката који испољавају најјачи антиоксидантни потенцијал према ABTS^{•+} радикалу. Висок степен корелације између садржаја фенола и ABTS теста не изненађује с обзиром да су обе методе базиране на трансферу електрона компоненти узорка (Bang и др., 2014) (**Табела 4.2.**).

На основу вредности корелација између укупног садржаја фенола и OH теста висока корелација се уочава за H_2O екстракте врста *G. applanatum* и *G. lucidum* ($R^2=0,96$ и $R^2=0,99$). Висока корелација је уочена и код EtOH екстракта врсте *G. resinaceum* ($R^2=0,99$) (**Табела 4.2.**). Добијени корелациони фактори указују на значај фенолних једињења при неутрализацији OH[•] радикала. Ниски корелациони фактори указују на то да ове класе једињења код испитаних екстраката немају велики утицај при неутрализацији ове слободно радикалске врсте, нпр. код анализираних EtOH и H_2O екстраката

4. Резултати и дискусија

G. pfeifferi ($R^2=0,05$ и $R^2=0,16$). Сви екстракти су показали концентрацијски-зависну активност.

На основу вредности корелација између укупног садржаја фенола и способности екстраката да врше неутрализацију $O_2^{\bullet-}$ радикала, већа корелација се уочава за H_2O екстракте свих испитиваних врста *G. applanatum* и *G. lucidum* ($R^2=0,81$, односно $R^2=1$), који су показали и најјачи антиоксидантни потенцијал. Висока корелација је уочена и код EtOH екстракта врсте *G. pfeifferi* ($R^2=0,86$). Најслабије корелације између укупних фенола и DPPH теста су код EtOH и H_2O екстраката *G. resinaceum*, ($R^2=0,57$, односно $R^2=0,53$) (**Табела 4.2.**).

Утврђена је корелација и код овог антиоксидантног теста са укупним садржајем фенола (**Табела 4.2.**), и добијене вредности корелационих фактора су се кретале у опсегу од 0,03 до 0,99. Највећа вредност корелације NO теста са садржајем укупних фенола је забележена за H_2O екстракт *G. lucidum* ($R^2=0,99$), затим следе H_2O и EtOH екстракти *G. applanatum* ($R^2=0,98$, односно $R^2=0,96$), затим EtOH екстракт *G. lucidum* ($R^2=0,97$) итд.

С обзиром на ниже корелације, и на основу претходно публикованих радова може да се претпостави да су полисахаридна једињења одговорна за испољавање редукционог потенцијала делујући као електрон донори конвертујући ROS у мање стабилне продукте и тиме прекидају ланчану реакцију (Fan и др., 2012; Kozarski и др., 2011). Најјачи редукциони потенцијал испољава EtOH екстракт врсте *G. applanatum*, који уједно има и највећи садржај моносахаридних компоненти (Glc, Fru, Xyl) (**Прилог 7.1.4.; Табеле 7.7., 7.9., 7.13.**).

Висок степен корелације између садржаја укупних фенола и FRAP теста показују углавном EtOH екстракти свих испитиваних врста (изузетак *G. resinaceum*, $R^2=0,71$, односно $R^2=0,26$ за H_2O екстракт) (**Табела 4.2.**).

На основу вредности корелација између укупног садржаја фенола и АЕАС теста веома висока корелација се уочава код анализираних H_2O екстраката три анализираних врсте: *G. applanatum* ($R^2=0,99$), *G. lucidum* ($R^2=1$) и *G. pfeifferi* ($R^2=0,93$) (**Табела 4.2.**). Остали анализирани екстракти показују

4. Резултати и дискусија

умерену до ниску корелацију због чега можемо претпоставити да ова једињења немају кључну улогу остваривању ове активности АЕАС тестом.

Регресиона анализа, примењена на добијене резултате антиоксидантне активности екстракта рода *Ganoderma* показује да постоји висок степен корелације садржаја укупних фенола и способности „хватања“ DPPH, ABTS и NO радикала, као и FRAP редукционог потенцијала, што указује на то да при неутрализацији слободно радикалских врста, када се она одвија по механизму трансфера електрона тј. редукције, фенолна једињења имају кључну улогу. То може да буде последица чињенице да фенолна једињења нису само богати извори електрона, већ њихове хидроксилне групе могу деловати и као доноси водоника као последица чега се јавља добра корелација фенола и ABTS теста (Bang и др., 2014).

Мање вредности ових корелационих фактора утврђене су између садржаја укупних фенола и тестова редукционог потенцијала анализираних екстракта и других антиоксидантних тестова (OH, O₂^{•-} и АЕАС), што указује да садржај фенола утиче на ниво слободно радикалске неутрализације (редукције), али да није у директној корелацији. Добијени корелациони фактори указују на значајну активност фенола у овим процесима, а нижи корелациони фактори могу бити последица активности других класа једињења присутних у овим врстама, као и осетљивости саме методе (утицај светлости, температуре). Добијени корелациони фактори указују на значај фенолних једињења при испољавању антиоксидантног деловања, иако нису једини. Неке од не-фенолних класа једињења такође могу да реагују са Folin-Ciocalteu-овим реагенсом које нису толико ефикасне као „хватачи“ слободних-радикала (лимонска киселина, FeSO₄, D-глукоза) али могу да утичу на укупан корелациони фактор (Terpinс и др., 2012).

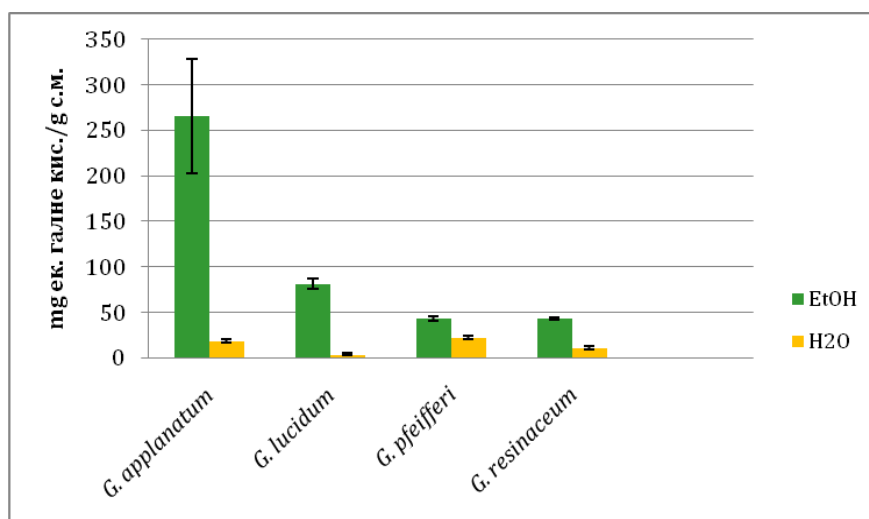
4. Резултати и дискусија

4.2.7. Одређивање садржаја укупних фенола и флавоноида

Фенолна једињења се сматрају најдоминантнијим неесенцијалним једињењима од значаја за људско здравље, захваљујући способности да врше хелирање метала, инхибицију липооксигеназе и „хватање“ слободно-радикалских врста (Decker, 1997).

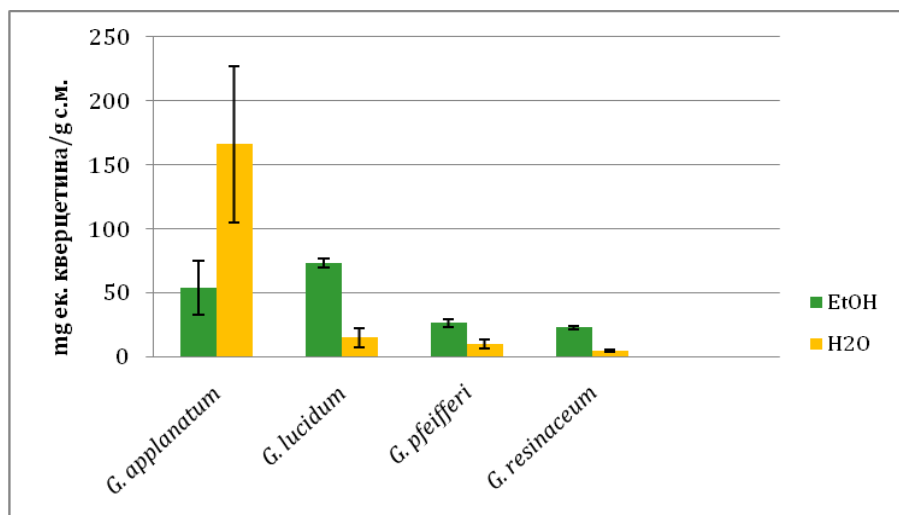
Пошто се сматра да је антиоксидантна активност екстраката гљива у великој мери зависна од садржаја фенолних и флавоноидних једињења, одређен је њихов укупни садржај и резултати су приказани на **Хистограмима 4.12. и 4.13.**

Хистограм 4.12. Поређење садржаја укупних фенола у EtOH и H₂O екстрактима гљива рода *Ganoderma*



Хистограм 4.13. Поређење садржаја укупних флавоноида у EtOH и H₂O екстрактима гљива рода *Ganoderma*

4. Резултати и дискусија



Највећи садржај укупних фенола утврђен је у EtOH екстракту гљиве *G. applanatum* (265,38 mg ек. галне киселине/g с.м.), а најмањи у H₂O екстракту врсте *G. lucidum* (4,26 mg ек. галне киселине/g с.м.). Код H₂O екстраката добијени резултати нису били статистички значајни, док је EtOH екстракт врсте *G. applanatum* показао статистички значајно већи садржај укупних фенола у поређењу са преосталим екстрактима ($p < 0,01$; Tukey тест, ANOVA) (**Прилог 7.2.8.; Табела 7.26.**).

Највећи садржај флавоноида (166,10 mg ек. кверцетина/g с.м.) такође је одређен код гљиве *G. applanatum* али у H₂O екстракту, а најмањи у H₂O екстракту *G. resinaceum* (4,38 mg ек. кверцетина/g с.м.). H₂O екстракт врсте *G. applanatum* показао је статистички значајно већи садржај укупних флавоноида у поређењу са преосталим екстрактима ($p < 0,01$; Tukey тест, ANOVA) (**Прилог 7.2.9.; Табела 7.28.**).

До сада је у великој мери рађено на спектрофотометријском одређивању фенолног садржаја код три од четири испитиване врсте (*G. pfeifferi* је најмање истражена врста у погледу антиоксидативног потенцијала). Zengin и сар. (2015) су испитивали MeOH и H₂O екстракте *G. applanatum* и *G. resinaceum* који уједно представља једини рад базиран на антиоксидантном испитивању *G. resinaceum*. Добијени резултати за ову врсту су у сагласности са публикованим резултатима, јер су анализирани EtOH екстракти (упоредиви по поларности са MeOH) богатији фенолним компонентама (*G. applanatum*: 265,38 у односу на 29,66 mg ек. галне киселине/g с.м.; *G. resinaceum*: 44,01 у односу на

4. Резултати и дискусија

37,32 mg ек. галне киселине/g с.м.) у односу на H₂O, с тим да је код нас забележен нешто нижи садржај фенолних компоненти у односу на екстракте пореклом из Турске (*G. applanatum*: 18,73 у односу на 21,97 mg ек. галне киселине/g с.м.; *G. resinaceum*: 11,43 у односу на 36,39 mg ек. галне киселине/g с.м.). У истом раду је одређен и садржај флавоноида, који је у сагласности са нашим резултатима, с тим да је код анализираних H₂O екстраката аутохтоне врсте *G. applanatum* пореклом са Фрушке горе много већи садржај флавоноида него код исте врсте пореклом из Турске (166,10 у односу на 14,78 mg ек. кверцетина/g с.м.).

Најистраживанија врста рода *Ganoderma* је *G. lucidum*, а посебно оних базираних на испитивањима садржаја укупних фенола, док је садржај флавоноида истражен у мањој мери (Bang и др., 2014; Heleno и др., 2012; Hung и Nhi, 2012; Karaman и др., 2012; Mau и др., 2002; Ogidi и Ouyetayo, 2016; Sheikh и др., 2014; Sheikh и др., 2015; Stilinović и др., 2014).

Поређењем добијених резултата долази се до закључка да фенолни садржај доминира код EtOH (MeOH) екстраката у односу на H₂O, и да су гљиве са територије Србије богатије наведеним компонентама са изузетком нешто већег садржаја код EtOH екстракта *G. lucidum* из Нигерије (81,95 у односу на 83,80 mg ек. галне киселине/g с.м.) где су екстракти припремани на идентичан начин (Ogidi и Ouyetayo, 2016). Резултати одређеног укупног садржаја флавоноида су у сагласности са публикованим резултатима (Karaman и др., 2012; Kim и др., 2003; Ogidi и Ouyetayo, 2016; Sudheer и др., 2016; Zengin и др., 2015; Zhang и др., 2015), док је њихов садржај доста нижи у поређењу са садржајем укупних фенолних компоненти.

Битно је нагласити да код ове методе постоје и неки аналитички недостаци: с обзиром да је Folin-Ciocalteu реагенс мешавина фосфотунгстичне и фосфомолибденске киселине које могу реаговати са другим не фенолним једињењима доводећи до већих вредности апсорбација, а самим тим и веће вредности за фенолни садржај (Stilinović и др., 2014). Из тог разлога, овај метод се користи као прелиминарни скрининг за LC-MS/MS методу.

Фенолна једињења присутна код гљива имају способност хелирања про- оксидантних металних јона и на тај начин спречава формирање слободно-

4. Резултати и дискусија

радикалских врста (Rajasekaran и Kalaimagal, 2011). Поред већ наведеног утицаја других класа једињења, и саме методе одређивања антиоксидантног потенцијала имају више недостатака који могу утицати на степен корелације. Наиме, присуство Fe-хелационих агенаса у испитиваним екстрактима може утицати на Фентонову реакцију, а ТВА метода коришћена за детекцију MDA, једног од крајњих производа код ОН теста, није специфична ни довољно осетљива за овај производ, јер и друга, структурно слична једињења, углавном диалдехиди и угљени хидрати заступљени у врстама гљива, такође могу реаговати са ТВА.

Испитивање антиоксидантног потенцијала врста рода *Ganoderma* био је предмет истраживања многих студија чији литературни подаци су детаљно цитирани у овој дисертацији у великој мери, а за врсте *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* не постоје нама доступни литературни наводи о антиоксидантном потенцијалу, што је највероватније последица тога да су оне генерално испитане у доста мањој мери у односу на прве две врсте.

Постојеће податке из литературе и резултате добијене у приказаним испитивањима тешко је поредити због различитих експерименталних услова. Међутим у нашим испитивањима, применом антиоксидантних тестова који се заснивају на различитим принципима одређивања антиоксидантног потенцијала и одређивањем укупног садржаја фенолних и флавоноидних компонената за осам екстраката, при истим експерименталним условима добијени резултати се могу лако поредити и на основу њих се може одредити најпотентнији екстракт.

У већини примењених тестова, најпотентнији екстракти били су десет или више пута јачи антиоксидантни агенси од најмање активног екстракта код сваког појединачног теста, што указује на очигледну разлику у антиоксидантном потенцијалу различитих врста. Упоређујући резултате антиоксидантног потенцијала испитиваних екстраката са потенцијалом познатог антиоксидантних стандарда (PG), једино су екстракти врста *G. applanatum* и *G. lucidum* при неутрализацији супероксид анјон радикала показали значајнију активност (**Прилог 7.2.; Табела 7.14.**).

4. Резултати и дискусија

4.3. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИОКСИДАНТНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА ГЉИВА *IN VIVO*

У *Поглављу 4.2.* приказани су резултати *in vitro* антиоксидантних активности применом различитих тестова, где је показано да су првенствено H₂O екстракти гљива ефикасни у заштити ћелија и ткива од оксидативног стреса.

С обзиром на варијације антиоксидантних активности одређених различитим методама *in vitro*, урађени су тестови *in vivo* у циљу потврђивања антиоксидантне активности испитиваних екстраката. Као и код испитивања *in vitro*, и овде се претпоставља да су управо фенолна, али и полисахаридна једињења код *Ganoderma* врста у великој мери способна да врше неутрализацију ROS-а активирањем антиоксидантних ензима, „хватањем“ слободних радикала и инхибицијом липидне пероксидације (Fan и др., 2012; Nie и др., 2013; Terpinc и др., 2012; XiaoPing и др., 2009; You и Liu, 2002).

С обзиром да макрогљиве (нпр. *G. lucidum* и *G. applanatum*) (Boh и др., 2000; Ming и др., 2002; Muhsin и др., 2011; Wachtel-Galor и др., 2011; Wasser, 2005) садрже широк спектар биоактивних једињења (феноли, полисахариди, протеини) и да се већ годинама ради како на њиховој примени као првобитно традиционалних народних лекова, тако и на популаризацији и њиховој широј примени као терапеутика, неопходно је познавање њихових, не само позитивних, већ и нежељених споредних ефеката. Један од механизма акутног, али и хроничног нарушавања здравља и промене одговора, како на алтернативну, тако и на конвенционалну терапију, јесте испитивање система примарне заштите у организму (Ferreira и др., 2009).

Јетра је главни детоксификациони орган у организму, а добро је познато да ROS може неселективно оштетити структурни и функционални интегритет ћелија преко вирусних инфекција, аутоимуних обољења или ксенобиотицима и тиме нарушити опште стање организма (Li и др., 2015).

С обзиром да је један од циљева ове дисертације било испитивање антидијабетогеног ефекта EtOH и H₂O екстраката *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*, експерименталним животињама је инјектован алоксан као брз и потентан изазивач *Diabetes mellitus*-а који доводи до хипергликемије и оштећења

4. Резултати и дискусија

панкреаса услед повећане продукције ROS-а (Zhang и др., 2003). Из литературних података је познато да се механизам токсичности третманом алоксана на експерименталне животиње заснива на формирању слободно-радикалских врста, те су узорци јетре животиња које су првобитно третиране алоксаном, а потом и физиолошким раствором или EtOH и H₂O екстрактима гљива *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*, узимани за даље анализе (Etuk, 2010; Lenzen, 2008). Алоксан је токсични аналог глукозе који је примењен у циљу постизања дијабетогеног ефекта на експерименталним животињама који се акумулира у β-ћелијама панкреаса помоћу GLUT2 транспортера глукозе. У присуству интрацелуларних тиола (GSH) алоксан доводи до формирања ROS-а, где као производ настаје диалуронска киселина, чијом аутооксидацијом настају O₂^{•-}, H₂O₂ и OH[•] радикал (Lenzen, 2008).

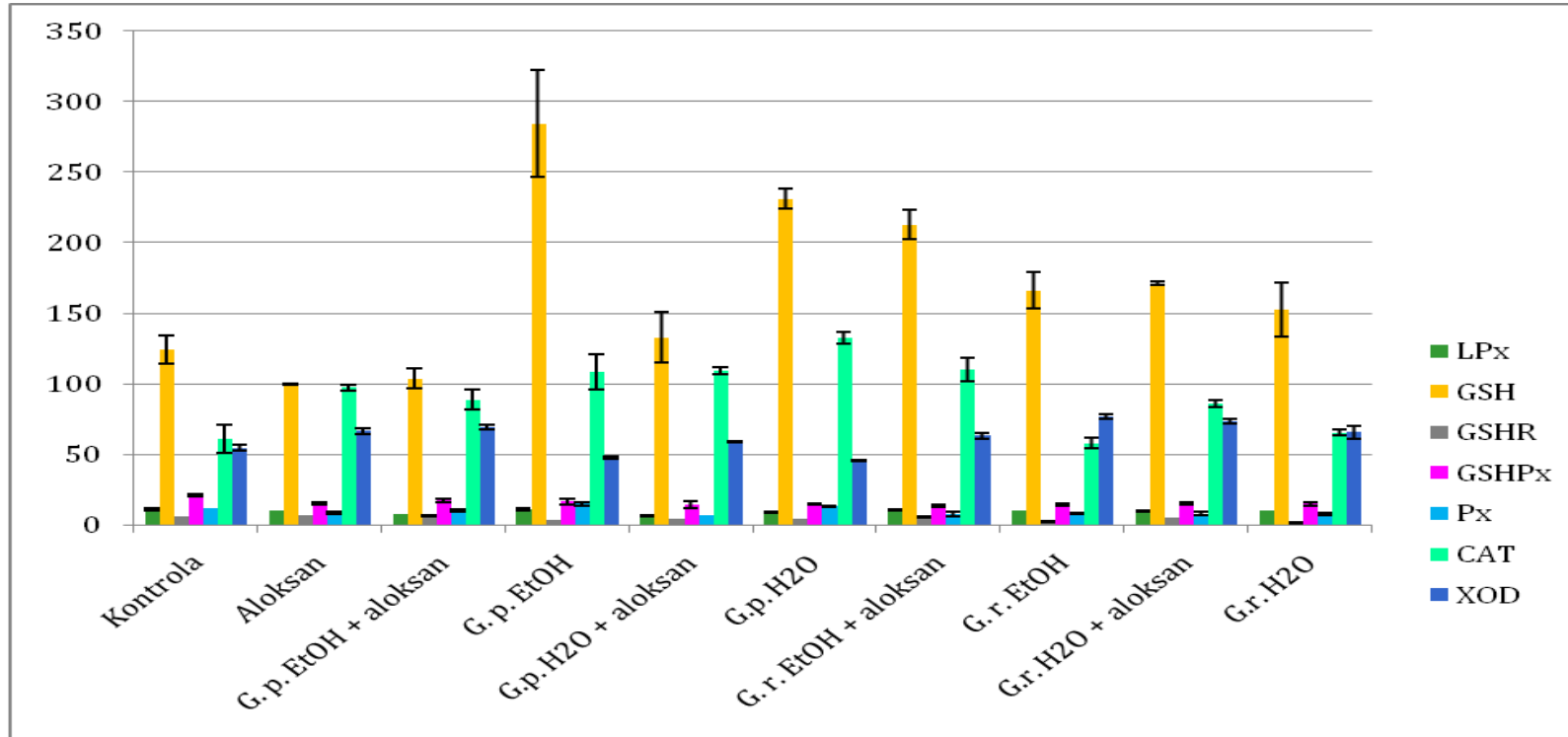
На основу анализе литературних података (De Silva и др., 2012; Hseu и др., 2002; Klupp и др., 2015; Mohammed и др., 2007) се долази до сазнања да примена различитих екстраката гљива доводи до смањења липидне пероксидације и самим тим до оштећења ћелијске мембране. С обзиром да су истраживања *in vivo* антиоксидантне способности *Ganoderma* гљива базирана на најистраженијој врсти *G. lucidum* на основу свега наведеног, приступило се испитивању могућег оштећења јетре праћењем липидне пероксидације (LPx), количине GSH, активности ензима оксидативног стреса (GSHPx, GSHR, Px, CAT, XOD), али и у којој мери је алоксан утицао на оксидативни стрес код неистражених врста *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*.

4.3.1. Хепатопротективни ефекат на хомогенату јетре пацова

Резултати деловања екстраката гљива рода *Ganoderma* на биохемијске параметре праћења нивоа оксидативног стреса приказани су у **Прилогу 7.3.**; **Табеле 7.34.** и **7.35.** и на **Хистограму 4.14.**

4. Резултати и дискусија

Хистограм 4.14. Утицај алоксана и EtOH и H₂O екстракта гљива рода *Ganoderma* на биохемијске параметре у хомогенату јетре пацова



Садржај GSH је изражен у nmol GSH/mg протеина. Активности GSHR, GSHPx, Px, CAT и XOD су изражене у nmol/mg min протеина. Интензитет LPx је изражен у nmol MDA/mg протеина.

4. Резултати и дискусија

У поређењу са контролом, интензитет липидне пероксидације (LPx) је значајно смањен при третману са EtOH и H₂O екстрактима врста *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*, изузев код примене EtOH екстракта *G. pfeifferi* где је незнатно повећан интензитет LPx (10,93±0,54, односно 10,81±0,74 nmol малонилалдехида (MDA)/mg протеина). Преосталих седам екстраката (H₂O екстракт *G. pfeifferi* и EtOH и H₂O екстракти *G. resinaceum*), како у комбинацији са алоксаном тако и без њега, испољили су протективно дејство што указује на антиоксидантни ефекат. Третман са алоксаном такође не доводи до повећања интензитета LPx у поређењу са нетретираним животињама (9,69±0,001, односно 10,81nmol±0,74 MDA/mg протеина). У комбинацији EtOH и H₂O екстраката *G. resinaceum*, како са алоксаном тако и без њега, добијене вредности су сличне вредностима контроле што потврђује донекле примарни ефекат алоксана, али и ефекте ове до сада неиспитане врсте. С обзиром да је процес липидне пероксидације значајан показатељ оксидативног стреса, процес инхибиције LPx од стране већине испитиваних екстраката гљива указује на њихов антиоксидантни потенцијал.

Захваљујући чињеници да гљиве рода *Ganoderma* садрже широк спектар биоактивних једињења (фенолна једињења, полисахариди, тритерпени и протеини), може да се претпостави да су нека од тих једињења, а нарочито полисахариди и тритерпеноиди, одговорни за смањење LPx (Deeralakshmi и др., 2013; 2008; Su и др., 2013; XiaoPing и др., 2009). Sanodya и сар. (2009) су утврдили да секундарни биомолекули типа терпеноида (ганодеричне киселине R и S, ганодерерична киселина А) из EtOH и H₂O екстраката *G. lucidum* делују као хепатопротективни агенси при индукцији дијабетеса алоксаном. Резултати одређивања LPx са другим индуцерима оксидативног стреса (D-галактозамин, CCl₄, FYGL) на врсти *G. lucidum* (Ma и др., 2015; Pan и др., 2013; Shi и др., 2008) су доста слични резултатима приказаним у овој дисертацији. На основу добијених резултата може се закључити да је већина испитаних екстраката показала протективни ефекат у односу на алоксан индуковану липидну пероксидацију, где су три од осам испитиваних екстраката показали статистички значајне резултате у односу на контролу (EtOH и H₂O екстракт

4. Резултати и дискусија

G. pfeifferi уз додатак алоксана као и H₂O екстракт *G. pfeifferi*; $p < 0,01$) (**Прилог 7.3.; Табеле 7.34. и 7.35.**).

Само је EtOH екстракт *G. pfeifferi* са алоксаном смањιο садржај GSH у односу на контролу (физиолошки) ($103,63 \pm 6,87$, односно $124,30 \pm 9,91$ nmol GSH/mg протеина) (**Хистограм 4.14.**). Третман са алоксаном такође доводи до смањења садржаја GSH у хомогенату јетре мишева у односу на контролу ($99,25 \pm 0,39$, односно $124,30 \pm 9,91$ nmol GSH/mg протеина). Алоксан је прооксидант, а смањење садржаја GSH је један од одбрамбених механизма заштите организма од ROS-а (Sarakal и др., 2008; Zhang и др., 2003). Екстракти гљива рода *Ganoderma* на експерименталне животиње третиране алоксаном утичу на смањење нивоа GSH у односу на контролу. Третман са EtOH и H₂O екстрактом *G. pfeifferi*, као и EtOH екстрактом *G. resinaceum* са алоксаном, доводи до статистички значајне промене, али не и смањења у односу на контролне групе ($p < 0,01$, Tukey тест, ANOVA) (**Прилог 7.3.; Табеле 7.34. и 7.35.**).

Један од разлога може бити и тај што једињења која садрже SH групе при ниским концентрацијама испољавају антиоксидантну активност, а при вишим концентрацијама прооксидантни ефекат (Lawson, 1998). Познато је да се редукција алоксана до диалуронске киселине одвија помоћу тиола, најчешће GSH, који се притом оксидује, и при чему може настати и алоксан-GSH као производ (Lenzen, 2008). Добијени резултати указују да управо алоксан у највећој мери смањује садржај GSH, што потврђује горе наведени механизам деловања алоксана.

Испитивани екстракти су имали различит утицај на активност GSHR. Само EtOH екстракт са алоксаном *G. pfeifferi* је у малој мери повећао активност GSHR ($6,25 \pm 0,03$ у односу на $6,21 \pm 0,01$ nmol/mg min протеина), док је активност овог ензима статистички значајно смањена при третману са EtOH и H₂O екстрактима *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*, али и код H₂O екстраката уз додатак алоксана код обе испитиване врсте. EtOH екстракт *G. resinaceum* са алоксаном смањује активност GSHR, што није статистички значајно ($p < 0,01$, Tukey тест, ANOVA) (**Прилог 7.3.; Табеле 7.34. и 7.35.**). Третман са алоксаном је повећао активност GSHR у односу на нетретиране животиње ($6,73 \pm 0,06$, у односу на

4. Резултати и дискусија

6,21±0,01 nmol/mg min протеина). За анализиране врсте гљива нема резултата о активностима GSHR у литератури, док су неки подаци доступни за *G. lucidum*, где су EtOH екстракти повећали активност овог ензима (Su и др., 2013).

Смањена активност GSHPx током третмана лабораторијских животиња је у корелацији са претходно објављеним истраживањима на *G. lucidum*, где такође није забележен пораст активности GSHPx (Deeralakshmi и др., 2013; Su и др., 2013; XiaoPing и др., 2009). Третман са алоксаном није повећао активност GSHPx у односу на контролну групу (14,86±0,58 у односу на 21,11±0,96 nmol/mg min протеина). Добијени резултати статистички значајно смањују активност GSHPx са изузетком EtOH екстракта *G. pfeifferi*, како са алоксаном тако и без алоксана ($p < 0,01$, Tukey тест, ANOVA) (**Прилог 7.3.; Табела 7.34.**).

Активност ензима пероксидазе (Px) повећана је при третирању животиња са EtOH и H₂O екстрактом *G. pfeifferi* (14,66±1,03, односно 12,96±0,14 у односу на 11,70±0,13 nmol/mg min протеина), што није статистички значајно ($p < 0,01$, Tukey тест, ANOVA) (**Прилог 7.3.; Табеле 7.34. и 7.35.**). Статистички значајно је смањена активност ензима Px применом преосталих екстраката са изузетком EtOH екстракта *G. pfeifferi* уз додатак алоксана у односу на контролу ($p < 0,01$, Tukey тест, ANOVA) (**Прилог 7.3.; Табеле 7.34. и 7.35.**).

На **Хистограму 4.14.** се може видети да су сва четири екстракта гљива у комбинацији са алоксаном утицала на смањење активности Px. Ово може бити последица чињенице да фенолна једињења, потенцијални донори водоника у реакцији коју катализује Px не доприносе овој активности или нису присутна у довољној концентрацији да би утицала на повећање ензимске активности (Veitch, 2004).

Ово је у сагласности са литературним подацима где се сматра да су за испољавање хепатопротективног ефекта код *G. lucidum* углавном одговорни терпеноиди и полисахариди (Sandiуа и др., 2009; Su и др., 2013), док су типични примери једињења која могу бити супстрати пероксидазе: ароматични амини, индоли, фенолне киселине, феноли и азо-диени (Veitch, 2004).

Активност ензима каталазе (CAT) није статистички значајно промењена само код два екстраката гљиве *G. resinaceum* и то код EtOH и H₂O екстракта. Друга два екстракта ове гљиве у комбинацији са алоксаном су показала

4. Резултати и дискусија

статистички значајно већу активност овог ензима у односу на контролу ($109,99 \pm 8,33$, односно $86,22 \pm 2,52$ у односу на $61,06 \pm 9,98$ nmol/mg min протеина) ($p < 0,01$, Tukey тест, ANOVA) (**Прилог 7.3.; Табеле 7.34. и 7.35.**). Сви екстракти, H₂O и EtOH са и без алоксана гљиве *G. pfeifferi* су статистички значајно повећали активност каталазе у односу на контролу ($p < 0,01$, Tukey тест, ANOVA) (**Прилог 7.3.; Табела 7.34.**). Алоксан је статистички значајно повећао активност САТ у односу на контролну групу ($97,12 \pm 1,86$ у односу на $61,06 \pm 9,98$ nmol/mg min протеина). На основу добијених резултата може се претпоставити да су примењени екстракти, а и алоксан, обезбедили повећање активности каталазе.

Активност ензима ксантин оксидазе (XOD) је статистички значајно смањена при третману са H₂O и EtOH екстрактом *G. pfeifferi*, док су остали екстракти обе врсте статистички значајно повећали активност ензима, са изузетком H₂O екстракта *G. pfeifferi* са алоксаном ($p < 0,01$, Tukey тест, ANOVA) (**Прилог 7.3.; Табеле 7.34. и 7.35.**). Активност XOD у јетри пацова је повећана и при третману са прооксидантом алоксаном у односу на контролну групу ($66,38 \pm 1,80$ у односу на $54,58 \pm 1,88$ nmol/mg min протеина). Сви испитивани екстракти су након примене алоксана у односу на контролну групу повећали активност XOD. Ниже вредности за XOD су забележене код здравих људи, а пораст вредности је знак оштећења јетре. Високе вредности за XOD су забележене код *D. mellitus*-а, што можемо повезати са нашим резултатима, с обзиром да је пацовима изазван *D. mellitus* додатком алоксана, и високе вредности код већине испитиваних екстраката указују на оксидативни стрес (Inkster и др., 2007). H₂O и EtOH екстракт врсте *G. pfeifferi* испољава протективни ефекат јер смањује активност XOD. Sarnesto и сар. (1996) су у свом раду указали да су наведени екстракти инхибитори XOD, као и „хватачи“ супероксид анјон радикала. Из литературе је познато да флавоноиди могу деловати као инхибитори, односно активатори одређених ензима из групе оксидоредуктаза (Hille, 2006), а с обзиром на већи садржај флавоноида код екстраката врсте *G. pfeifferi* у односу на *G. resinaceum* (**Поглавље 4.2.7.**), можемо да претпоставимо да је хепатопротективни ефекат последица активности ове групе једињења.

4. Резултати и дискусија

4.4. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИМИКРОБНЕ АКТИВНОСТИ ЕКСТРАКАТА ГЉИВА

Бројне студије су показале да макрогљиве продукују широк спектар фармаколошки активних једињења (Karaman и др., 2012b; Lindequist и др., 2005; Ren и др., 2014; Sanodya и др., 2009; Trigos и Medellin, 2011; Zjawiony, 2004). Поредећи број испитиваних врста са њиховим хемијским и фармаколошким ефектима који су још увек доста неистражени, може се рећи да је за мали број хемијски активних једињења је утврђена антимикробна активност (Alves и др., 2012; Alves и др., 2013; Kamra и Bhatt, 2012; Nayak и др., 2010). За макрогљиве је од есенцијалне важности да у свом саставу садрже антибактеријска и антифунгална једињења како би преживеле у животној средини (Guaní-Guerra и др., 2010). Захваљујући литературним подацима, више од 75 % испитиваних полипорних врста показује снажну антимикробну активност углавном на Gram + бактерије (*B. subtilis*, *S. aureus* и *M. flavus*).

Велики број фармаколошки активних једињења као што су сесквитерпени (Mothana и др., 2000; Mothana и др., 2003), хидрохинони (Mothana и др., 2003; Niedermayer и др., 2013), полисахариди (Amaral и др., 2008; Gao и др., 2003; Lee и др., 2007; Mahmoud и др., 2007; Nie и др., 2013; Paterson, 2006), полисахарид-протеински комплекси (Eo и др., 2000; Nie и др., 2013), ланостаноидни тритерпени (Boh и др., 2000; Mothana и др., 2003; Smania и др., 2003), стероиди (Cole и Schweikert, 2003; Smania и др., 1999), нуклеозиди, алкалоиди и витамини (Paterson, 2006) је одређен у плодним телима полипорних гљива, где спадају и врсте рода *Ganoderma* са широким спектром фармаколошких активности укључујући и антимикробна својства (Paterson и др., 2006). Alves и сар. (2013) су радили на утврђивању утицаја фенолних једињења, првенствено фенолних киселина (деривати бензојеве и циметне киселине) на антимикробну активност екстраката гљива *A. arvensis*, *A. bisporus*, *C. cibarius*, *F. hepatica*, *L. delicious* и др. (Alves и др., 2012; Alves и др., 2013). Добијени резултати упућују на то да су једињења 2, 4-дихидробензојева киселина, протокатехинска, ванилинска и р-кумарна киселина, чије присуство је доказано и у нашем раду, одговорна за снажну антимикробну активност и на Gram + и Gram - бактеријске сојеве, док деривати циметне киселине

4. Резултати и дискусија

испољавају јаку антимикробну активност на Gram + и Gram – коке (Alves и др., 2013). Иако су код испитиваних врста у много мањој количини заступљени флавоноиди, није занемарљив ни њихов антимикробни потенцијал (Orhan и др., 2010). Од свих набројаних група једињења ипак се најчешће директна антимикробна својства приписују терпеноидима (Smania и др., 1999; Yihuai и др., 2003; Zjawiony и др., 2004). Бројни литературни подаци произашли из истраживања антибактеријске активности *Ganoderma* врста (Alves и др., 2012; Karaman и др., 2012b; Li и др., 2012; Mothana и др., 2000; Nayak и др., 2010; Prasad и Wesely, 2008; Quereshi и др., 2010) указују на значај популаризације употребе ових макрогљива првенствено на мултирезистентне бактерије које настају при интензивној употреби антибиотика код различитих обољења (Offodile и др., 2005). *G. lucidum* је једна од врста која поседује широк спектар биоактивних једињења (више од 120 различитих тритерпена, полисахарида, протеина и др.) и фармаколошких ефеката (Prasad и Wesely, 2008).

Утврђено је да нови сесквитерпеноидни хидрохинони из *G. pfeifferi* (ганомицин А и В) инхибирају раст *S. aureus* (Mothana и др., 2000), док три ланостаноидна стерола *G. applanatum*: 5 α -ергост-7ен-3 β -ол, 5 α -ергост-7,22-диен-3 β -ол и 5,8-епидиокси-5 α , 8 α -ергост-6, 22-диен-3 β -ол који су испитивана на Gram + и Gram – бактеријске културе показали су већу осетљивост према Gram + бактеријама (Smania и др., 1999)

Антивирална активност је везана како за „цели“ („сирови“) екстракт гљива тако и за изолована једињења (најчешће мале молекулске масе), која могу директно узроковати инхибицију виралних ензима, синтезу виралне нуклеинске киселине или адсорпцију вируса у ћелије сисара (Lindequist и др., 2005). До испољавања активности индиректних антивиралних агенаса у макрогљивама долази се имуностимулирајућом активношћу полисахарида или других комплекснијих молекула које садрже (Brandt и Piraino, 2000). Неколико тритерпена из *G. lucidum* (ганодериол F, ганодерманонтрион и ганодерична киселина В) су показали активност на HIV-1 вирус (Lindequist и др., 2005). Полисахариди везани у полисахарид – протеинске комплексе делују као инхибитори ранијих фаза инфекције механизмима: инхибиција везивања

4. Резултати и дискусија

вируса за ћелије, инхибиција фузије вирус-ћелија или преко оба механизма (Ео и др., 2000).

Последњих десет година у порасту је интерес за антифунгалним супстанцама природног порекла (најчешће пептидне природе), које могу бити веома корисне у третманима инфекција, а поред антибактеријских агенаса су неопходне за опстанак гљива у животној средини (Guani-Guerra и др., 2010; Lindequist и др., 2005).

У овом раду анализирана је антимикробна активност H_2O , EtOH и $CHCl_3$ екстраката гљива (**Табела 4.3.**) на АТСС референтне бактеријске културе, од којих су четири Gram – позитивне (два изолата *S. aureus*, *B. cereus*, *E. faecalis*), а пет Gram – негативних (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*). Очекивано је да се у H_2O екстрактима налазе поларнија једињења која су растворљива у води (протеини и полисахариди, док се у нешто мање поларном етанолу очекују полифенолна и терпеноидна једињења (Cowan, 1999), за која је на основу литературних података познато да имају антибактеријско деловање (Karaman и др., 2010; Mothana и др., 2000).

4. Резултати и дискусија

Табела 4.3. Врсте гљива и екстракта испитиваних у оквиру одређивања антимикробне активности

МЕТОДА	ЕКСТРАКЦИОНО СРЕДСТВО/РАСТВОРАЧ				референце
	EtOH	H ₂ O	CHCl ₃	DMSO	
А.БАКТЕРИЈСКА АКТИВНОСТ	<i>G. applanatum</i> <i>G. lucidum</i> <i>G. pfeifferi</i> <i>G. resinaceum</i>	-	<i>G. applanatum</i> <i>G. resinaceum</i>	-	Alves и др., 2013; Karaman и др., 2010; Karaman и др., 2012b; Li и др., 2012; Mothana и др., 2000; Offodile и др., 2005; Prasad и Wesely, 2008; Quereshi и др., 2010; Smania и др., 1999
А.ФУНГАЛНА АКТИВНОСТ	<i>G. pfeifferi</i> <i>G. resinaceum</i>	-	-	-	Nayak и др., 2010; Tanaka и др., 1989; Wang и Ng, 2004; Smania и др., 2000
А.ВИРАЛНА АКТИВНОСТ	<i>G. applanatum</i> <i>G. lucidum</i> <i>G. pfeifferi</i> <i>G. resinaceum</i>	<i>G. applanatum</i> <i>G. lucidum</i> <i>G. pfeifferi</i> <i>G. resinaceum</i>		<i>G. applanatum</i> <i>G. lucidum</i> <i>G. pfeifferi</i> <i>G. resinaceum</i>	Ео и др., 2000; Lindequist и др., 2005; Mothana и др., 2003; Niedermeyer и др., 2005

4. Резултати и дискусија

4.4.1. Антибактеријска активност

Антибиограм

Антибиограми дају податке о бактеријској осетљивости на специфичне антибиотике, на основу диск-дифузионе Kirbi-Bauerov-e процедуре (<http://en.wikipedia.org/wiki/Antibiogram>), па је стога у овој дисертацији проверена осетљивост анализираних сојева на одређене антибиотике по стандардној процедури (CLSI, 2005).

За тест осетљивости употребљено је пет врста антибиотика са дисковима пречника 9 mm. Кориштени су амикацин (10 µg/mL), тетрациклин (10 µg/mL), метицилин (10 µg/mL), канамицин (10 µg/mL) и цефтриаксон (10 µg/mL). Испитана је осетљивост следећих бактеријских сојева: *P. aeruginosa* ATCC 35554, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 19433, *E. aerogenes* ATCC 13048, *P. mirabilis* ATCC 12453, *E. coli* ATCC 11229, *S. aureus* ATCC 6538 и *B. cereus* ATCC 11778, *E. coli* ATCC 11775.

Након инкубације (37 °C, 24h) измерен је дијаметар зона инхибиције и осетљивост сваке бактерије је процењена на осетљиву (S), интермедијерну (I) и резистентну (R) на основу референтних табела за антибиотике (табеле произвођача (Torlak, Београд)).

Табела 4.4. Антибиограм анализираних бактеријских сојева

	AMK	TET	MET	KAN	CRO
<i>E. coli</i> ATCC11775	22(S)	25(I)	0 (R)	20(R)	29(S)
<i>S. aureus</i> ATCC6538	21(S)	31(S)	26(S)	28(S)	25(S)
<i>E. coli</i> ATCC11229	23(S)	22(R)	0 (R)	22(R)	30(S)
<i>E. aerogenes</i> ATCC13048	21(S)	24(I)	0 (R)	19(R)	25(S)
<i>B. cereus</i> ATCC11778	22(S)	24(I)	0 (R)	20(R)	10(R)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC35554	21(S)	12(R)	0 (R)	0 (R)	12(R)
<i>E. foecalis</i> ATCC19433	0 (R)	30(S)	0 (R)	12(R)	16(S)
<i>S. aureus</i> ATCC25923	25(S)	34(S)	35(S)	25(I)	27(S)

Легенда: S- сензитиван, I- интермедијеран, R- резистентан; Антибиотици: AMK- амикацин (amikacin), TET- тетрациклин (tetracycline), MET- метицилин (methicillin), KAN- канамицин (kanamycin), CRO- цефтриаксон (ceftriaxone)

На основу резултата антибиограма може се закључити да је највећи број испитиваних сојева осетљив на амикацин, осим *E. fecalis* ATCC 19433 која је резистентна. На тетрациклин су резистенцију показали: *P. aeruginosa* ATCC 35554,

4. Резултати и дискусија

E. coli ATCC 11229, док су сојеви *E. aerogenes* ATCC 13048, *B. cereus* ATCC 11778 и *E. coli* ATCC 11775 интермедијерне осетљивости, а Gram + бактерије су биле сензитивне. На метицилин и канамицин су сви сојеви бактерија резистентни осим два соја *S. aureus* ATCC 6538 и *S. aureus* ATCC 25923. На цефтриаксон су резистентни *B. cereus* ATCC 11778 и *P. aeruginosa* ATCC 35554, док су се остали сојеви показали осетљивим на овај антибиотик. Мултирезистенција која представља осетљивост на већи број антибиотика се уочава код *E. coli* ATCC 11229, *B. cereus* ATCC 11778 и *P. aeruginosa* ATCC 35554.

H₂O екстракти:

У Прилогу 7.4.1.; Табела 7.36. су приказане вредности зона инхибиције (mm) H₂O екстраката гљива за методу бунара и диск-дифузиону методу. Највећу активност у обе методе је испољио екстракт гљиве *G. pfeifferi* и то на *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 25923, и *E. coli* ATCC 11775. Обе методе су показале да испитивани H₂O екстракти испољавају активност углавном на Gram +, али и на Gram – бактерије у нешто мањој мери. Поред *G. pfeifferi*, значајну активност је показао екстракт *G. lucidum* са зоном инхибиције од 7-17 mm. У поређењу са MeOH екстрактима који не показују антибактеријски ефекат према већини Gram – бактерија (*S. enteritidis* ATCC 13076, *Proteus mirabilis* ATCC 35659 и *E. coli* ^h), може се рећи да је активност H₂O екстраката била нешто слабија код екстраката *G. lucidum* (25 mg/mL) на сојеве: *P. aeruginosa* ^h и *E. coli* ATCC 25922. Различите активности су добијене на различитим сојевима *S. aureus*, показујући да су екстракти гљива били таргет-специфични на интраспецијском нивоу, што значи да су специфични за изолат бактерије (Karaman и др., 2012).

EtOH екстракти:

У Прилогу 7.4.1.; Табела 7.37. приказане су зоне инхибиције (mm) активности EtOH екстраката гљива, добијених методом бунара и диск-дифузионом методом. За разлику од H₂O, EtOH су показали значајно мању активност, где је активност показао екстракт *G. resinaceum* на оба соја *S. aureus* са зонама инхибиције од 10 до 19 mm. И за EtOH као и за H₂O екстракте је доказана боља ефикасност према Gram+ бактеријским сојевима. Код ових екстраката MIC је

4. Резултати и дискусија

одређен на екстрактима који су испољили јачу активност код методе бунара и диск-дифузионе методе, и добијен је следећи редослед активности: *G. resinaceum* > *G. applanatum* (100 mg/mL) > *G. pfeifferi* (200mg/mL) > *G. lucidum*. Највећу MBC активност је испољио екстракт гљиве *G. resinaceum* на соју *B. cereus* ATCC 11778, што је потврдило претходно урађено да је највећу антибактеријску активност показао EtOH екстракт *G. resinaceum* на Gram + бактеријама.

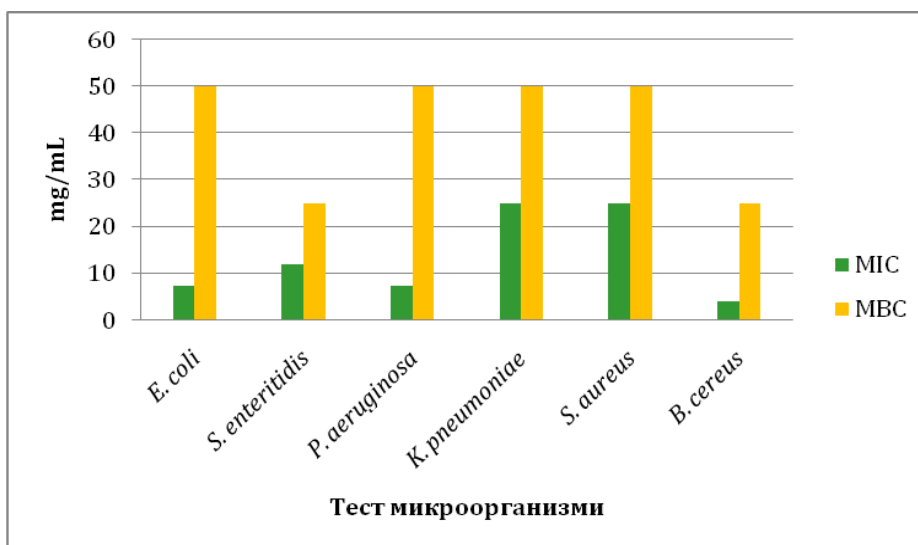
За EtOH екстракте је на основу литературних навода потврђена антимикуробна активност, где је изоловано више једињења активних у сузбијању раста метицилин резистентног (MP) *S. aureus*-а у опсегу MIC-а од 1,95 до 250 µg/mL (Choi и др., 2010).

CHCl₃ екстракти:

У Прилогу 7.4.1.; Табела 7.38. приказане су вредности добијене за MIC и MBC анализираних екстраката гљива, које указују на то да су сви тестирани CHCl₃ екстракти показали антибактеријску активност. Уочена је велика варијабилност међу анализираним сојевима како за MIC тако и за MBC вредности које су варирале у следећем опсегу (MIC=3,125 – 50 mg/mL; MBC=25 – 50 mg/mL), што указује на њихову изолат специфичност у односу на анализирани микроорганизме. Добијена нижа MIC и MBC вредност указује на већу ефикасност испитиваног екстракта односно већу антибактеријску активност. За референтно једињење употребљен је *стрептомицин* чије вредности су биле чак 1000 пута веће у односу на испитиване екстракте, као и MIC и MBC вредности хлороформског екстракта гљиве *Meripilus giganteus* (*Хистограм 4.15.*), чија је умерена до висока антибактеријска активност позната из ранијих литературних навода (Karaman и др., 2009).

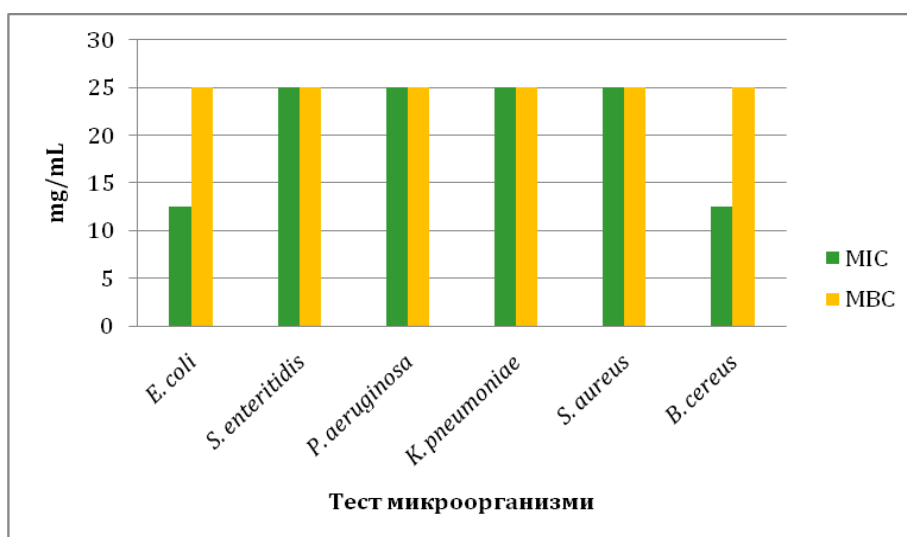
4. Резултати и дискусија

Хистограм 4.15. MIC и MBC вредности испитиваног екстракта референтне гљиве *M. giganteus*



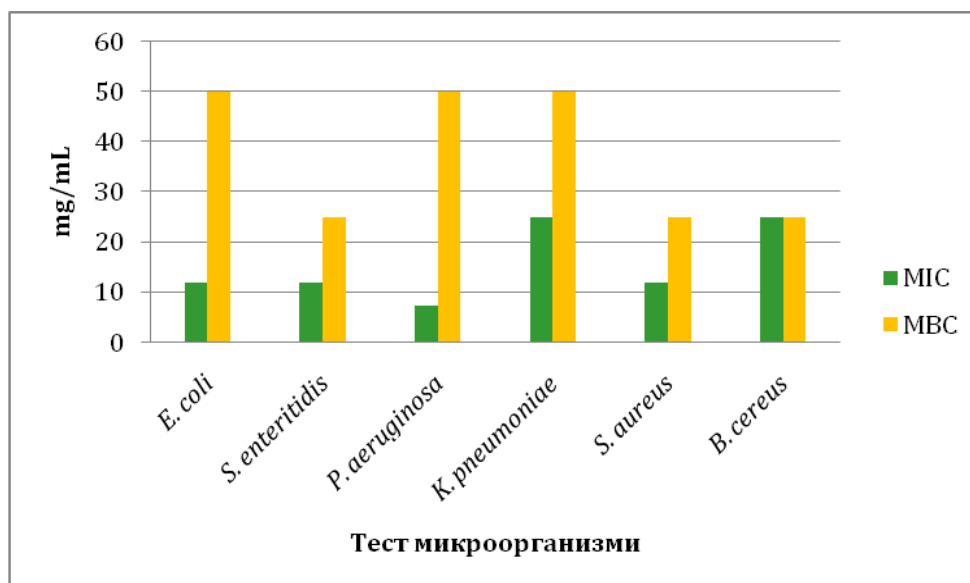
Уколико се пореде MIC вредности за испитиване екстракте *G. applanatum* и *G. resinaceum* показано је снажно антибактеријско дејство при истим концентрацијама према две Gram – бактеријске културе (*E. coli* ATCC11229 (MIC=12,5 mg/mL) и *K. pneumoniae* HP (MIC=25 mg/mL) што је у сагласности са раније добијеним литераним подацима (Sadaf и др., 2010) (**Хистограм 4.16.** и **Хистограм 4.17.**).

Хистограм 4.16. MIC и MBC вредности $CHCl_3$ екстракта гљиве *G. applanatum*



Хистограм 4.17. MIC и MBC вредности $CHCl_3$ екстракта гљиве *G. resinaceum*

4. Резултати и дискусија



Добијени резултати за MIC вредности екстраката гљиве *G. resinaceum* (**Прилог 7.4.1.; Табела 7.38.**) показују ниже MIC вредности према сојевима: *P. aeruginosa* ATCC3554 (MIC= 6,25 mg/mL), *S. enteritidis* ATCC13076 (MIC=12,5 mg/mL) и *S. aureus* ATCC6538 (MIC=12,5 mg/mL), у односу на добијене MIC вредности екстраката *G. applanatum* према истим бактеријским сојевима, што потврђује бољу антибактеријску активност екстраката *G. resinaceum*.

MBC вредности оба екстракта гљива према *S. enteritidis* ATCC13076 и *S. aureus* ATCC6538 забележене су при истој концентрацији од 25 mg/mL, док су се вредности према соју *P. aeruginosa* ATCC3554 разликују (**Прилог 7.4.1.; Табела 7.38.**). За разлику од претходно објављених литературних података (Monthana и др., 2003; Ofodile и др., 2005; Smania и др., 1999), код CHCl₃ екстраката није показано јаче инхибиторно дејство на Gram + бактерије.

Резултати добијени за испитиване хлороформске екстракте гљива рода *Ganoderma* (*G. applanatum* и *G. resinaceum*) показују јаче антибактеријске ефекте при нижим концентрацијама (25 mg/mL) у односу на MeOH (50 mg/mL) (Karaman и др., 2009; Karaman и др., 2010) али и H₂O и EtOH (Jonathan и Awotona, 2010).

На основу истраживања *G. lucidum*, утврђено је да ацетонски екстракти при концентрацији од 40 µg/mL испољавају најјачу антибактеријску активност док

4. Резултати и дискусија

су H₂O и EtOH екстракти слабији, па је можда из тог разлога лошија активност забележена код анализираних екстраката због слабијих екстракционих средстава који су употребљени у поступку екстракције (Quereshi и др., 2010).

Zjawiony (2004) је доказао селективну активност екстраката *G. lucidum*, *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* на *B. subtilis*. За два нова хидрохинона изолована из *G. pfeifferi* (ганомицин А и ганомицин В) потврђена је антибактеријска активност помоћу TLC хроматографије и резултати су у истом опсегу MIC-а (2,5-25 µg/mL) (Mothana и др., 2000; Offodile и др., 2005). За изолована једињења *G. applanatum*: 5α-ергост-7-ен-3β-ол, 5α-ергост-7,22-диен-3β-ол, 5,8-епидиокси-5α,8α-ергост-6,22-диен-3β-ол и нови ланостаноид су првенствено показали активност према Gram + бактеријама (Smania и др., 1999).

Углавном су неполарна једињења изразити антимикуробни агенси, па се очекују бољи резултати код неполарнијих екстракционих средстава, у нашем случају код хлороформских где је забележена знатна антибактеријска активност која је потврђена кроз слична истраживања CHCl₃ екстраката *G. lucidum* (Cowan, 1999; Karaman и др., 2009; Кеурог и др., 2008).

Од неполарних једињења углавном се терпеноидним једињењима приписује антимикуробна активност (Smania и др., 1999), изузетак су изоловани ганомицини из *G. pfeifferi* који су фенолне природе и Mothana и сар. (2000) су по први пут доказали антимикуробну активност за овај тип једињења. Alves и сар. (2013) су радили на доказивању антимикуробне активности на фенолним киселинама, и на основу резултата сматра се да би се екстракти гљива обогачени фенолним киселинама могли употребљавати као замена комерцијалним антибиотицима на које је доказано резистентно дејство појединих микроорганизама.

4. Резултати и дискусија

4.4.2. Антифунгална активност

Метода „бунара“

Испитивани су EtOH екстракти *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* на три гљивице: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* - кваснице и *Aspergillus niger* – филаментозна гљива, мерењем зона инхибиције (mm), а резултат је изражен као MFC (минимална фунгицидна концентрација). У већини случајева је уочена концентрацијска зависност првенствено за врсту *G. resinaceum* (порастом концентрације екстракта расте и ниво антифунгалне активности). MFC код ове врсте је постигнута у следећем низу: *S. cerevisiae* (100 mg/mL) > *A. niger* (50 mg/mL) > *C. albicans* (50 mg/mL). За врсту *G. pfeifferi* није уочена концентрацијска зависност за разлику од *G. resinaceum*, па је MFC за *S. cerevisiae* постигнут при концентрацији од 50 mg/mL, док је код *A. niger* и *C. albicans* запажено да је при нижим концентрацијама (10 mg/mL) испољена јача инхибиција (9 mm) и постигнута MFC.

Може да се закључи да екстракти обе испитиване врсте имају активне супстанце за сузбијање фунгалног раста, али с обзиром на варијације у активностима и потенцијалну активност нижих концентрација код *G. pfeifferi*, неопходно је подробније испитивање екстраката при нижим концентрацијама, али и пречишћавање појединачних активних компоненти са потенцијалним антифунгалним деловањем да би се дошло до конкретнијих закључака.

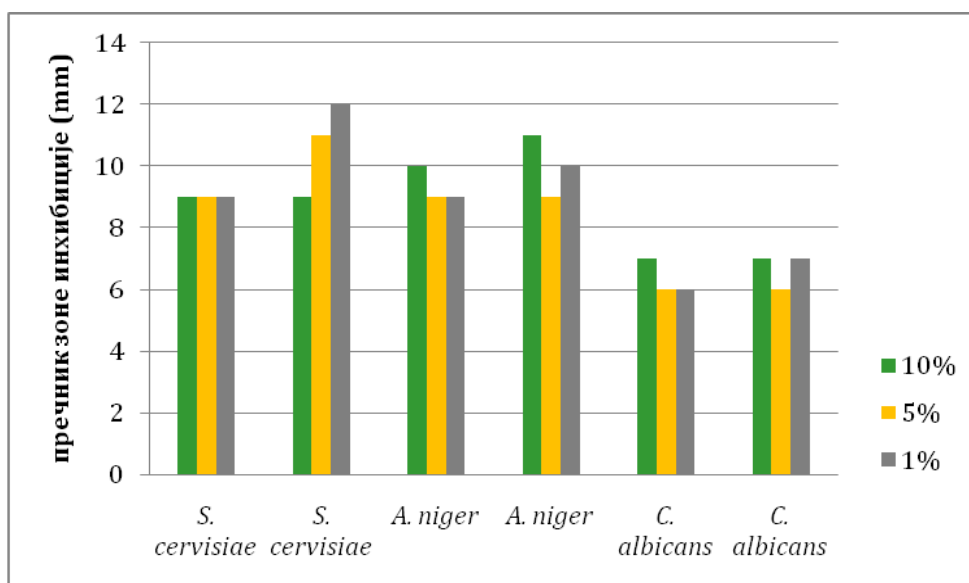
Метода дискова:

EtOH екстракти истих концентрација као и код методе бунара аплицирани су на стерилне дискове, и потом је мерена зона инхибиције (mm).

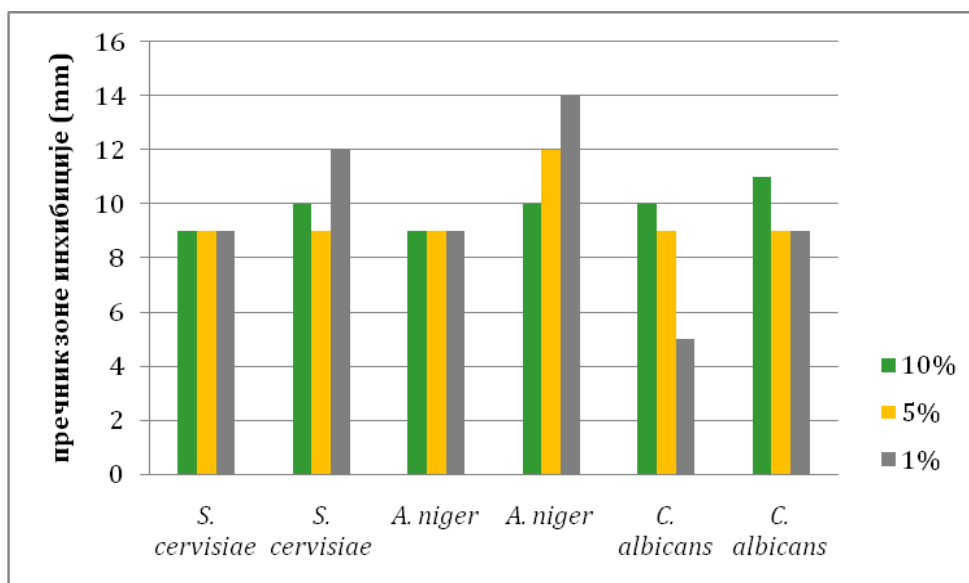
MFC код *G. resinaceum* је постигнута у следећем низу: *S. cerevisiae* (100 mg/mL) > *A. niger* (50 mg/mL) > *C. albicans* (50 mg/mL). EtOH екстракт врсте *G. pfeifferi* показао је активност на *C. albicans* (50 mg/mL) > *S. cerevisiae* (10 mg/mL) > *A. niger* (10 mg/mL) (**Хистограм 4.19**).

4. Резултати и дискусија

Хистограм 4.18. Антифунгална активност EtOH екстракта *G. pfeifferi* (метода дискова)



Хистограм 4.19. Антифунгална активност EtOH екстракта *G. resinaceum* (метода дискова)



Pour plate метода:

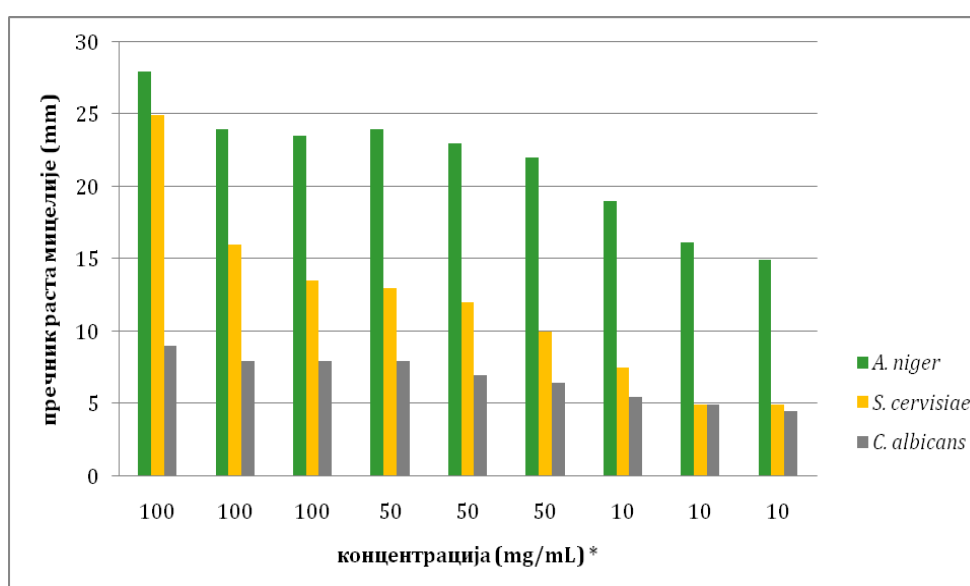
На основу претходне две методе није утврђена тачна концентрација на којој је екстракт ефикасан, па је урађена прецизнија метода (pour plate метода или метода преливања) мерењем пречника раста мицелије за сваку од горе

4. Резултати и дискусија

поменутих концентracија у запреминама од 50 μl , 100 μl и 200 μl (**Прилог 7.4.2.; Табела 7.39. и 7.40.**).

На **Хистограму 4.20.** приказана је антифунгална активност екстраката *G. pfeifferi*, при чему је зона раста мицелије варирала различито за различите сојеве. Тако је за најотпорнију филаментозну *A. niger* пречник раста био у опсегу 17-28 mm, затим за *S. cerevisiae* 6-20 mm, а за врсту *C. albicans* 4-8 mm.

Хистограм 4.20. Антифунгална активност EtOH екстраката *G. pfeifferi* (Pour plate метода)



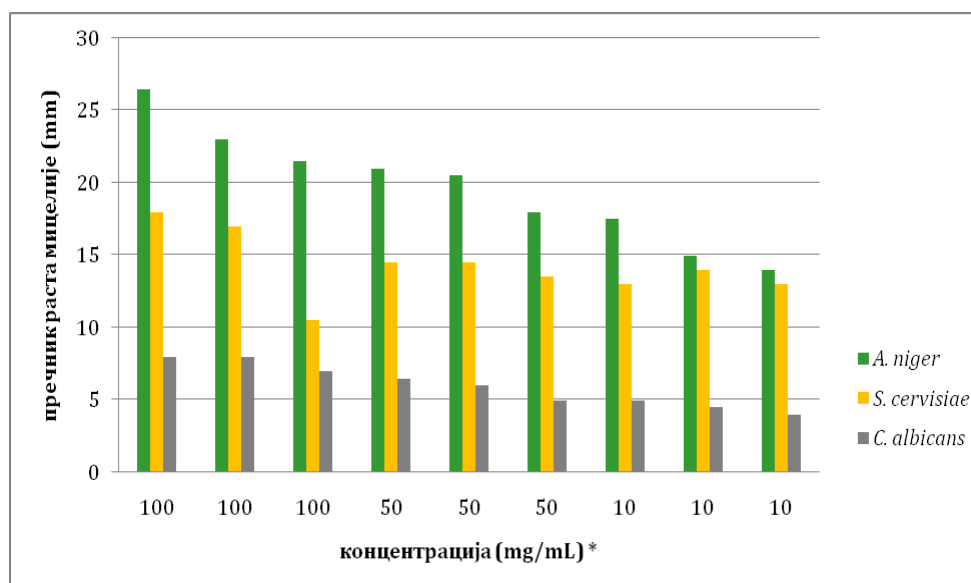
* концентracије екстраката су примењене у три запремине: 50, 100 и 200 μl

На основу приказаних резултата, може се закључити да је највећа активност изражена на *C. albicans*, затим *S. cerevisiae* и на крају на *A. niger* (**Прилог 7.4.2.; Табела 7.39.**).

Слично претходним резултатима, на **Хистограму 4.21.** приказана је антифунгална активност *G. resinascens* која је поређењем добијених пречника раста на врсту *A. niger* имала јачи утицај него претходна врста. Пречник раста мицелије варирао је у следећем низу: *A. niger* (13-24 mm) > *S. cerevisiae* (11-16 mm) > *C. albicans* (3-8 mm).

Најјача антифунгална активност добијена је опет у следећем низу: *C. albicans* > *S. cerevisiae* > *A. niger* у односу на контроле које су у опсегу вредности од 6 до 8 mm (**Прилог 7.4.2.; Табела 7.40.**).

4. Резултати и дискусија

Хистограм 4.21. Антифунгална активност EtOH екстраката *G. resinaceum* (Pour plate метода)

* концентрације екстраката су примењене у три запремине: 50, 100 и 200 μ l

На основу добијених резултата долази се до закључка да се код испитиваних екстраката може констатовати одређена антифунгална активност, која се манифестује тиме да се порастом концентрације екстракта смањује пречник раста мицелије.

Бројни литературни подаци указују на значај протеина али и полисахарида (β -гlukan) (Ai и др., 2012; Guaní-Guerra и др., 2010; Ngai и Ng, 2004; Smania и др., 2000; Wang и Ng, 2004; Xu и др., 2011) за испољавање антифунгалне активности активацијом и појачавањем имуног одговора, па се с тога њихова употреба препоручује у комбинацији са другим антибиотцима и имуностимулаторима у превенцији и лечењу инфективних болести (Chen и Seviour, 2007). С обзиром на горе наведена једињења, и на недостатак података о антифунгалној активности *Ganoderma* гљива, приступило се интензивнијим истраживањима на том пољу и Wang и Ng (2006) су изоловали ганодермин, протеин мале молекулске масе (15 kDa) из *G. lucidum*, који делује инхибицијом мицелијалног раста фитопатогених гљива: *B. cinerea*, *F. oxysporum* и *P. piricola*. Неки антифунгални протеини садрже хемагlutинирајуће протеине (лектине), деоксирибонуклеаза, рибонуклеаза и протеаза инхибиторне активности, док исте нису доказане за ганодермин (Wang и Ng, 2006). Биоактивни протеини:

4. Резултати и дискусија

лектин и рибонуклеаза су изоловани из *G. lucidum* (Tanaka и др., 1989; Wang и др., 2004).

Знатно слабија али не и занемарљива активност је доказана и за апланоксидичну киселину изоловану из *G. annulare* на *Trichophyton mentagrophytes* (Smania и др., 2003).

4.4.3. Антивирусна активност

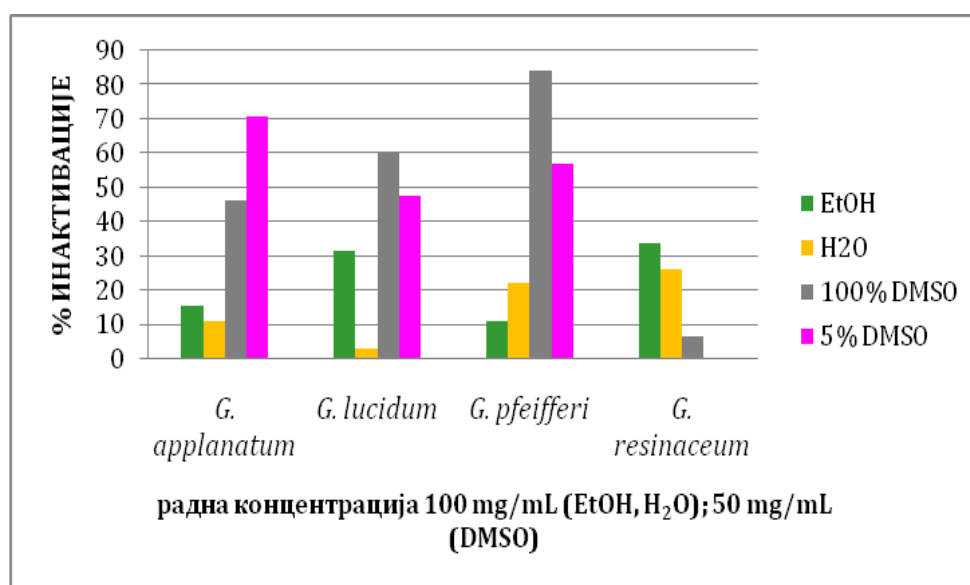
У циљу испитивања антивирусне активности екстракта гљива најчешће су у употреби анимални и биљни вируси, али и вируси бактерија који се користе као модел организми за друге вирусе. У овој тези је као модел вирус кориштен vB_VbrS_56.1 бактериофаг који припада фамилији *Siphoviridae*.

Анализирана је антивирусна активност 12 екстраката (EtOH, H₂O и EtOH екстракти растворени у DMSO-у (5 % и 100 %)) у опсегу концентрација од 0,2 до 300 mg/mL, у зависности од испитиваног екстракта (**Прилог 7.4.3.; Табела 7.41**). Утврђен је проценат вијабилних фага за сваку концентрацију, и кроз њега је представљена активност екстракта. Експеримент је рађен у три понављања. Резултати испитивања антивирусног ефекта EtOH, H₂O и EtOH екстраката (растворених у DMSO-у) врста *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* показују антивирусну активност при инкубацији од 24h на 37 °C у испитиваном опсегу концентрација. На основу добијених резултата може се рећи да су најпотентнији антивирусни агенси EtOH екстракти растворени у DMSO-у како 5 % тако и 100 %. Од поменутих екстраката на основу **Хистограма 4.22.** може да се закључи да је најбољу антивирусну активност показао екстракт врсте *G. pfeifferi* који при концентрацији од 50 mg/mL инактивира чак 84,01 % вириона. Такође се на основу истог хистограма може приметити колико је нижи потенцијал за инхибицију истог EtOH екстракта (10,95 %) уколико није растворен у изразито неполарном растварачу као што је DMSO, при чему вероватно активност испољавају неполарнија једињења, за које постоје литературни подаци о антивирусној активности (Mothana и др., 2003; Niedermayer и др., 2005).

4. Резултати и дискусија

Процент инхибиције за врсте *G. applanatum* и *G. lucidum* је такође израженији за DMSO екстракте (46,21, односно 70,73 %; 60,37, односно 47,62 %) али слабији у односу на врсту *G. pfeifferi*. За разлику од *G. applanatum* и *G. lucidum* из којих је изоловано више како терпеноидних једињења тако и полисахарида, *G. pfeifferi* је далеко мање фитохемијски испитана (Niedermayer и др., 2005). Испољена антивирална активност MeOH екстраката *G. pfeifferi* на HSV вирусу (херпес симплекс вирус I) доказана је за изолована једињења терпенидног и стероидног типа: апланоксидичну киселину, ганодерон, ганодерол, ергоста-7,22-диен-3 β -ол и луциалдехид (Niedermayer и др., 2005). Ипак, још увек није разјашњен тачан механизам антивиралне активности.

Хистограм 4.22. Антивирална активност испитиваних екстраката гљива изражена у % инактивације вируса



Утврђено је на основу добијених резултата да и H₂O и EtOH екстракт врсте *G. resinaceum* испољавају одређену антивиралну активност установљену бројањем бактеријских плака након 24h. С обзиром да је код ове врсте изражена антивирална активност и H₂O екстраката, долази се до закључка да испитивану активност испољавају и поларнија једињења, првенствено полисахариди (Razumov и др., 2010).

Сумарно, антивирални потенцијали гљива је доказан не само за екстракте већ и за изолована једињења, а испољава се инхибицијом виралних

4. Резултати и дискусија

ензима, синтезе виралне нуклеинске киселине или адсорпцијом, односно инхибицијом пенетрације вируса у ћелије сисара (Lindequist и др., 2005).

Активна једињења са потенцијалном антивиралном активношћу, одређивана су у мицелији, медијуму и спорама (Paterson, 2006). Терпеноидна једињења којима се приписују антивирална својства првенствено су била окарактерисана као активне компоненте *G. lucidum*, међутим њихово присуство касније је доказано и у другим врстама *G. colossum*, *G. applanatum*, *G. tsugae*, *G. concinna*, *G. tropicum* и *G. pfeifferi* (Roberts, 2004). Споре се сматрају значајним изворима антивиралних агенаса првенствено ганодеричних киселина и алкохола. Поред терпеноидних једињења, полисахариди су друга група једињења са антивиралним својствима, који су доминантнији код базних, односно H₂O екстраката и сматрају се главним конституентима ћелијског зида (β -D-гљукани) (Amaral и др., 2008). Антивирална активност на HIV-1 и HIV-2 протеазу је доказана како за тритерпене, тако и за полисахарид-протеинске комплексе (Ео и др., 200; Nie и др., 2013; Paterson, 2006). Механизам антивиралне активности протеин-полисахарид комплекса би могао да буде базиран на инхибирању везивања вируса за ћелије домаћина, затим фузије вируса са ћелијама или оба наведена механизма (Nosoya и др., 1991).

На основу добијених резултата може се закључити да су испитивани екстракти врста рода *Ganoderma* показали ефекат инактивације бактериофага. Даља истраживања би требало усмерити на механизме антивиралне активности, као и ефекат екстракта и/или компоненти на анималне вирусе.

4.5. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИИНФЛАМАТОРНЕ АКТИВНОСТИ ЕКСТРАКАТА ГЉИВА

У циљу одређивања антиинфламаторног потенцијала EtOH и CHCl₃ екстраката четири врсте гљива рода *Ganoderma* (*G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*) примењена је модификована *ex vivo* метода (Beara, 2010) заснована на праћењу потенцијала инхибиције ензима циклооксигеназног (COX-1) и липооксигеназног (12-LOX) пута метаболизма арахидонске киселине. Као ћелијски систем, односно извор наведених ензима

4. Резултати и дискусија

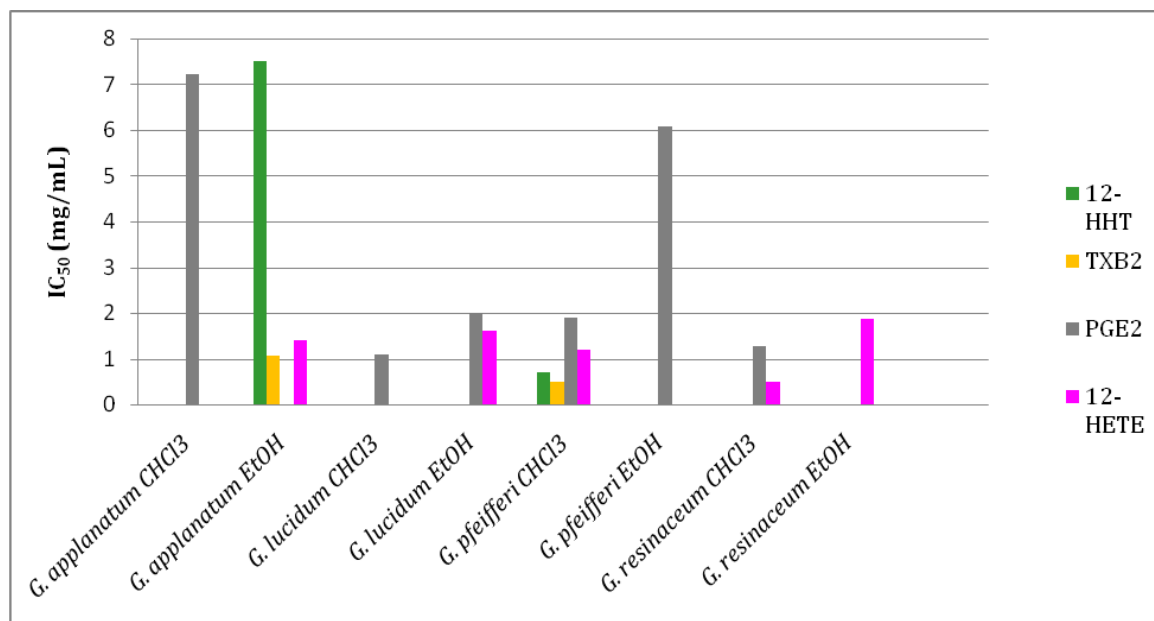
кориштен је препарат хуманих тромбоцита, а инфламација је изазивана сукцесивним додавањем двовалентне калцијумове јонофоре A23184 (калцимицин) и CaCl_2 , док је продукција метаболита праћена применом LC-MS/MS технике са додатком интерног стандарда (PGB_2).

Антиинфламаторна активност испитиваних екстраката одређена је са циљем праћења инхибиције продукције три производа COX-1 пута (12-ННТ, TXB_2 и PGE_2) и једног производа 12-LOX пута (12-НЕТЕ) метаболизма арахидонске киселине. Ниво инхибиције наведених производа одређен је на основу односа површине пикова метаболита и интерног стандарда, а резултати су приказани у **Прилогу 7.5.; Табеле 7.42. – 7.45.** Већином је код анализираних екстраката показан концентрацијски зависан степен инхибиције продукције четири праћена метаболита чији графикони су приказани у **Прилогу 7.5.; Графикони 7.47. – 7.78.** Код неких од анализираних екстраката је премашили IC_{50} у испитиваном концентрацијском опсегу, и с обзиром да су њихове вредности мање од најмање радне концентрације њихова активност се не може поредити са стандардним једињењима аспирином (COX-1 инхибитор) и кверцетином (12-LOX инхибитор) (Lesjak и др., 2013).

IC_{50} вредности инхибиције продукције 12-ННТ, 12-НЕТЕ, PGE_2 и TXB_2 метаболита постигнуте дејством анализираних екстраката су приказане на **Хистограму 4.23.**

4. Резултати и дискусија

Хистограм 4.23. Потенцијал инхибиције продукције метаболита COX-1 пута (12-ННТ, TXB₂ и PGE₂) и 12-LOX пута (12-НЕТЕ) CHCl₃ и EtOH екстрактима рода *Ganoderma*



EtOH екстракти испитиваних врста показали су добар потенцијал инхибиције продукције 12-ННТ метаболита, са постигнутом IC₅₀ вредности само код екстракта *G. applanatum* (7,51±0,05 mg/mL), где је наведени екстракт показао слабију активност од стандардних инхибитора аспирина и кверцетина (4,98±0,43 µg/mL, односно 22,45±2,12 µg/mL) (Lesjak и др., 2011). Од испитивана 4, за 3 екстраката није одређена IC₅₀ вредност код испитиваних концентрација (>IC₅₀). Испитивани екстракти су показали концентрацијску зависност.

За CHCl₃ екстракте, код 1 од 4 анализирана екстракта (*G. pfeifferi*) достигнута је IC₅₀ која је девет пута нижа од IC₅₀ горе поменутог EtOH екстраката (0,70±0,32 mg/mL), што значи да овај екстракт показује далеко јачи антиинфламаторни потенцијал.

При поређењу резултата активности испитиваних CHCl₃ екстраката са испитиваним биљним врстама рода *Juniperus*, али и гљивама рода *Tuber* (тартуфи), долази се до закључка да испитивани екстракти гљива рода *Ganoderma* показују јачи инхибиторни потенцијал при продукцији медијатора

4. Резултати и дискусија

инфламације 12-ННТ, с обзиром на добијене резултате (Веага и др., 2014; Lesjak, 2011; Lesjak и др., 2013).

На **Хистограму 4.23**. приказане су и IC_{50} вредности инхибиције продукције TXB_2 метаболита за испитиване екстракте и стандардна једињења

При инхибицији продукције TXB_2 метаболита, IC_{50} вредност је достигнута за EtOH екстракт врсте *G. applanatum* ($1,07 \pm 0,29$ mg/mL). Добијене вредности указују на јак антиинфламаторни потенцијал екстракта за инхибицију TXB_2 метаболита. За EtOH екстракте свих врста изузев *G. lucidum* добијена је концентрациона зависност инхибицијом TXB_2 метаболита, где су премашене IC_{50} вредности при испитиваним концентрацијама.

Екстракти $CHCl_3$ су показали донекле бољи потенцијал инхибиције продукције TXB_2 метаболита у односу на EtOH екстракте. *G. pfeifferi* $CHCl_3$ екстракт је на основу постигнуте IC_{50} вредности дупло јачи од EtOH *G. applanatum* ($0,49 \pm 0,10$ mg/mL). Добијени резултати указују на јачи антиинфламаторни потенцијал, како $CHCl_3$ тако и EtOH анализираних екстракта, у односу на литературне податке добијене за јестиву врсту гљива рода *Tuber* (Веага и др., 2014)

Добијени резултати указују на слабију активност EtOH у односу на $CHCl_3$ екстракте за инхибицију продукције TXB_2 метаболита. за које се сматра да су богати терпеноидним једињењима, од којих је за неке доказан антиинфламаторни потенцијал (ганодеричне киселине А, В, G и H) (Joseph и др., 2009; Kim и Kim, 1999; Paterson, 2006).

Као и код претходно приказаних резултата за производе циклооксигеназног пута метаболизма арахидонске киселине (12-ННТ и TXB_2) и код резултата за PGE_2 , EtOH екстракти су испољили слабију активност од $CHCl_3$ при инхибицији продукције овог метаболита. IC_{50} вредности су достигнуте за 2 од 4 анализирана EtOH екстракта ($2,01 \pm 0,02$ mg/mL за *G. lucidum*, односно $6,07 \pm 1,45$ mg/mL за *G. pfeifferi*), али је и регистровано про-инфламаторно дејство код преостала 2 EtOH екстракта с обзиром да са порастом концентрације екстракта, расте и концентрација PGE_2 у тромбоцитима.

4. Резултати и дискусија

IC₅₀ вредности за CHCl₃ екстракте су достигнуте за сва 4 екстракта са опсегом вредности од 1,10 до 7,23 mg/mL с тим да се IC₅₀ вредности *G. lucidum*, *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* екстраката незнатно разликују, док је CHCl₃ екстракт *G. applanatum* испољио најслабију активност. За све испитиване екстракте је постигнута концентрацијска зависност за инхибицију продукције PGE₂ метаболита. Поредећи IC₅₀ вредности анализираних екстраката са литературним подацима добијеним како за биљне тако и за неке врсте гљива, уочава се изузетан потенцијал за инхибицију продукције PGE₂ метаболита (Beara и др., 2014; Lesjak и др., 2013).

Добијене IC₅₀ вредности потенцијала инхибиције продукције 12-НЕТЕ метаболита (показатељ активности 12-LOX) испитиваних EtOH екстраката су се кретале у опсегу од 1,41 (*G. applanatum*) до 2,39 mg/mL (*G. resinaceum*). Из добијених резултата се уочава да су EtOH екстракти гљива умерени инхибитори 12-LOX ензима.

CHCl₃ екстракти су показали бољи потенцијал за инхибицију 12-LOX ензима у односу на поларније, EtOH екстракте. IC₅₀ вредности су постигнуте за 2 од 4 анализирана CHCl₃ екстракта (0,50±0,01 mg/mL за *G. resinaceum* и 1,77±1,00 mg/mL за *G. pfeifferi*). Анализирани екстракти показују слабију активност у односу на кверцетин (Lesjak и др., 2013).

Одређивањем потенцијала инхибиције продукције три метаболита (12-ННТ, TXB₂ и PGE₂) 1-COX пута арахидонске киселине, добија се комплетнија слика механизма деловања анализираних EtOH и CHCl₃ екстраката врста рода *Ganoderma* на наведени метаболички пут.

Имајући у виду да приликом синтезе 12-ННТ, PGE₂ и TXB₂ долази до настајања слободно-радикалских врста (Sumiya и др., 1993), и с обзиром да анализирани екстракти испољавају добар антиоксидантни потенцијал, постоји велика могућност да до инхибиције 1-COX пута долази неутрализацијом ROS-а (Kiritoshi и др., 2003; Leonard и др., 2003; Sumiya и др., 1993). С обзиром да су IC₅₀ вредности за инхибицију продукције TXB₂ и 12-ННТ сличне за CHCl₃ екстракт најпотентније врсте *G. pfeifferi* (0,49, односно 0,70 mg/mL) може се претпоставити да активне компоненте из EtOH и CHCl₃ екстраката делују на прву фазу активности тромбоксан синтазе инхибирајући у подједнакој мери

4. Резултати и дискусија

синтезу оба производа подједнако. Уколико неки од два наведена производа настаје у већој количини ($>IC_{50}$) што је случај код 6 анализираних екстраката, претпоставља се да испитивани екстракт делује у некој другој фази (Elsayed и др., 2014; Таофиќ и др., 2016).

Антиинфламаторни потенцијал екстраката гљива рода *Ganoderma* је одређиван другим *in vivo* тестовима на експерименталним животињама, на основу којих се не долази до увида о механизму деловања испитиваних супстрата метаболизма арахидонске киселине (Ede и др., 2012; Hasnat и др., 2015; Jones и др., 2009; Joseph и др., 2011; Ко и др., 2008; Liu и др., 2015; Yoon и др., 2013). Већина литературних података о антиинфламаторном потенцијалу екстраката гљива указује на потенцијал инхибиције продукцијом неких других медијатора инфламације (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 и NK-кВ), у првом реду NK-кВ, који је транскрипциони фактор који врши регулацију експресије гена асоциране са процесом инфламације али и регулише траскрипцију COX-2 (Hasnat и др., 2015; Liu и др., 2015).

Полисахариди *Ganoderma* врста су важни при редукцији активације NK-кВ преко COX пута, испољавајући антиинфламаторни потенцијал (Joseph и др., 2011; Liu и др., 2015). Често се инфламација доводи у везу са оксидативним стресом организма (Gomes Castro и др., 2013; Souza и др., 2012; Yoon и др., 2013), стога се и фенолним једињењима (Grifolinon А, В, пирогалол, р-хидроксибензојева, р-кумарна киселина) (Elsayed и др., 2014; Heleno и др., 2014; Таофиќ и др., 2015) као снажним антиоксидантима може приписати антиинфламаторна активност (Garcia-Lafuente и др., 2009; Diaz и др., 2012; Sadhar и др., 2011).

За EtOH екстракте *G. lucidum* је доказан јак антиинфламаторни потенцијал екстракта захваљујући једињењима типа полисахарида, тритерпеноида, незасићених масних киселина и ергостерола (Yoon и др., 2013).

На основу литературних података, код EtOH и CHCl₃ екстраката анализираних врста (*G. applanatum*, *G. lucidum*) антиинфламаторна активност се приписује тритерпенима (ганодеричне киселине А, В, G и H) (Joseph и др., 2009; Koyama и др., 1997).

4. Резултати и дискусија

Код хроничних обољења (остеоартритис, реуматоидни артритис) је неопходна употреба антиинфламаторних терапеутика, али с обзиром да NSAID (нестероидни антиинфламаторни лекови) имају низ нежељених ефеката, ради се на изоловању и карактеризацији једињења природног порекла чија употреба би била безбеднија и без мање нежељених ефеката (Chen, 2001).

Добијени резултати указују на значајан антиинфламаторни потенцијал испитиваних врста рода *Ganoderma* с обзиром да је поред постигнутих у великој мери и премашена IC₅₀ вредност.

4.6. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЕ АКТИВНОСТИ ЕКСТРАКТА ГЉИВА

На основу бројних истраживања, потврђено је да многе врсте рода *Ganoderma* испољавају АПА ефекат према различитим линијама туморских ћелија, и то преко неколико механизма деловања: инхибицијом ћелијског раста заустављањем ћелијског циклуса, стимулацијом имуног одговора ћелије и индукцијом апоптозе (Hu и др., 2002; Као и др., 2013; Karaman и др., 2012; Liu и др., 2009; Sadava и др., 2009; Shimizu и др., 2009; Slivova и др., 2004). Сматра се да су за ове ефекте одговорна нека од следећих једињења: фенолна једињења, полисахариди и тритерпени чије присуство је доказано у већини испитиваних врста (Paterson, 2006; Sheikh и др., 2015; XiaoPing и др., 2009; Zhao и др., 2010).

У овом раду је испитана АПА активност EtOH и H₂O екстракта врста *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* на раст ћелијске линије MCF-7 (хуманог аденокарцинома дојке позитиван на естрогенске и прогестеронске рецепторе) МТТ тестом инкубацијом на 24h и 72h при различитим концентрацијама екстракта (од 0,33 до 1500 µg/mL, у зависности од врсте испитиваног екстракта). У сврху поређења резултата, упоредно са екстрактима испитана су и стандардна једињења DMSO и елагна киселина. Инхибиција пролиферације туморских ћелија квантитативно је изражена као IC₅₀ вредност (концентрација екстракта/стандарда при којој је ћелијски раст инхибиран за 50 %).

4. Резултати и дискусија

Добијени резултати приказани су у **Табели 4.5.**; **Хистограму 4.24.** и **Хистограму 4.25.** и **Прилогу 7.6.** (**Табеле 7.46.-7.47.**; **Графикони 7.79.-7.98.**).

Табела 4.5. Антипролиферативна активност испитиваних екстраката (IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)) и стандардних једињења и корелациони фактори (R^2) у вези са фенолним саставом

Врста гљиве/ екстракционо средство	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	24h	корелација (R^2)	72h	корелација (R^2)
<i>G. applanatum</i> /EtOH	748,79±22,32 ^c	0,98 [*]	177,46±11,66 ^d	0,99 [*]
<i>G. applanatum</i> /H ₂ O	968,30±31,40 ^d	0,67 [*]	678,89±7,61 ^f	0,69 [*]
<i>G. lucidum</i> /EtOH	92,95±4,20 ^a	0,90 [*]	33,79±3,51 ^a	0,91 [*]
<i>G. lucidum</i> /H ₂ O	2,44±0,10 ^a	0,99 [*]	243,57±6,17 ^e	0,75 [*]
<i>G. pfeifferi</i> /EtOH	154,05±12,92 ^a	0,96 [*]	76,69±12,10 ^b	0,91 [*]
<i>G. pfeifferi</i> /H ₂ O	653,35±10,19 ^c	0,72 [*]	49,25±1,72 ^a	0,92 [*]
<i>G. resinaceum</i> /EtOH	365,30±86,78 ^b	0,85 [*]	180,92±5,53 ^d	0,91 [*]
<i>G. resinaceum</i> /H ₂ O	4,88±0,50 ^a	0,97 [*]	114,03±7,38 ^c	0,96 [*]
Стандард				
DMSO	50,48±4,46 ^a		26,51±3,19 ^a	
Елагна киселина	33,94±3,69 ^a		41,83±3,26 ^a	

Резултати су изражени као средња вредност IC_{50} вредности ± SD.

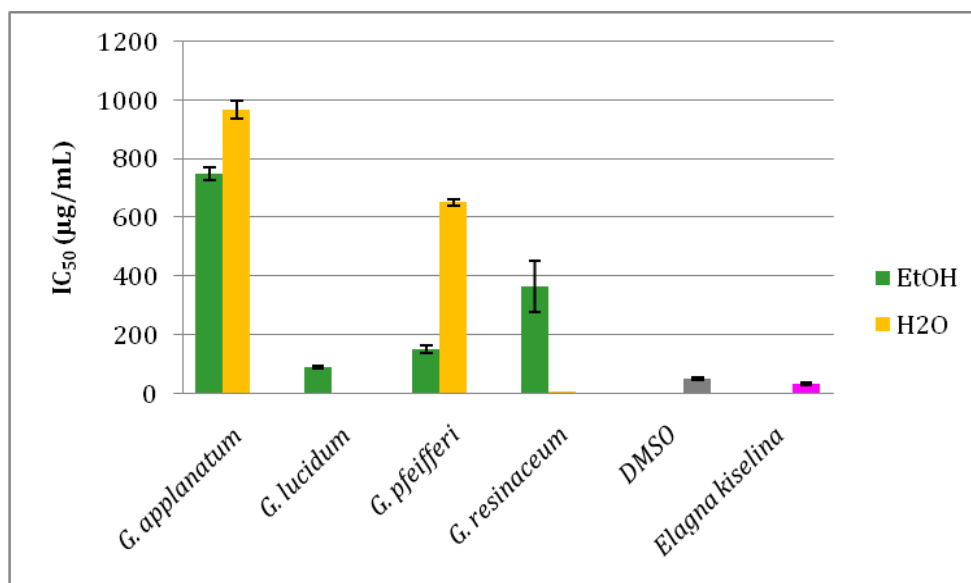
a, b, c, d, e, f статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт ($p < 0,01$)

* статистички значајни су они резултати који деле исти суперскрипт ($p < 0,05$)

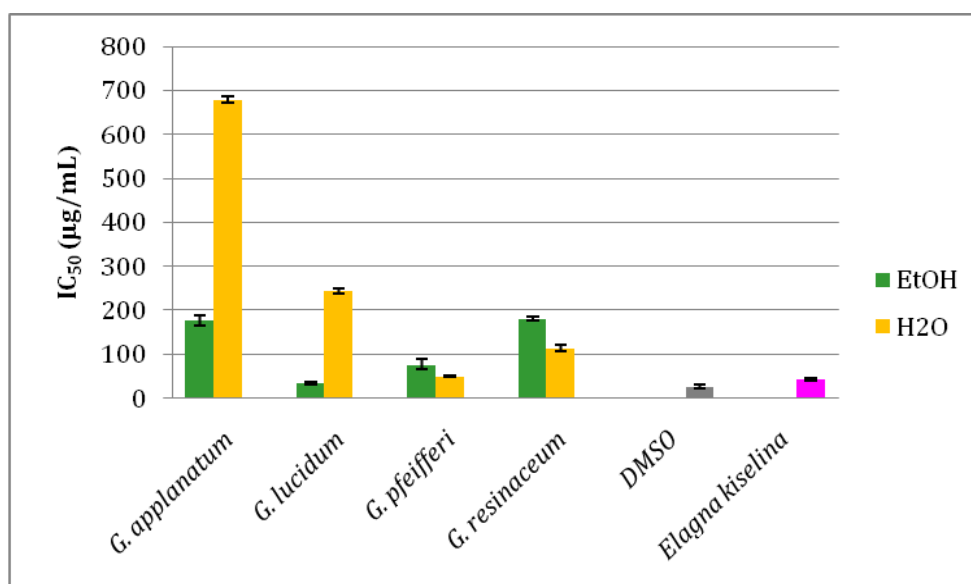
На основу резултата приказаних у **Табели 4.5.** већина испитиваних екстраката испољава АПА активност, али степен активности зависи од врсте екстракта, екстракционог средства али и концентрације екстракта.

4. Резултати и дискусија

Хистограм 4.24. Упоредни приказ АПА активности EtOH и H₂O екстраката врста рода *Ganoderma* на MCF-7 ћелијску линију након 24h



Хистограм 4.25. Упоредни приказ АПА активности EtOH и H₂O екстраката врста рода *Ganoderma* на MCF-7 ћелијску линију након 72h



На основу **Хистограма 4.24.** уочава се да су сви екстракти при субакутној инкубацији (након 24h) испољили АПА активност, при чему су најјачу активност испољили H₂O екстракти врста *G. lucidum* и *G. resinaceum* (2,44, односно 4,88 µg/mL). MCF-7 ћелије биле су најмање инхибиране деловањем EtOH и H₂O екстраката врсте *G. applanatum* (748,79, односно 968,30

4. Резултати и дискусија

µg/mL). С обзиром да је АПА ефекат потентнијих врста *G. lucidum* и *G. resinaceum* у рангу испољене активности за стандардна једињења (DMSO и елагна киселина), добијени резултати нису статистички значајни ($p < 0,01$).

На основу **Хистограма 4.25.** уочава се да су при хроничној инкубацији (72h) остварени ефекти свих EtOH екстраката по распореду истом који је добијен за 24h иако је ипак уочен њихов доста јачи АПА потенцијал где се издваја врста *G. lucidum*, EtOH екстракт (33,79 µg/mL). Такође је дошао до изражаја АПА ефекат свих H₂O екстраката при чему је најзначајнији ефекат уочен за *G. lucidum* и *G. pfeifferi*. За разлику од субакутне инкубације, овде су добијени статистички значајнији резултати ($p < 0,01$, Tukey тест, ANOVA) (**Табела 4.5.**). *G. pfeifferi* је била најактивнија ако се пореде активности оба екстракта међу врстама.

Најбољи АПА ефекат између свих испитиваних екстраката испољио је H₂O екстракт врсте *G. lucidum* са најнижом IC₅₀ вредности од 2,44 µg/mL након третмана од 24h, док је најбољи ефекат након 72h испољио такође екстракт врсте *G. lucidum*, али EtOH (33,79 µg/mL). Најслабији АПА ефекат је показао H₂O екстракт врсте *G. applanatum* како при инкубацији од 24h тако и 72h (968,30, односно 678,89 µg/mL). Поређењем IC₅₀ вредности EtOH и H₂O екстраката може се уочити да су екстракти показали подједнаку статистички значајну активност како након субакутне тако и хроничне инкубације применом МТТ теста ($p < 0,01$, Tukey тест, ANOVA), док су најпотентнији екстракти испољили АПА активност у рангу са стандардним једињењима, што није било статистички значајно (**Табела 4.5.**).

Пошто је са друге стране, статистички значајна, позитивна корелација ($R^2=0,67-0,99$), утврђена за испитиване екстракте са фенолним саставом (**Табела 4.5.**) и с тим у вези се претпоставља да су фенолне компоненте потенцијални АПА агенси, што је у сагласности са претходним резултатима (Patel и Goyal, 2012; Yáñez и др., 2004).

Бројна истраживања последњих деценија установила су широк спектар биоактивних метаболита изолованих из гљива *Ganoderma* врста (фенолне киселине, изофлавони, полисахариди, тритерпени, стероли, нуклеозиди, протеини, полисахарид-протеин комплекси) са потенцијалним АПА ефектима

4. Резултати и дискусија

(De Silva и др., 2012; Deeralakshmi и др., 2013; Hu и др., 2002; Kao и др., 2013; Kim и др., 1999; Liu и др., 2009; Sheikh и др., 2015; Shimizu и др., 2009; Slivova и др., 2004). С обзиром да је третман MCF-7 ћелијске линије анализиран са непречишћеним екстрактима, претпоставља се да долази до међусобних интеракција различитих биомолекула присутних у испитиваним екстрактима који синергистички могу испољити АПА активност, чиме је редукована токсичност појединачних компоненти док интеракција између различитих биомолекула повећава терапетску активност „crude“ (непречишћен) екстракта (Slivova и др., 2004). На основу бројних литературних података (Al-Fatimi и др., 2005; Deeralakshmi и др., 2013; Hu и др., 2002; Kao и др., 2013; Kim и др., 1999; Li и др., 2012; Liu и др., 2009; Shimizu и др., 2009; Slivova и др., 2004; Zhang и др., 2002), као два кључна једињења која испољавају АПА ефекат спомињу се полисахариди и тритерпени (нпр. ганодеричне киселине) редукацијом инвазије и метастазирања карцинома дојке инхибицијом адхезије, миграције, инвазије и раста ћелија (Kao и др., 2013; Liu и др., 2012).

С обзиром да су анализирани екстракти различите поларности, код H₂O су полисахариди, а код EtOH екстракта тритерпени водеће компоненте за испољавање АПА активности чији су потенцијални механизми деловања приказани на **Слици 2.20**. (Kao и др., 2013; Shimizu и др., 2009). На основу шематског приказа, уочава се пет потенцијалних механизма за тритерпене, а три за полисахаридна једињења.

Полисахариди индиректним, имуномодулирајућим механизмом (посредством цитокина ослобођених из активираних макрофага и Т лимфоцита) испољавају АПА активност (Hu и др., 2002; Liu и др., 2009; Wang и др., 1997). Slivova и сар. (2002) су радили на испитивању АПА активности H₂O екстракта на MCF-7 (естроген зависна, мање инвазивна) и MDA-MB-231 (естроген независна, инвазивнија) ћелијској линији карцинома дојке инхибицијом транскрипционих фактора AP-1 и NF-κB, резултујући супресијом експресије uPA (*urokinase plasminogen activator*) и uPA рецептора (uPAR), потом секрецијом uPA праћеном инхибицијом покретљивности првенствено MDA-MB-231 ћелијске линије. Механизам је посредован прекидима протеина екстрацелуларног матрикса чиме је редукована инвазија ћелија карцинома

4. Резултати и дискусија

што резултује њиховом адхезијом и миграцијом (Slivova и др., 2002). MCF-7 ћелијска линија испољава само 10 % активности у односу на другу канцер линију, па је стога неопходан дужи инкубациони период за испољавање АПА активности. На основу свега наведенога, може се претпоставити да је механизам инхибиције ћелијске миграције код ова два ћелијска типа различит услед различитих степена инвазивности, тако да је код MDA-MB-231 АПА ефекат резултат инхибиције NF-κB и секреције uPA, који нису активни код мање инвазивне ћелијске MCF-7 линије је стога АПА ефекат резултат инхибиције uPA/ uPAR система.

Тритерпени, доминантни код EtOH екстраката гљива испољавају АПА потенцијал директним цитотоксичним ефектом на ћелије карцинома дојке, који се остварују апоптозом и заустављањем ћелијског циклуса у G1 фази најчешће, али и ангиогенезом и проапоптозом (Hu и др., 2002; Liu и др., 2009; Shimizu и др., 2009). Наиме, пролиферација може бити посредована регулацијом експресије p21/Waf1 и смањењем регулације цикллина D1 чиме се индукује апоптоза која је посредована регулацијом проапоптотичког Вах протеина (Hu и др., 2002). С обзиром да је испољена активност испитиваног екстракта селективна, то је олакшавајућа околност с обзиром да је испољена активност искључиво на канцер ћелијску линију, а не и на здраву линију (Hu и др., 2002).

Са друге стране, узимајући у обзир чињеницу да је MCF-7 ћелијска линија естроген зависна, Shimizu и сар. (2009) су поредили активности EtOH екстраката *G. lucidum* како на MCF-7 тако и на естроген независну MDA-MB-231 и утврдили да постоје разлике у испољеним начинима деловања испитиваних екстраката што може указати на различитост хормонског статуса па се АПА ефекти могу са једне стране приписати ER рецепторима, а са друге стране NF-κB сигналингу (Liu и др., 2009; Shimizu и др., 2009). Претпоставља се да је естрогена активност испољена захваљујући чињеници да тритерпене карактерише стероидни бочни низ који може да учествује у интеракцији и активацији ER рецептора везујући се за α- и првенствено β- hERs (human estrogene receptors) што је потврђено регулацијом транскрипције pS2 mRNA гена код MCF-7 и употребом ER антагониста (ICI 182,780) (Shimizu и др., 2009).

4. Резултати и дискусија

Подаци о естрогеној активности *G. lucidum* постоје још из времена Ming династије и писмених остатака Li Shin-Chen-а, где се наведена врста користила код менопаузалних тегоба, које настају као последица естрогене дефицијенције. С обзиром да услед менопаузалног периода код жена долази до развоја разних обољења (нпр. остеопороза), и неопходна је хормонска терапија услед хормоналног дисбаланса па се прибегава употреби HRT-а (hormone replacement therapy), чија је дуготрајна примена фактор ризика за развој карцинома дојке и ендометријума (Persson и др., 1999). С тим у вези, све се више у скорије време ради на примени лекова/терапија на природној бази са естроген-сличној активности, коју поседују и гљиве рода *Ganoderma* (Gardner и McGuffin, 2013; Jiang и др., 2006; Shimizu и др., 2009; Sliva и др., 2002).

Намеће се закључак да активност екстраката зависи првенствено од присутних активних једињења која испољавају биолошку активност и механизма АПА деловања. С тим у вези, може се рећи да је и синергизам биолошки активних једињења испитиваних екстраката утицао у великој мери на испољавање АПА ефекта свих испитиваних врста у мањој или већој мери. Ефикасност присутних биолошки активних једињења зависи од низа срединских фактора као што су: специфично микростаниште тј. место продукције плодних тела, услова култивисања (код гајених врста), поступка екстракције, али и генетских фактора одређене врсте и самог соја унутар врсте (Karaman, 2009).

Анализа непречишћених екстраката на испитиваној ћелијској линији доводи до испољавања далеко слабијих ефеката од оних које испољавају пречишћени биомолекули (Zaidman и др., 2005), па би се у наредним експериментима требало више радити на примени ефикаснијих метода фракционисања у циљу добијања што чистијих супстанци за које се претпоставља да имају АПА својства.

4. Резултати и дискусија

4.7. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИДИЈАБЕТОГЕНЕ АКТИВНОСТИ ЕКСТРАКАТА
ГЉИВА

4.7.1. Фармакодинамичка испитивања

4.7.1.1. Вредности телесне масе

Из литературних навода познато је да се гљиве вековима користе како у исхрани људи тако и као додаци исхрани због изразитих нутритивних вредности, што наводи на претпоставку да оне знатно могу да утичу на телесну масу (Helena и др., 2012; Leal и др., 2013).

1. *Експериментална група (примењен физиолошки раствор (контрола) и екстракти гљива):* утицај екстраката гљива *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* на телесну масу животиња уочен је након петодневног третмана код свих испитиваних група, док је статистички значајан пораст масе забележен само код H_2O екстракта *G. pfeifferi* у односу преостале четири групе 5-дневног третмана физиолошким раствором и анализираним екстрактима гљива ($p < 0,01$, Tukey тест, ANOVA) (**Табела 4.6.**).

Табела 4.6. Вредности телесне масе на почетку, након завршетка третмана, као и промена телесне масе у посматраном периоду пацова третираних физиолошким раствором, EtOH и H_2O екстрактима гљива *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*

1. Експериментална група	Телесна маса пре третмана (g) (ТМ пре (g)±SD)	Телесна маса после третмана (g) (ТМ после (g)±SD)	Разлика у телесној маси (g) (ТМ разлика (g)±SD)
Контролна група	224,50±5,45 ^b	242,00±4,08 ^b	17,50±2,38 ^a
<i>G. pfeifferi</i> , EtOH	218,67±9,71 ^b	233,83±11,57 ^b	15,17±5,56 ^a
<i>G. pfeifferi</i> , H_2O	321,83±13,33 ^a	323,00±20,51 ^a	1,17±0,13 ^b
<i>G. resinaceum</i> , EtOH	235,17±21,05 ^b	247,83±22,54 ^b	12,67±2,34 ^a
<i>G. resinaceum</i> , H_2O	236,83±21,78 ^b	252,67±20,43 ^b	15,83±2,23 ^a

Резултати су изражени као средња вредност ± SD.

^{a, b} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт ($p < 0,01$)

2. *Експериментална група (примењен алоксан и екстракти гљива):* У

Табели 4.7. уочава се да поређењем промене телесне масе 2. *Експерименталне* групе животиња претретираних алоксаном и затим третираних екстрактима

4. Резултати и дискусија

гљива током 5 дана, не долази до статистички значајног смањења телесне масе ($p < 0,05$, Tukey тест, ANOVA).

Табела 4.7. Вредности телесне масе на почетку, након завршетка третмана, као и промена телесне масе у посматраном периоду пацова третираних алоксаном, EtOH и H₂O екстрактима гљива *G. pfeifferi* и *G. resinaceum**

2. Експериментална група	Телесна маса пре третмана (g) (ТМ пре (g) ±SD)	Телесна маса после третмана (g) (ТМ после (g) ±SD)	Разлика у телесној маси (g) (ТМ разлика (g) ±SD)
Алоксан	339,50 ± 25,77 ^a	327,00 ± 23,61 ^a	12,50 ± 6,02 ^a
<i>G. pfeifferi</i> , EtOH + алоксан	273,00 ± 51,40 ^b	266,33 ± 45,33 ^a	6,67 ± 3,86 ^a
<i>G. pfeifferi</i> , H ₂ O + алоксан	280,67 ± 48,46 ^a	270,50 ± 45,35 ^a	10,17 ± 5,27 ^a
<i>G. resinaceum</i> , EtOH + алоксан	273,17 ± 27,98 ^b	260,33 ± 24,57 ^b	12,83 ± 2,04 ^a
<i>G. resinaceum</i> , H ₂ O + алоксан	272,00 ± 32,58 ^b	260,00 ± 35,30 ^b	12,00 ± 4,28 ^a

Резултати су изражени као средња вредност ± SD.

^{a, b} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт ($p < 0,05$)

* након додатог алоксана у дози од 1 ml/kg per os током петодневног третмана

4.7.1.2. Алоксански дијабетес

За индукцију дијабетеса, кориштен је алоксан, нестабилна хидрофилна супстанца структурно слична глукози која се везује за GLUT2 глукозне транспортере смештене на површини β-ћелија панкреаса, где улази у исте и стварањем ROS-а доводи до селективног оштећења ћелија. Смрт β-ћелија коју изазива алоксан је тип некрозе, за разлику од смрти β-ћелија настале код оболелих од *D. melitusa* типа 1 која је тип апоптозе, зато се овај тип дијабетеса назива алоксански дијабетес (Etuk, 2010; Lenzen, 2008; Szkudelski, 2001). Алоксан-индуковани дијабетес је експериментални модел дијабетеса, који је последица ендогеног, хроничног оксидативног стреса који резултује хипергликемијом, и доводи до оштећења искључиво инсулин-продукујућих β-ћелија панкреаса (Zhang и др., 2003).

Макрогљиве су значајни извори природних биоактивних једињења велике молекулске масе: полисахарида, протеина, липида, али и молекула мале молекулске масе као што су: лектини, лактони, терпеноиди, алкалоиди, стероли и фенолна једињења (De Silva и др., 2012). Најчешће се врстама:

4. Резултати и дискусија

A. bisporus, *A. subrufescens*, *C. sinensis*, *C. comatus*, *G. lucidum*, *I. obliquus*, *P. linteus*, *Pleurotus* spp, *P. cocos* и *S. crispa* приписују хипогликемички ефекти, смањења нивоа шећера (глукозе) у крви, тј. антидијабетогени ефекти (De Silva и др., 2012).

Табела 4.8. Вредности гликемије пацова након оштећења панкреаса алоксаном

Експериментална група	Гликемија пре третмана алоксаном (mmol/L)	Гликемија 48h од давања алоксана (mmol/L)	Гликемија последњег дана огледа (mmol/L)
Контролна група	6,83±0,56	33,10±0,20	32,83±0,41
<i>G. pfeifferi</i> , EtOH	7,08±0,46	32,55±2,18	31,12±2,24
<i>G. pfeifferi</i> , H ₂ O	7,15±0,46	31,92±2,54	31,17±2,34
<i>G. resinaceum</i> , EtOH	7,08±0,38	31,50±1,88	28,25±2,35
<i>G. resinaceum</i> , H ₂ O	7,03±0,38	30,95±2,15	27,30±0,34 ^a

Легенда: ^a p<0,05 у односу на гликемију 48h од давања алоксана

У **Табели 4.8.** се уочава да не постоји статистички значајна разлика (p<0,05, Student T-тест поновљених мерења) између испитиваних група у концентрацији шећера у крви животиња пре примене алоксана, 48h након примене алоксана и након 5-дневног третмана, са изузетком H₂O екстракта *G. resinaceum* чијом применом је статистички значајно смањен ниво шећера у крви код експерименталних животиња (27,30±0,34 mmol/L).

4.7.1.3. Тест оралног оптерећења глукозом

Табела 4.9. Вредности шећера у крви (гликемије) пре и после оралног оптерећења пацова глукозом

Експериментална група	Гликемија пре третмана (mmol/L)	Гликемија пре оптерећења глукозом (mmol/L)	Гликемија 30min након оптерећења глукозом (mmol/L)
Контролна група	6,67±0,37	6,63±0,55	9,60±0,65 ^a
<i>G. pfeifferi</i> , EtOH	7,10±0,58	7,08±0,54	10,32±0,66 ^a
<i>G. pfeifferi</i> , H ₂ O	7,05±0,51	6,97±0,63	10,85±0,90
<i>G. resinaceum</i> , EtOH	6,92±0,42	7,08±0,40	8,70±0,30
<i>G. resinaceum</i> , H ₂ O	6,83±0,50	7,30±0,48	9,08±0,60

^a p<0,05 у односу на гликемију 48h од давања алоксана

4. Резултати и дискусија

У **Табели 4.9.** се уочава да је 30 min након третмана глукозом код контролне и *G. pfeifferi* EtOH експерименталне групе и даље повишен ниво шећера у крви који је статистички значајан ($p < 0,05$, Student T-тест поновљених мерења), те се долази се до закључка да је код ове две групе постигнут хипергликемички ефекат.

Иако су након третмана глукозом и код преосталих експерименталних група и даље повишени нивои шећера у крви, ипак се код ових група, а првенствено група *G. resinaceum* уочава тенденција за снижење нивоа шећера у крви која није статистички значајна ($p < 0,05$, Student T-тест поновљених мерења), те се и спречена статистички значајна гликемија сматра позитивним резултатом.

Уколико се узме у обзир хистолошки изглед Лангерхансових острваца панкреаса (**Слика 4.1.**) долази се до закључка да је код 1. *Експерименталне групе* (физиолошки раствор и екстракти) утврђена уобичајена грађа егзокриног и ендокриног дела панкреаса као и Лангерхансова острвца уобичајених карактеристика. Код 2. *Експерименталне групе* (претретман алоксан + екстракти) уочава се јасно оштећење Лангерхансових острваца панкреаса где су углавном преостале само α -ћелије панкреаса с обзиром на чињеницу да је алоксан селективно токсичан према β -ћелијама. Примењени екстракти гљива нису испољили значајно антидијабетогено деловање, али ипак се значајан резултат може видети код примене EtOH екстракта *G. pfeifferi* са претретманом алоксана (**Слика 4.1. 2**), где су нешто већа Лангерхансова острвца, али ипак са недовољном густином β -ћелија које би указале на протективни ефекат на ткиву панкреаса.

На основу претходних студија испитивања антидијабетогене активности, долази се до сазнања да једињења са антиоксидантом активношћу имају способност да редукују дијабетичке компликације с обзиром да је оксидативни стрес једна од последица дијабетеса (Jia и др., 2009). Од поменутих једињења код *Ganoderma* врста првенствено се издвајају полисахариди (гљукани) и тритерпени чија активност је доказана углавном код врсте *G. lucidum* (Jia и др., 2009; Nie и др., 2013; Pan и др., 2013; Shi и др., 2008; Zhang и др., 2003). Полисахаридним компонентама (β -гљукани) које садрже макрогљиве може се приписати својство вршења регенерације функционалности ткива панкреаса

4. Резултати и дискусија

повећањем продукције инсулина од стране β -ћелија (De Silva и др., 2012). За полисахариде врсте *G. lucidum* хипогликемички ефекти су везани за олакшано ослобађање јона Ca^{2+} у β -ћелије панкреаса, чиме долази до ослобађања инсулина у исте (De Silva и др., 2012; Zhang и Lin, 2004). На основу горе поменутог, полисахаридна једињења немају способност синтезе инсулина, већ стимулишу директно ослобађање инсулина из панкреаса (Zhang и Lin, 2004) тако да концентрација циркулишућег инсулина зависи од регулације секреције, пре него биосинтезе самог хормона (Lang, 1999). С обзиром да се статистички значајним показала примена H_2O екстракта *G. resinaceum*, за коју нема литературних навода за антидијабетогену активност, али за коју је доказано присуство полисахарида, активних компоненти може се препоручити даљње истраживање ове гљиве и њених једињења која би могла бити одговорна за испољавање хипогликемичког дејства наведеног екстракта (Amaral и др., 2008; Mahmoud и др., 2007; Silva и др., 2013). Поред поменутих полисахаридних, и терпеноиди су једињења са широким спектром биолошких активности (De Silva и др., 2012). За ганодерол (ганодерична киселина В) заступљен код врста рода *Ganoderma* хипогликемични механизам је базиран на инхибицији α -глукозидазе која утиче на процес варења угљених хидрата и захваљујући том својству, ово једињење се сматра потенцијалним антидијабетогеним агенсом код третмана дијабетеса типа 2 (Fatmawati, 2011; Pоров, 2011).

4. Резултати и дискусија

4.7.2. Одређивање биохемијских параметара и испитивање функције јетре и бубрега

Табела 4.10. Концентрација укупног холестерола, триглицерида (TGC), HDL и LDL холестерола, урее и креатинина, аспартат аминотрансферазе и аланин аминотрансферазе (средња вредност \pm SD) у серуму пацова третираних са физиолошким раствором, алоксаном, EtOH и H₂O екстрактима врста *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*

Параметар		Контрола	Алоксан	Г.р. EtOH + алоксан	Г.р. EtOH	Г.р. H ₂ O + алоксан	Г.р. H ₂ O	Г.г. EtOH + алоксан	Г.г. EtOH	Г.г. H ₂ O + алоксан	Г.г. H ₂ O
липидни статус	Ук. Холестерол	1,54 \pm 0,24 ^a	1,73 \pm 0,24 ^a	1,78 \pm 0,25 ^a	1,56 \pm 0,34 ^a	1,90 \pm 0,26 ^a	1,71 \pm 0,19 ^a	1,55 \pm 0,23 ^a	1,63 \pm 0,32 ^a	1,49 \pm 0,18 ^a	1,55 \pm 0,21 ^a
	Ук. TGC	1,14 \pm 0,60 ^a	4,19 \pm 0,94 ^b	1,09 \pm 0,20 ^a	0,89 \pm 0,19 ^a	1,71 \pm 0,23 ^a	1,09 \pm 0,40 ^a	1,01 \pm 0,30 ^a	1,47 \pm 1,09 ^a	0,75 \pm 0,21 ^a	1,15 \pm 0,51 ^a
	HDL	0,90 \pm 0,17 ^a	0,75 \pm 0,17 ^a	1,01 \pm 0,16 ^a	0,90 \pm 0,21 ^a	0,97 \pm 0,25 ^a	0,98 \pm 0,15 ^a	0,79 \pm 0,17 ^a	0,78 \pm 0,10 ^a	0,77 \pm 0,15 ^a	0,74 \pm 0,12 ^a
	LDL	0,21 \pm 0,10 ^a	0,85 \pm 0,40 ^b	0,27 \pm 0,14 ^a	0,25 \pm 0,12 ^a	0,06 \pm 0,06 ^a	0,30 \pm 0,13 ^a	0,32 \pm 0,12 ^a	0,35 \pm 0,10 ^a	0,37 \pm 0,16 ^a	0,27 \pm 0,15 ^a
бубрежни функција	Уреа	7,40 \pm 0,56 ^a	46,98 \pm 6,01 ^b	76,64 \pm 7,63 ^c	8,50 \pm 1,37 ^a	74,32 \pm 10,97 ^c	8,73 \pm 1,21 ^a	6,23 \pm 0,73 ^a	8,02 \pm 1,49 ^a	6,27 \pm 0,64 ^a	8,00 \pm 0,85 ^a
	Креатинин	52,25 \pm 8,62 ^a	289,25 \pm 73,8 ^{7b}	379,00 \pm 79,0 ^{9c}	51,00 \pm 3,03 ^a	395,40 \pm 97,39 ^c	48,50 \pm 2,43 ^a	48,50 \pm 4,72 ^a	50,40 \pm 9,02 ^a	50,00 \pm 6,45 ^a	52,83 \pm 8,47 ^a
	AST	268,00 \pm 44,62 ^a	310,50 \pm 33,2 ^{9a}	320,80 \pm 41,4 ^{1a}	305,40 \pm 66,41 ^a	308,17 \pm 52,3 ^{2a}	288,83 \pm 44,59 ^a	224,67 \pm 70,21 ^a	319,83 \pm 10,76 ^a	207,50 \pm 38,87 ^a	284,67 \pm 18,33 ^a
	ALT	98,00 \pm 13,00 ^c	60,17 \pm 9,64 ^b	50,17 \pm 14,16 ^b	83,60 \pm 18,35 ^c	51,83 \pm 12,59 ^b	82,17 \pm 15,54 ^c	23,20 \pm 3,90 ^a	34,60 \pm 10,78 ^a	17,83 \pm 3,25 ^a	24,20 \pm 8,64 ^a

Резултати су изражени као средња вредност \pm SD.

^{a, b, c} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт ($p < 0,01$) (Тукеу тест, ANOVA)

4. Резултати и дискусија

4.7.2.1. Утицај дијабетеса на липидни статус

У **Табели 4.10.** се уочава да не постоји статистички значајна разлика у концентрацији укупног холестерола, а ни HDL фракције у серуму испитиваних група 5-дневног третмана као ни LDL холестерола, са изузетком групе којој је додаван алоксан током 5 дана где је забележен статистички значајан ниво ($0,85 \pm 0,40$ mmol/L) ($p < 0,01$, Tukey тест, ANOVA). Такође је повишена концентрација TGC, с обзиром да се као последица хипергликемије развија хиперлипидемија. На основу табеларног приказа уочавају се код појединих екстраката снижени нивои TGC, који пак нису статистички значајни. Иако углавном нема статистички значајних резултата, треба се нагласити да при поређењу експерименталне групе која је третирана са физиолошким раствором и групе животиња третираних како са екстрактима, тако и група претретираних алоксаном не нарушава се у великој мери липидни статус, а код мерења неких одређених параметара уочава се потенцијално протективни ефекат испитиваних екстраката.

Способност гљива да утичу на липидни статус је већ деценијама позната, захваљујући и чињеници да је из гљива изолован први лек који је способан да утиче на синтезу холестерола, мевастатин. Потом је изолован ловастатин (мевинолин) из врсте *A. terreus*, и први је статин употребљен у клиничке сврхе (Tobert, 2003). Хипохолестеролемични ефекат је поред ловастатина забележен и код еритаденина, а значајан је и за дијететска влакна која су у високом садржају забележена код гљива (β -глюкански тип полисахарида) (Rathee и др., 2012). С обзиром да више од половине укупне масе суве материје већине гљива чине угљени хидрати који су претежно нерастворљиви или слабо растворљиви па тиме имају мали удео у укупној калоријској вредности гљива, док се са друге стране сврставају у дијетна влакна. На основу литературних података се долази до сазнања да су дијетна влакна из гљива значајна као имуностимулирајући, антитуморски, хипогликемијски и хиполипидемијски агенси (Cheung, 2013).

Код дијабетеса долази до поремећаја LDL и HDL холестерола, где LDL фракција преноси холестерол и као последица долази до атеросклерозе. Атеросклероза, LDL оксидација и хиперхолестеролемија су главни показатељи предиспозиција за

4. Резултати и дискусија

кардиоваскуларна обољења стога је неопходна регулација нивоа холестерола са циљем превенције и третмана ових болести (De Silva и др., 2012).

Код гљива рода *Ganoderma* највише је литературних података за *G. lucidum*, из којих се долази до сазнања да су најзначајнији кардио-протективни агенси такође полисахариди и тритерпеноиди (Klupp и др., 2015). Тритерпеноидна једињења, у првом реду ганодеричне киселине (А, В, С) испољавају своје протективно дејство хипогликемичким деловањем (Fatmawati, 2011), док је за неке од њих карактеристичан хиполипидемички протективни ефекат инхибицијом синтезе холестерола (Komoda, 1989). Полисахаридна једињења, чак преко 150 припадника ове групе укључујући β -D-глюкани, хетерополисахариде и гликопротеине делују првенствено хипогликемички (Klupp, 2015; Zhang и Lin, 2004). Zhang и Lin (2004) су *in vitro* експериментом доказали да полисахариди имају способност стимулације директне *секреције* инсулина, али не и значај на садржај инсулина у панкреасу, тј. да 24-часовном инкубацијом не доводе до стимулације *синтезе* инсулина.

3.7.2.2. Утицај дијабетеса на функцију бубрега и јетре

Дијабетесна нефропатија је једна од компликација дијабетеса, али и један од узрочника бубрежне инсуфицијенције (Macedo и др., 2002) за коју није познат тачан механизам. У циљу одређивања утицаја на функцију бубрега праћена је концентрација урее и креатинина (**Табела 4.10.**), а такође је урађен и хистолошки преглед ткива бубрега. С обзиром да је код животиња изазван дијабетес и забележена хипергликемија, долази се до претпоставке да примена екстраката неће спречити повећање урее и креатинина с обзиром на повећану разградњу протеина чији су деградациони производи уреа и креатинин (Samra и Absar, 2012).

Код одређивања параметара бубрежне функције (уреа и креатинин) код не алоксанских група, добијени резултати нису статистички значајни ($p < 0,01$, Tukey тест, ANOVA) (**Табела 4.10.**).

Код одређивања нивоа урее, код обе експерименталне групе код којих су примењени EtOH и H₂O екстракти *G. resinaceum* уз претретман алоксаном забележени су нижи нивои наведеног параметра бубрежне функције ($6,23 \pm 0,73$,

4. Резултати и дискусија

односно $6,27 \pm 0,64$) у односу на контролну алоксанску групу ($7,40 \pm 0,56$) (**Табела 4.10.**).

Серумска концентрација креатинина мерена након примене EtOH и H₂O екстраката *G. resinaceum* уз претретман алоксаном, је такође статистички значајно смањена ($48,50 \pm 4,72$, односно $50,00 \pm 6,45$) у односу на контролну алоксанску групу ($289,25 \pm 73,87$), што указује на потенцијални нефропротективни ефекат екстраката *G. resinaceum*. За разлику од *G. resinaceum*, код EtOH и H₂O *G. pfeifferi* експериментале групе уз претретман алоксаном статистички значајно су повишени нивои оба параметра бубрежне функције у односу на контролну, алоксанску групу ($p < 0,01$, Tukey тест, ANOVA) (**Табела 4.10.**)

Добијени резултати су потврђени хистолошким прегледом препарата бубрега где код наведених група нису уочене промене у бубрежном ткиву и у потпуности одговарају нормалном хистолошком налазу који се налази у контролној групи физиолошког раствора, док су код преосталих група уочене промене у грађи бубрежног ткива услед присуства хијалиних цилиндара (**Слика 4.2.**).

Оштећење јетре започиње оксидативним стресом, а одбрамбени механизам чине како ензимски тако и неензимски системи антиоксидативне заштите (<http://www.diabetesforecast.org/2012/feb/the-liver-s-role-how-it-processes-fats-and-carbs.html>).

Уколико се наведени систем наруши, долази до повећане продукције ROS-а, развија се липидна пероксидација, долази до оштећења ћелијске мембране хепатоцита, чиме долази до губитка функције јетре. Оштећењем хепатоцита долази до трансфера ензима аспарат аминотрансферазе (AST) и аланин аминотрансферазе (ALT) у серум, што је главни показатељ оштећења јетре (Soares, 2013). Да би се проверила својства гљиве на ткиво одређена је и хистолошка анализа ткива.

Поредећи анализирани параметре, ALT је специфичнији показатељ оштећења ткива јетре од AST-а који се може пронаћи осим у ткивима јетре и у срцу, скелетским мишићима, бубрезима, мозгу и црвеним крвним зрнацима (Soares, 2013).

На основу добијених серумских концентрација AST-а, може се уочити да не постоји статистички значајан ефекат испитиваних екстраката гљива на овај јетрени параметар, али су вредности код шест од осам експерименталних група

4. Резултати и дискусија

третираних како екстрактима *G. pfeifferi* тако и *G. resinaceum* повећане у односу на контролну групу где је примењен само физиолошки раствор ($p < 0,01$, Tukey тест, ANOVA) (**Табела 4.10.**). Потенцијално протективни ефекат се запажа само код EtOH и H₂O екстраката *G. resinaceum* претретираних алоксаном ($224,67 \pm 70,21$, односно $207,50 \pm 38,87$ у односу на контролу $268,00 \pm 44,62$) (**Табела 4.10.**).

Насупрот томе, у све четири експерименталне групе које су добијале *G. resinaceum* екстракте дошло је до статистички значајног смањења активности ALT-а у односу на експерименталну групу животиња која је добијала физиолошки раствор ($17,83-34,60$ у односу на $98,00 \pm 13,00$ забележено за контролну групу) ($p < 0,01$, Tukey тест, ANOVA) (**Табела 4.10.**), те се долази до закључка да би се ова врста могла користити као хепатопротективни агенс. Такође при анализи ткива јетре нису уочена хистолошка одступања (**Слика 4.3.**).

Не постоје литературни подаци о антидијабетогеном деловању испитиване две врсте, а једини доступни резултати су базирани на *G. lucidum*, за коју се зна да су полисахаридна и тритерпеноидна једињења потенцијални хепатопротективни агенси (Гао и др., 2003). Такође је и за пептиде *G. lucidum* доказана изузетна антиоксидантна активност, што се може довести у везу са потенцијалним хепатопротективним својствима (Shi и др., 2008).

Код испитиваних екстраката *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* доказана је поред *in vitro* и *in vivo* антиоксидантна активност на хомогенату јетре пацова, која се такође може довести у везу са потенцијалним хепатопротективним ефектима врста рода *Ganoderma* (**Прилог 7.3.; Табеле 7.34. и 7.35.**).

4.7.3. Морфолошка испитивања

4.7.3.1. Хистолошка анализа ткива панкреаса

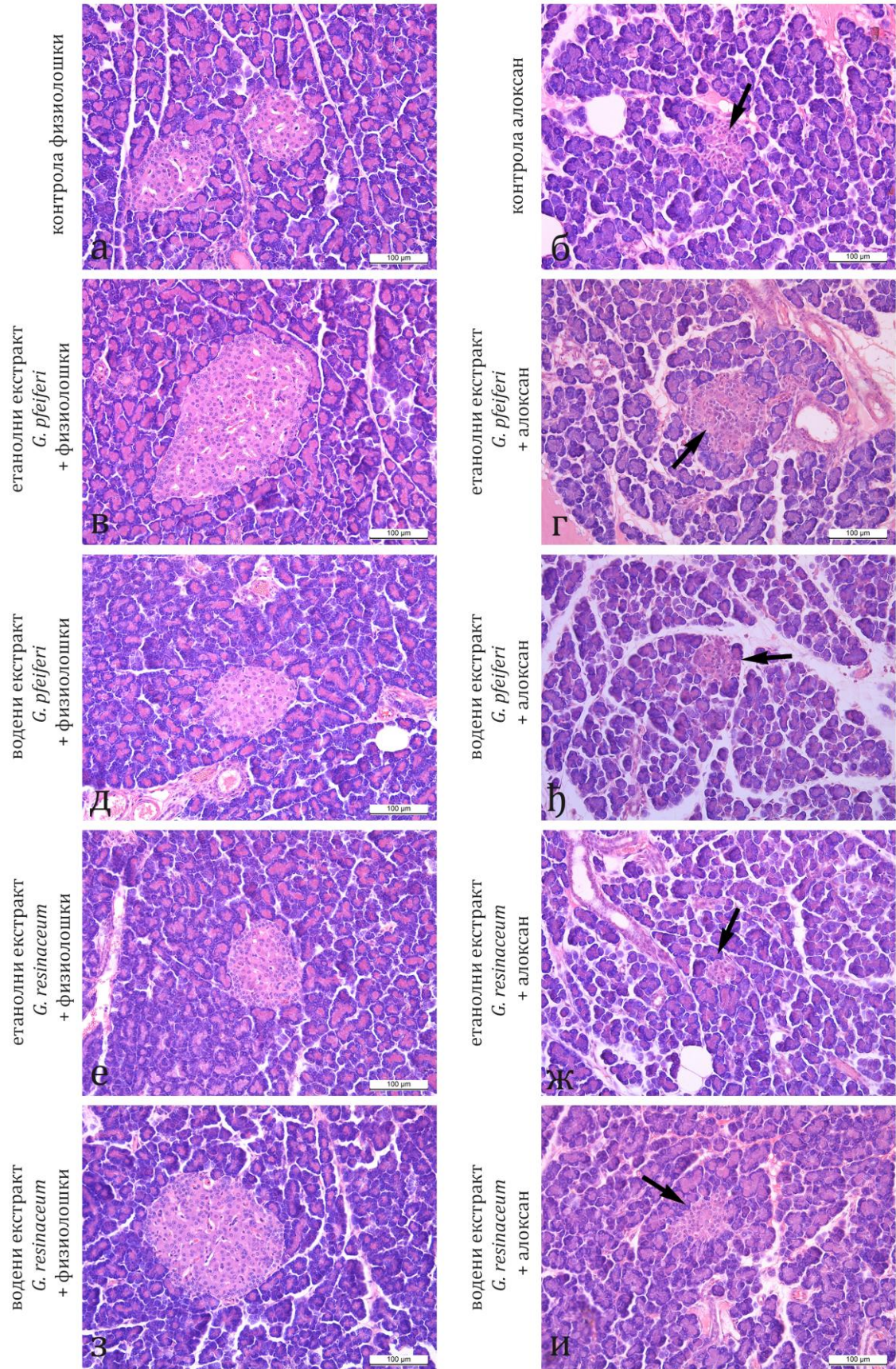
Хистолошком анализом панкреасног ткива код контролне групе - физиолошки (**Слика 4.1. а**), групе EtOH и H₂O екстракта *G. pfeifferi* + физиолошки раствор (**Слика 4.1. в, д**), и групе EtOH и H₂O екстракта *G. resinaceum* + физиолошки раствор (**Слика 4.1. е, з**) утврђена је уобичајена грађа егзокриног и ендокриног дела панкреаса. Лангерхансова острвца уобичајених карактеристика изграђена од централно постављених, ацидофилних, β -ћелија међусобно одвојених капиларима

4. Резултати и дискусија

и периферно, у виду венца постављених алфа ћелија које карактерише нешто светлија цитоплазма. Острвца су окружена егзокриним делом панкреасног ткива који гради ацинарне формације.

Међутим након примене алоксана у групама: контрола алоксан (**Слика 4.1. б**), EtOH и H₂O екстракта *G. pfeifferi* + алоксан (**Слика 4.1. з, ђ**), и EtOH и H₂O екстракта *G. resinaceum* + алоксан (**Слика 4.1. ж, и**) уочава се јасано оштећење Лангерхансових острваца. Алоксан показује селективну токсичност оштећујући само β-ћелије тако да другог дана након његове примене Лангерхансова острвца чине углавном само алфа ћелије и преостала потка острвцета коју чине фиброцити, капилари и фина реткуларна влакна. Местимице унутар острвца се могу запазити макрофаги који учествују у елиминацији преосталог ћелијског детритуса насталог деструкцијом β-ћелија. Највећи број острваца је изразито малог дијаметра са јасно нарушеним континуитетом инсуло-ацинарне границе. У групи EtOH екстракта *G. pfeifferi* + алоксан код појединих животиња се уочио повећан број и нешто већа Лангерхансова острвца али ипак са видно мањом густином β-ћелија.

4. Резултати и дискусија



Слика 4.1. Хистолошка анализа ткива панкреаса. ХЕ. 200x

4. Резултати и дискусија

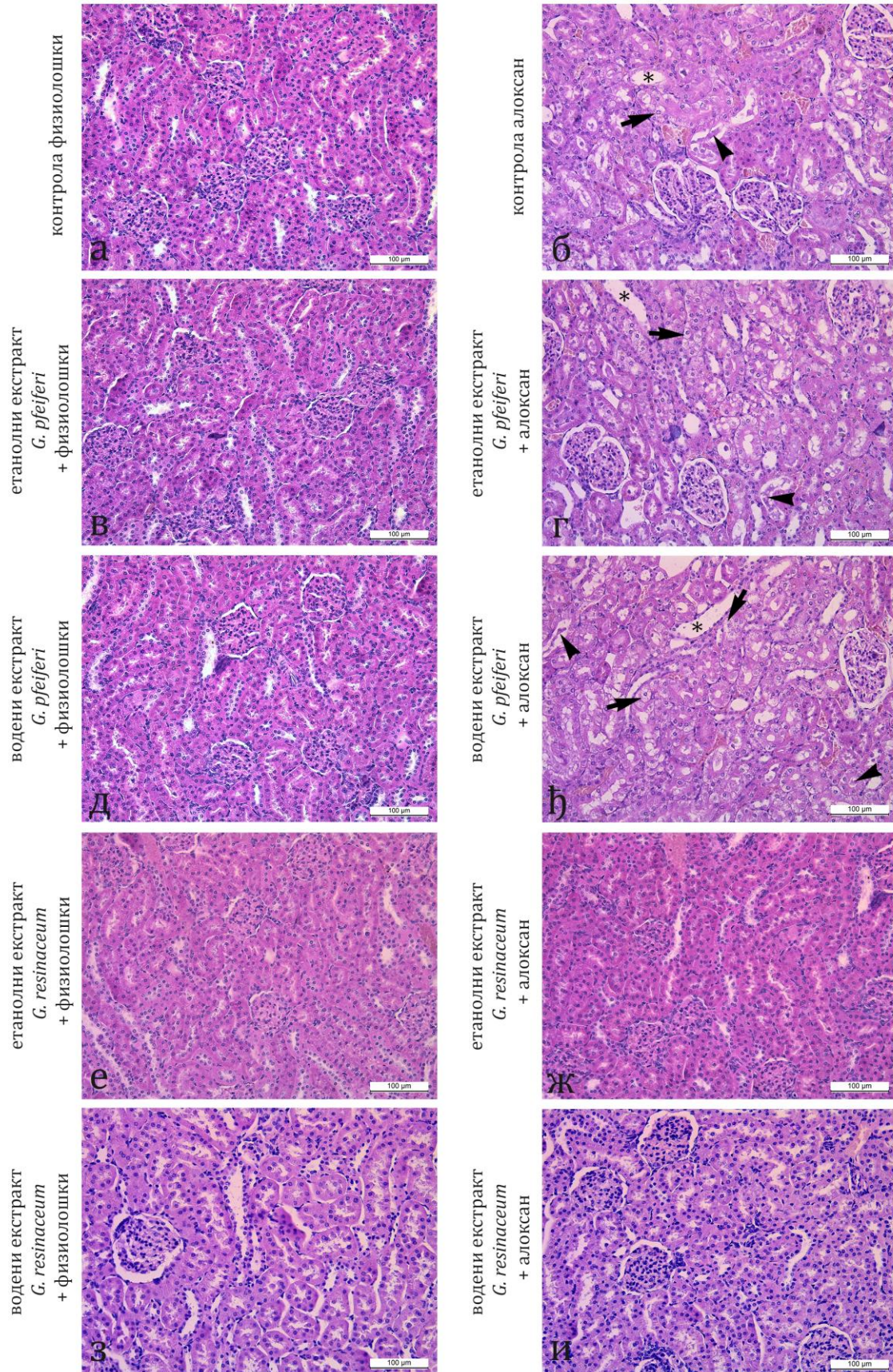
4.7.3.2. Хистолошка анализа ткива бубрега

Хистолошком анализом бубрежног ткива у контролној групи јединки утврђена је правилност у грађи бубрежних тубула и гломерула (**Слика 4.2. а**). У контролној алоксанској групи уочава се појава хидропсне дегенерације ћелија епитела (**Слика 4.2. б**, стрелица) уз фокалну дилатацију проксималних делова нефрона (**Слика 4.2. б**, звездица) насталу услед присуства хијалиних цилиндара у дисталним партијама тубуларног система (**Слика 4.2. б**, глава стрелице).

У групама EtOH и H₂O екстракта *G. pfeifferi* + физиолошки раствор (**Слика 4.2. в, д**) нису уочене промене у бубрежном ткиву и у потпуности одговарају нормалном хистолошком налазу који се налази у контролној групи јединки. Међутим, код експерименталних група EtOH и H₂O екстракта *G. pfeifferi* + алоксан (**Слика 4.2. з, ђ**) уочавају се промене истих карактеристика и сличног интензитета као и у контролној алоксанској групи.

У групама EtOH и H₂O екстракта *G. resinaceum* + физиолошки раствор (**Слика 4.2. е, з**) али и у групама EtOH и H₂O екстракта *G. resinaceum* + физиолошки раствор (**Слика 4.2. ж, и**) нису уочене промене у бубрежном ткиву и у потпуности одговарају нормалном хистолошком налазу који се налази у контролној групи јединки.

4. Резултати и дискусија



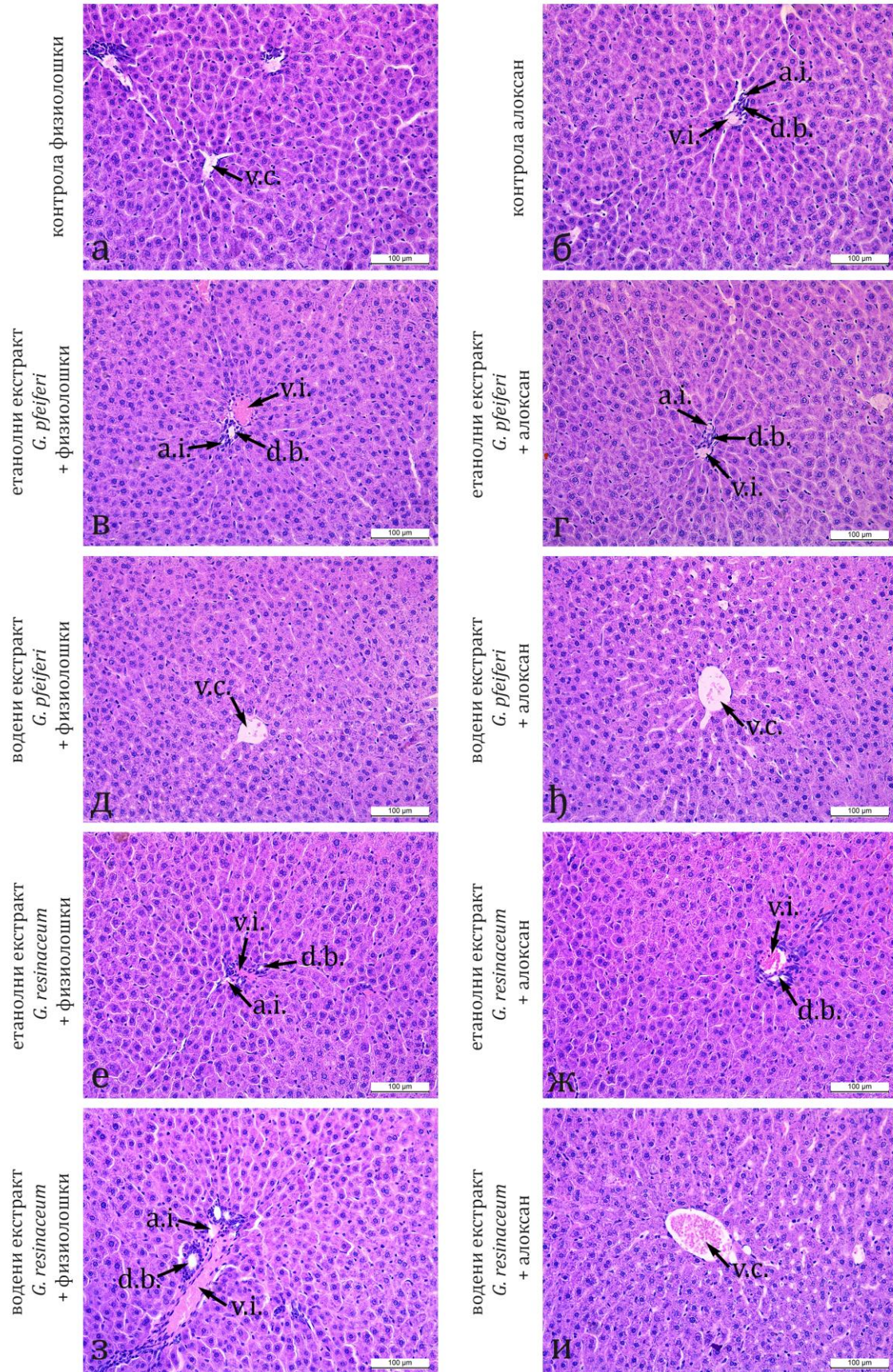
Слика 4.2. Хистолошка анализа бубрежног ткива. ХЕ, 200х.

4. Резултати и дискусија

4.7.3.3. Хистолошка анализа ткива јетре

Хистолошком анализом јетреног ткива код обе контролне групе - физиолошки и алоксан (*Слика 4.3. а, б*), групе EtOH и H₂O екстракта *G. pfeifferi* + физиолошки раствор (*Слика 4.3. в, д*), групе EtOH и H₂O екстракта *G. pfeifferi* + алоксан (*Слика 4.3. з, ђ*), и групе EtOH и H₂O екстракта *G. resinaceum* + физиолошки раствор (*Слика 4.3. е, з*), и групе EtOH и H₂O екстракта + алоксан (*Слика 4.3. ж, и*) нису уочена хистолошка одступања. Хепатоцити су уобичајеног облика, централно постављеног једра и светле лако гранулиране ацидофилне цитоплазме, аранжирани у тзв. Ремакове гредице које се од централне вене (*vena centralis* - v.c.) пружају радијално ка периферији јетреног лобулуса. Синусоидални капилари нису дилатирани а унутар Киернановог троугла могу се уочити интерлобуларна артерија (*arteria interlobularis* - a.i.), интерлобуларна вена (*vena interlobularis* - v.i.), и жучни каналић (*ductus biliferi* - d.b.) уобичајених карактеристика.

4. Резултати и дискусија



Слика 4.3. Хистолошка анализа ткива јетре. ХЕ, 200х.

4. Резултати и дискусија

Примена EtOH и H₂O екстраката гљива *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* у комбинацији са физиолошким раствором није утицала на карактеристике бубрежног ткива. Међутим, примена алоксана, како у групи контрола алоксан тако и код примене H₂O и EtOH екстракта гљиве *G. pfeifferi* довела је до реверзибилних промена типа хидропсне дегенерације која је захватила проксималне тубуле. У дисталним тубуларним партијама могли су се уочити хијални цилиндри који представљају преципитоване протеине услед појаве протеинурије. Опструкција лумена тубула условила је њихову дилатацију у проксималним партијама. Са друге стране примена H₂O и EtOH екстракта *G. resinaceum* у комбинацији са алоксаном карактерисала се интактношћу тубуларног система. Овом приликом је потврђен протективни ефекат гљиве *G. resinaceum* на ткиво бубрега што није био случај код *G. pfeifferi*.

Примена самог алоксана као и у комбинацији са EtOH и H₂O екстрактима *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* није довела до оштећења јетреног ткива. Примена самих екстраката гљива (са физиолошким раствором) такође није довела до битних промена у грађи ткива јетре.

Највећи токсични ефекат алоксан је остварио на ткиву панкреаса. Наиме, његовом применом дошло је до готово потпуног губитка инсулин продукујућих β-ћелија Лангерхансовог острвца панкреаса. Код свих група острвца су мала, сачињена махом од алфа ћелија. Нешто мање оштећење се могло уочити код појединачних јединки које су примале EtOH екстракт *G. pfeifferi*. С обзиром да је еутаназија јединки уследила два дана након примене алоксана острвца је карактерисало присуство само глукагон продукујућих алфа ћелија и ретких преживелих β-ћелија. У овој фази алоксанског дијабетеса јасни знаци регенерације острваца се још увек нису могли уочити. Испитивањем је утврђено да третман екстрактима гљива *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* није успео да спречи токсични ефекат алоксана на β-ћелије Лангерхансових острваца.

5.

ЗАКЉУЧАК



5. Закључак

Ова докторска дисертација претставља допринос свеукупним сазнањима о микохемијском саставу и биолошком потенцијалу врста рода *Ganoderma*, од којих се многе већ вековима користе као лековите гљиве у земљама Далеког Истока. Овај рад пружа нове информације о хемијском саставу, антиоксидантном, антимикробном, антиинфламаторном, антипролиферативном и антидијабетогеном потенцијалу екстракта врста рода *Ganoderma* (*G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*), сакупљених на локалитетима у Србији. *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* су најмање истраживане од свих анализираних врста, и стога су резултати добијени за ове врсте од великог значаја за науку.

Хемијска карактеризација

Садржај макро- и микроелемената:

AAS спектрофотометријска техника је примењена за квантитативну анализу одабраних макро- и микроелемената за 4 одабране врсте гљива: *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*.

У свим анализираним врстама од макроелемената највише је присутан јон K^+ (0,89 до 3,66 mg/g) са изузетком врсте *G. pfeifferi* где је најдоминантнији јон Ca^{2+} (4,55 mg/g) који је истовремено најзаступљенији од свих јона, уопште. Садржај јона Ca^{2+} се кретао од 0,82 mg/g код врсте *G. resinaceum* до 4,55 mg/g код *G. pfeifferi*. Најмањи је садржај јона Mg^{2+} , који се кретао у опсегу од 0,66 mg/g код *G. resinaceum* до 1,33 mg/g код *G. pfeifferi*.

На основу анализе садржаја микроелемената у највећој концентрацији је присутан јон Zn^{2+} који се кретао у концентрацијама од 21,09 $\mu\text{g/g}$ код врсте *G. applanatum* до 41,70 $\mu\text{g/g}$ код врсте *G. pfeifferi*. У доста високој концентрацији су присутни и јони Mn^{2+} (7,05 до 43,00 $\mu\text{g/g}$) и Cu^{2+} (17,31 до 22,22 $\mu\text{g/g}$), где се по садржају издвајају врсте *G. applanatum* и *G. pfeifferi*. Изненађујуће су ниске концентрације јона Fe^{2+} (0,19 до 0,94 $\mu\text{g/g}$).

Хемијски састав различитих врста гљива зависи од доступних елемената у супстратима на којима расту и способности акумулације макро- и микроелемената различитим механизмима створеним током еволуције као одбрамбеним механизмима од неповољних утицаја окружења.

5. Закључак

Фенолни профил:

У оквиру прелиминарног испитивања хемијског састава EtOH и H₂O екстракта гљива рода *Ganoderma*: *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* спектрофотометријским методама је одређен садржај укупних фенола и укупних флавоноида.

Садржај укупних фенола у анализираним EtOH и H₂O екстрактима кретао се у опсегу вредности од 4,26 до 265,38 mg ек. ГК/g с.м. Највећи садржај укупних фенола код EtOH екстракта утврђен је код врсте *G. applanatum* (265,38 mg ек. ГК/g с.м.), док је код H₂O екстракта највећи фенолни садржај забележен код врсте *G. pfeifferi* (23,13 mg ек. ГК/g с.м.). Најмањи садржај укупних фенола забележен је код H₂O екстракта врсте *G. lucidum* (4,26 mg ек. ГК/g с.м.).

Садржај укупних флавоноида у анализираним EtOH и H₂O екстрактима кретао се у опсегу вредности од 4,38 до 166,10 mg ек. К/g с.м. Највећи садржај укупних флавоноида код EtOH екстракта забележен је за врсту *G. lucidum* (73,02 mg ек. К/g с.м.), док је код H₂O екстракта карактеристичан за врсту *G. applanatum* (166,10 mg ек. К/g с.м.). Најнижа концентрација флавоноида одређена је код H₂O екстракта врсте *G. resinaceum* (4,38 mg ек. К/g с.м.).

Генерално, вредности укупних фенола и флавоноида су статистички значајно веће код EtOH екстракта анализираних гљива, са изузетком H₂O екстракта врсте *G. applanatum*, где је забележен статистички већи садржај укупних флавоноида.

Одређивање садржаја фенолних једињења

Садржај 44 фенолна једињења и хинске киселине одређен је применом LC-MS/MS технике за квантитативну анализу одабраних фенолних једињења у EtOH и H₂O екстрактима врста: *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* са свих локалитета. У одабраним екстрактима одређено је 12 фенолних једињења (р-хидроксибензоева киселина, протокатехинска киселина, р-кумаринска киселина, ванилинска киселина, гална киселина, ескулетин, кафена киселина, хинска киселина, сиригинска киселина, кризоериол, изорамнетин и хлорогенска киселина).

5. Закључак

У анализираним екстрактима најзаступљенија фенолна једињења су фенолне киселине: *p*-хидроксибензоева (*G. pfeifferi*, EtOH), протокатехинска (*G. lucidum*, EtOH) и ванилинска киселина (*G. applanatum*, EtOH). Највећа концентрација анализираних фенолних једињења забележена је код EtOH екстраката *G. applanatum* и *G. pfeifferi*, где су код *G. applanatum* поред горе поменуте три анализираних фенолне киселине доказана и следећа једињења: *p*-кумаринска, гална, кафена, хинска, сиригинска киселина и ескулетин, а код *G. pfeifferi* поред наведених једињења доказано је присуство и хлорогенске киселине, флавоноида (изорамнетин и кризоериол), али и одсуство ескулетина. Код H₂O екстракта *G. resinaceum* доказана само протокатехинска киселина у доста ниској концентрацији (0,0006 g/kg с.м.).

На основу квантитативних резултата испитиваних фенолних једињења запажа се њихов далеко већи садржај у EtOH, у односу на H₂O екстракте анализираних врста, што је потврђено и спектрофотометријском анализом фенолног профила.

Садржај протеина:

Резултати анализе садржаја протеина (Bradford, 1976) у EtOH и H₂O екстрактима четири врсте рода *Ganoderma*, указују на далеко већи садржај истих у EtOH екстрактима (7,17 код *G. resinaceum* до 23,31 mg ек. протеина/g с.м. код *G. lucidum*), док је код H₂O екстраката однос био од 1,16 mg ек. протеина/g с.м. код *G. applanatum* до 3,37 mg ек. протеина/g с.м. код *G. resinaceum*.

Разлог већег садржаја протеина у EtOH екстрактима, може бити различит начин припреме екстраката, који могу да садрже мешавину/комплекс полисахарида, протеина и полифенола који могу потенцијално утицати на веће вредности апсорбанција, а самим тим и на могућност постизања „лажно“ позитивних резултата. Разлог томе може бити и чињеница да услед екстракције долази до оштећења талуса гљиве и везивања ензима тирозиназе за фенолне компоненте екстракта, те су оксидовани феноли и даље присутни у екстракту тиме што су ковалентно везани за полисахариде.

5. Закључак

Садржај шећера:

Резултати одређивања садржаја шећера (PSA тест) у EtOH и H₂O екстрактима за четири анализирани врсте указују на далеко већи садржај шећерних компоненти у EtOH екстрактима, где се као најдоминантнији моносахарид издваја глукоза (241,35 до 724,94 mg ек. Glc/g с.м.), док је овај опсег за H₂O екстракте био од 55,75 до 222,33 mg ек. Glc/g с.м. Код EtOH екстраката издваја се врста *G. applanatum* где је одређен највећи садржај глукозе (724,94 mg ек. Glc/g с.м.), док је код H₂O екстраката највећи садржај код *G. pfeifferi* (222,33 mg ек. Glc/g с.м.).

Код одређивања садржаја фруктозе, за EtOH екстракте средње вредности су биле у опсегу 54,91 до 452,00 mg ек. Fru/g с.м., а код H₂O од 12,66 до 50,98 mg ек. Fru/g с.м. Код EtOH екстраката *G. applanatum* је и за Fru одређен највећи садржај (452,00 mg ек. Fru/g с.м.), док је код H₂O екстраката највећи садржај код *G. pfeifferi* (50,98 mg ек. Glc/g с.м.).

Код одређивања ксилозе, вредности за EtOH екстракте су се кретале у опсегу (93,16 до 277,93 mg ек. Xyl/g с.м.), а за H₂O екстракте (21,04 до 83,84 mg ек. Xyl/g с.м.). За анализирани хексозе (Glc и Fru) и пентозу (Xyl) највећи садржај је одређен код *G. applanatum* за EtOH екстракте, док је код H₂O екстраката највећи садржај одређен код *G. pfeifferi*.

Код сахарозе је највећи садржај одређен за *G. lucidum*, EtOH (427,60 mg ек. Sah/g с.м.), и за H₂O екстракт *G. pfeifferi* (30,69 mg ек. Sah/g с.м.).

Висок садржај шећерних компоненти код EtOH екстраката може бити последица својства етанола да елиминише ниско-молекуларна једињења и одвоји полисахариде из ћелијског зида, што није случај типичан за друге типове екстракција (микроталасна, ултразвучна или комбинација и једне и друге) где долази до прекида у ћелијском зиду и смањеног садржаја полисахарида.

5. Закључак**Биолошка активност:*****In vitro* антиоксидантна активност**

Антиоксидантна активност EtOH и H₂O екстраката испитиваних врста одређена је мерењем њихове способности да неутралишу DPPH•, ABTS•+, OH•, O₂⁻ и NO• и способности редукционог потенцијала екстраката (FRAP и АЕАС тест).

Способност неутрализације DPPH• радикала: IC₅₀ вредности анализираних екстраката биле су у опсегу од 0,85 до 36,12 µg/mL. Поређењем EtOH и H₂O екстраката, може се закључити да су H₂O екстракти испољили бољу активност осим у случају *G. pfeifferi*. Најбољу активност је показао H₂O екстракт *G. applanatum*, док је најслабију активност испољио H₂O екстракт *G. pfeifferi*.

Способност неутрализације ABTS•+ радикала: вредности испитиваних екстраката су се кретале у опсегу од 16,34 до 159,84 mg ек. T/g с.м. Поређењем EtOH и H₂O екстраката, долази се до закључка да су EtOH екстракти испољили бољу активност осим у случају *G. pfeifferi*. Најбољи антиоксидантни потенцијал је одређен преко садржаја тролокса за EtOH екстракт врсте *G. applanatum*, а најслабији за H₂O екстракт *G. lucidum*.

Способност неутрализације OH• радикала: IC₅₀ вредности испитиваних екстраката су биле од 0,06 до 5,35 µg/mL. Поређењем EtOH и H₂O екстраката, боља активност је испољена код H₂O екстраката (*G. applanatum* и *G. lucidum*). Највећу активност је показао H₂O екстракт врсте *G. applanatum*, а најслабију EtOH екстракт врсте *G. lucidum*.

Способност неутрализације O₂⁻ радикала: IC₅₀ вредности анализираних екстраката су биле у опсегу од 0,44 до 65,71 µg/mL. Поређењем EtOH и H₂O екстраката, боља активност је испољена код H₂O екстраката код свих испитиваних врста. Највећу активност је испољио H₂O екстракт врсте *G. applanatum*, а најслабију EtOH екстракт врсте *G. pfeifferi*.

Способност неутрализације NO• радикала: Генерално је испољена слаба способност неутрализације наведене слободно-радикалске врсте. Јачу активност су испољили EtOH екстракти (са изузетком *G. pfeifferi*), где се издваја врста *G. applanatum*. Најслабију активност је испољена код H₂O екстракта врсте *G. resinaceum* (IC₂₅=830,81 µg/mL). Најјача способност за „хватање“ NO• радикала

5. Закључак

одређена је за екстракте врсте *G. applanatum* ($IC_{50}=128,12 \mu\text{g/mL}$ за EtOH, односно $IC_{50}=162,83 \mu\text{g/mL}$ за H₂O екстракт).

Редукциони потенцијал (FRAP и АЕАС тест): сви анализирани екстракти су показали висок редукциони потенцијал применом оба теста (првенствено FRAP теста).

FRAP тест: опсег за анализирани екстракте је био од 65,23 до 697,78 mg ек. АК/g с.м. Највећи редукциони потенцијал су имали H₂O екстракти (*G. lucidum*), са изузетком врсте *G. pfeifferi*, која је уједно и испољила најслабији редукциони потенцијал.

АЕАС тест: опсег резултата за анализирани екстракте је био од 34,43 до 143,09 mg ек. АК/g с.м. Највећи редукциони потенцијал су такође и код овог теста имали H₂O екстракти, са изузетком EtOH екстракта врсте *G. applanatum*, који је испољио и најјачи редукциони потенцијал (143,09 mg ек. АК/g с.м.).

За анализирани антиоксидантне тестове анализирана је регресиона анализа у циљу испитивања корелације садржаја фенолних једињења и антиоксидантне активности, где добијени високи корелациони фактори (R^2) указују на значај фенолних једињења као потенцијалних антиоксидантних агенаса за

способност „хватања“ DPPH, ABTS и NO радикала, као и FRAP редукционог потенцијала, што указује на то да при неутрализацији слободно радикалских врста, када се она одвија по механизму трансфера електрона тј. редукције, фенолна једињења имају кључну улогу.

***In vivo* антиоксидантна активност**

Експерименталним животињама је ињектован алоксан као изазивач *D. mellitus*-а, а потом су животиње третиране физиолошким раствором (контрола) и/или EtOH и H₂O екстрактима гљива *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*, те се приступило испитивању оштећења јетре праћењем параметара оксидативног стреса: липидна пероксидација (LPx), количина GSH и активност ензима (GSHPx, GSHR, Px, CAT, XOD).

5. Закључак

LPx: У поређењу са контролом, интензитет липидне пероксидације је статистички значајно смањен при третману са EtOH и H₂O екстрактима врста *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* (изузев код EtOH екстракта *G. pfeifferi*) (6,32 до 10,93 у односу на контролу 10,81 nmol малонилалдехида (MDA)/mg протеина), које се могу сматрати значајним антиоксидантним (протективним) агенсима са потенцијалом заштите мембранских липида од евентуалних оштећења узрокованих оксидативним стресом.

GSH: Само су третмани са EtOH екстрактом *G. pfeifferi* са алоксаном и третман алоксаном смањили садржај GSH у односу на контролу (103,63, односно 99,25 у односу на 124,30 nmol GSH/mg протеина) и с обзиром да је алоксан прооксидант, смањење садржаја GSH је један од одбрамбених механизма заштите организма од ROS-а.

GSHR: Само је EtOH екстракт *G. pfeifferi* са алоксаном у малој мери повећао активност ензима GSHR (6,25 у односу на 6,21 nmol/mg min протеина), док је активност овог ензима статистички значајно смањена при третману са преосталим EtOH и H₂O екстрактима *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*. EtOH екстракт *G. pfeifferi* уз додатак алоксана се може сматрати потетним антиоксидантом с обзиром да једини утиче на повећање активности овог ензима оксидативног стреса.

GSHPx: Добијени резултати анализираних екстраката указују на статистички значајно смањење активности GSHPx (са изузетком EtOH екстраката *G. pfeifferi*), а такође ни третман алоксаном није повећао активност GSHPx у односу на контролну групу (14,86 у односу на 21,11 nmol/mg min протеина). На основу добијених резултата, ниједан од анализираних екстраката се не издваја као потенцијални антиоксидант испољавајући повећање активности GSHPx.

Px: Активност ензима пероксидазе повећана је при третирању животиња са EtOH и H₂O екстрактима врсте *G. pfeifferi*, док је статистички значајно смањена активност ензима применом преосталих екстраката са изузетком EtOH екстракта *G. pfeifferi* уз додатак алоксана, у односу на контролу (10,14 у односу на 11,70).

Сва четири екстракта гљива у комбинацији са алоксаном (са изузетком EtOH екстракта *G. pfeifferi*) су утицала на активност Px, смањујући је, што може бити последица чињенице да фенолна једињења у реакцији коју катализује Px не

5. Закључак

доприносе активности или нису присутна у довољној концентрацији да би утицала на повећање ензимске активности.

CAT: Активност ензима каталазе није значајно промењена само код третмана EtOH и H₂O екстрактима *G. resinaceum*. Код примене преосталих 6 екстраката као и алоксана, статистички значајно је повећана активност CAT (86,22-132,54 у односу на 61,06 nmol/mg min протеина). С обзиром да је пораст активности ензима CAT знак антиоксидантне заштите, анализирани екстракти су у доста великој мери испољили протективни ефекат.

XOD: Активност ензима ксантин оксидазе је статистички значајно смањена само при третману са H₂O и EtOH екстрактима *G. pfeifferi*, док су остали екстракти обе врсте статистички значајно повећали активност ензима (са изузетком H₂O екстракта *G. pfeifferi* са алоксаном). Сви анализирани екстракти су уз примену алоксана повећали активност XOD у односу на контролну групу, што је показатељ недовољног протективног ефекта анализираних врста.

Високе вредности за XOD код *D. mellitus*-а изазваног претретманом алоксана код већине испитиваних екстраката указују на оксидативни стрес.

G. pfeifferi, EtOH: повећање активности GSHPx, повећање активности CAT, смањење активности XOD

G. pfeifferi, EtOH + алоксан: повећање садржаја ендогеног антиоксиданта GSH, повећање активности GSHR, повећање активности GSHPx, повећање активности CAT

G. pfeifferi, H₂O: смањење интензитета LPx, повећање активности GSHPx, повећање активности CAT, смањење активности XOD

G. pfeifferi, H₂O + алоксан: повећање активности CAT

G. resinaceum, EtOH: смањење интензитета LPx

G. resinaceum, EtOH + алоксан: /

G. resinaceum, H₂O: смањење интензитета LPx

G. resinaceum, H₂O + алоксан: /

5. Закључак

Антимикробна активност

У овом раду је анализирана антимикробна активност H_2O , EtOH и $CHCl_3$ екстраката гљива на референтне бактеријске културе, од којих су 4 Gram-позитивне, а 5 Gram-негативних.

Антибактеријска активност (Метода бунара и диск-дифузиона метода):

Највећу активност код H_2O екстраката у обе методе је испољио екстракт гљиве *G. pfeifferi* и то на *B. cereus*, *S. aureus* и *E. coli* чиме је испољена активност углавном на Gram + бактерије.

За разлику од H_2O , EtOH екстракти су показали значајно слабију активност, где је активност показао екстракт *G. resinaceum* на оба соја *S. aureus*.

За обе врсте екстраката је доказана боља ефикасност према Gram + бактеријама.

Код $CHCl_3$ екстраката *G. applanatum* и *G. resinaceum* су испољиле антибактеријску активност.

Углавном су неполарна једињења изразити антимикробни агенси, док се међу њима углавном терпеноидним једињењима приписује антимикробна активност, изузетак су ганомицини (фенолна једињења) из *G. pfeifferi*.

Антифунгална активност (Метода бунара, дискова и Pour Plate метода)

На основу добијених резултата долази се до закључка да се код анализираних екстраката може констатовати антифунгална активност, где се смањењем концентрација екстракта повећава пречник раста мицелије.

Најјача антифунгална активност за EtOH екстракте *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* добијена је у следећем низу: *C. albicans* > *S. cerevisiae* > *A. niger* у односу на контроле које су у опсегу вредности од 4-28 mm.

Антивирална активност:

Антивирална активност је анализирана на модел вирусу vB_BbrS_56.1 (фамилија *Siphoviridae*) за EtOH, H_2O и DMSO све четири врсте екстраката. Процент виралне инактивације за врсте *G. applanatum* и *G. lucidum* је најизраженији код DMSO екстраката (46,21, односно 70,73 %). Значајна активност EtOH и H_2O екстраката је испољена код врсте *G. resinaceum*.

На основу добијених резултата може се закључити да су испитивани екстракти врста рода *Ganoderma* показали знатан ефекат на инактивацију бактериофага. Ипак, чињеница је да би и екстракти, али и чисте, изоловане супстанце показале

5. Закључак

ефекат на мултипликацију вируса у анималне ћелије, што је и један од могућих начина њиховог деловања, а које није испитано у овом раду.

Антиинфламаторна активност

Антиинфламаторни потенцијал испитан је праћењем утицаја EtOH и CHCl₃ екстраката 4 испитиване врсте рода *Ganoderma* на продукцију метаболита арахидонске киселине COX-1 пута (12-ННТ, TXB₂ и PGE₂) и 12-LOX пута (12-НЕТЕ) метаболизма арахидонске киселине на узорку хуманих тромбоцита, LC-MS/MS техником. Већина анализираних екстраката је испољила концентрацијски-зависну инхибицију продукције 4 праћена метаболита метаболизма арахидонске киселине.

1-COX: За 1 од 4 анализирана CHCl₃ екстракта (*G. pfeifferi*) достигнута је IC₅₀ вредност при инхибицији продукције 12-ННТ метаболита, која је девет пута нижа од EtOH екстраката *G. applanatum* (0,70 mg/mL у односу на 7,51 mg/mL), што указује на далеко јачи антиинфламаторни потенцијал CHCl₃ екстракта.

CHCl₃ екстракти су показали донекле бољи потенцијал и инхибиције продукције TXB₂ метаболита у односу на EtOH екстракте. CHCl₃ екстракт *G. pfeifferi* је на основу постигнуте IC₅₀ вредности дупло јачи од EtOH *G. applanatum* (0,49±0,10 mg/mL). Добијени резултати указују на слабију активност EtOH у односу на CHCl₃ екстракте за инхибицију продукције TXB₂ метаболита. за које се сматра да су богати терпеноидним једињењима (ганодеричне киселине А, В, G и Н) за које се сматра да поседују антиинфламаторни потенцијал.

EtOH екстракти су испољили слабију активност при инхибицији продукције PGE₂ метаболита. Код CHCl₃ екстракта врсте *G. applanatum* је добијен проинфламаторни ефекат при нижим концентрацијама, а антиинфламаторни при вижим, што је пример синергистичког и адитивног дејства различитог спектра биолошки активних једињења (терпеноиди, полисахариди, фенолна једињења). Као најбољи инхибитор продукције PGE₂ метаболита издваја се CHCl₃ екстракт *G. lucidum* (1,10 mg/mL). 12-LOX: CHCl₃ екстракти су показали бољи потенцијал за инхибицију продукције 12- НЕТЕ метаболита у односу на поларније, EtOH екстракте. IC₅₀ вредности су постигнуте за 2 од 4 анализирана CHCl₃ екстракта (0,50 mg/mL за *G. resinaceum* и 1,77 mg/mL за *G. pfeifferi*).

5. Закључак

Генерално, као најпотентнији екстракти су се показали CHCl_3 екстракт врсте *G. pfeifferi* ($\text{IC}_{50}=0,49-1,90 \mu\text{g/mL}$) и EtOH екстракт *G. applanatum* ($\text{IC}_{50}=1,07-6,65 \mu\text{g/mL}$). С обзиром на способност инхибиције како 1-COX, тако и 12-LOX метаболита, може се претпоставити да је дошло и до инхибиције ензима фосфолипазе А.

CHCl_3 екстракти већине испитиваних врста су показали концентрацијску зависност при инхибицији продукције наведених метаболита али и јачи антиинфламаторни потенцијал. Добијени резултати указују на значај употребе *Ganoderma* врста, које до сада нису испитане методама као потенцијални антиинфламаторни агенси *ex vivo* методама. На основу претходних резултата, антиинфламаторна активност врста рода *Ganoderma* се приписује полисахаридима и тритерпеноидима, и с обзиром на испољену активност CHCl_3 екстраката, анализираним врстама се антиинфламаторна активност приписује тритерпенима (ганодеричне киселине А, В, Г и Н).

Антипролиферативна активност

У овом раду је испитана АПА активност EtOH и H_2O екстраката врста *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* на раст ћелијске линије MCF-7 (хумани аденокарцином дојке позитиван на естрогенске и прогестеронске рецепторе) МТТ тестом инкубацијом на 24h и 72h при различитим концентрацијама екстракта (од 0,33 до 1500 $\mu\text{g/mL}$, у зависности од врсте анализираног екстракта). У сврху поређења резултата, упоредно са екстрактима испитана су и стандардна једињења DMSO и елагна киселина.

Субакутна инкубација (24h): MCF-7 ћелије су биле најмање инхибиране деловањем EtOH и H_2O екстраката врсте *G. applanatum* (748,79, односно 968,30 $\mu\text{g/mL}$), док су најјачу активност испољили H_2O екстракти врста *G. lucidum* и *G. resinaceum* (2,44, односно 4,88 $\mu\text{g/mL}$), чија активност је била у рангу испољене активности за стандардна једињења (DMSO и елагна киселина).

Хронична инкубација (72h): издваја се АПА потенцијал EtOH екстраката врсте *G. lucidum* (33,79 $\mu\text{g/mL}$), а такође је као и код субакутне инкубације значајан потенцијал свих H_2O екстраката при чему је најзначајнији ефекат уочен за *G. lucidum* и *G. pfeifferi*.

5. Закључак

Уколико се пореде активности свих 8 анализираних екстраката, издваја се врста *G. pfeifferi* као најактивнија.

Поређењем IC₅₀ вредности EtOH и H₂O екстраката може се уочити да су екстракти показали подједнаку статистички значајну активност. Утврђена је статистички значајна, позитивна корелација, за испитиване екстракте са фенолним саставом, те се претпоставља да су фенолне компоненте потенцијални АПА агенси.

С обзиром да је третман MCF-7 ћелијске линије анализиран са непречишћеним екстрактима, претпоставља се да долази до међусобних интеракција различитих биомолекула присутних у испитиваним екстрактима који вероватно синергистички испољавају АПА активност, чиме су редуковани нежељени ефекти појединачних компоненти док интеракција између различитих биомолекула повећава терапетску активност „crude“ (непречишћен) екстраката.

Антидијабетогена активност

Експерименталне групе животиња су претретирани алоксаном, и потом EtOH и H₂O екстрактима врста *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* са циљем испитивања антидијабетогене активности анализираних екстраката.

Фармакодинамичка испитивања:

Алоксанским третманом је забележено да је само код H₂O екстракта врсте *G. resinaceum* одређено статистички значајано смањење нивоа шећера у крви.

Код оралног оптерећења глукозом, долази се до сазнања да је такође код експерименталних група третираних екстрактима *G. resinaceum* спречен хипергликемички ефекат додатком глукозе. Хистолошком анализом ткива панкреаса уочено је оштећење ткива код алоксанске групе које се манифестује недостатком β-ћелија Лангерхансових острваца панкреаса.

Биохемијска испитивања:

Липидни статус: Иако углавном нема статистички значајних резултата, при поређењу експерименталне групе која је третирана са физиолошким раствором и групе животиња третираних како са екстрактима, тако и група претретираних алоксаном не нарушава се у великој мери липидни статус, а код мерења

5. Закључак

појединих параметара (нпр. TGC, HDL) уочава се потенцијално протективни ефекат испитиваних екстраката.

Функција бубрега и јетре: Серумска концентрација креатинина и урее након примене EtOH и H₂O екстраката *G. resinaceum* уз претретман алоксаном, је статистички значајно смањена у односу на контролну алоксанску групу што указује на потенцијални нефропротективни ефекат екстраката *G. resinaceum*. Добијени резултати су потврђени хистолошким прегледом препарата бубрега где код наведених група нису уочене промене у бубрежном ткиву и у потпуности одговарају нормалном хистолошком налазу који се налази у контролној групи физиолошког раствора.

На основу добијених серумских концентрација AST-а, може се уочити да не постоји статистички значајан ефекат испитиваних екстраката гљива на овај јетрени параметар, док се потенцијално протективни ефекат запажа само код EtOH и H₂O екстраката *G. resinaceum* претретираних алоксаном.

Насупрот томе, у све четири експерименталне групе које су добијале *G. resinaceum* екстракте дошло је до статистички значајног смањења активности ALT-а у односу на експерименталну групу животиња која је добијала физиолошки раствор, те се долази до закључка да би се ова врста могла користити као хепатопротективни агенс. Према хистолошком налазу, хепатоцити су уобичајеног облика и грађе.

Сумарно, биопотенцијал анализираних врста рода *Ganoderma* на основу урађене хемијске карактеризације и тестова биолошке активности (антиоксидантна, антимикуробна, антиинфламаторна, антипролиферативна и антидијабетогена) упућује на могућност њихове потенцијалне употребе као нутрацеутика и медицинских суплемената, иако су неопходна додатна истраживања анализираних врста са неких других станишта, као и тестови токсичности пре њихове анализе у предклиничким испитивањима.

6.

ЛИТЕРАТУРА



6. Литература

- Abad**, M. J., Bermejo, P., Villar, A. (1995) The activity of flavonoids extracted from *Tanacetum microphyllum* DC. (Compositae) on soybean lipoxygenase and prostaglandin synthetase. *General Pharmacology*. 26: 815-819
- Abbas**, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. (2006) Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. 4. издање. *Elsevier Saunders*.
- Adams**, R. P. (2001) Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry. *Allured Publishing Corporation*. Illinois, USA
- Aharoni**, A., Jongsma, M. A., Kim, T.-Y., Ri, M.-B., Giri, A. P., Verstappen, F. W. A., Schwab, W., Bouwmeester, H. J. (2006) Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochemistry Reviews*. 5: 49-58
- Ai, H., Wang, F., Xia, Y., Chen, X., Lei, C. (2012) Antioxidant, antifungal and antiviral activities of chitosan from the larvae of housefly, *Musca domestica* L. *Food Chemistry*. 132: 493-498
- Akisha**, T., Tagata, M., Ukiya, M., Tokuda, H., Suzuki, T., Kimura, Y. (2005) Oxygenated Lanostane-Type Triterpenoids from Fungus *Ganoderma lucidum*. *Journal of Natural Products*. 68: 559-563
- Al-Fatimi**, M., Wurster, M., Kreisel, H., Lindequist, U. (2005) Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activity of selected basidiomycetes from Yemen. *Pharmazie*. 60: 776-780
- Allen**, R. C., Stjernholm, R. L., Steele, R. H. (1972) Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 47: 679-684
- Alves**, H. M., Ferreira, I. C. F. R., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., Pintado, M. (2012) A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Medica*. 78: 1707-1718
- Alves**, M. J., Ferreira, I. C. F. R., Froufe, H. J. C., 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: 346-357
- Alves**, M. J., Ferreira, I.C.F.R., Martins, A., Pintado, M. (2012) Antimicrobial activity of wild mushrooms extracts against clinical isolates resistant to different antibiotics. *Journal of Applied Microbiology*. 113: 466-475
- Amaral**, A. E., Carbonero, E. R., Simão, R. C. G., Kadowaki, M. K., Sasaki, G. L., Osaku, C. A., Gorin, P. A. J., Iacomini, M. (2008) An unusual water-soluble β -glucan from the basidiocarp of the fungus *Ganoderma resinaceum*. *Carbohydrate Polymers*. 72: 473-478
- An**, M., Gao, G. F., Qi, J., Li, F., Liu, X. (2010) Expression and crystallographic studies of fungal immunomodulatory protein LZ-8 from a medicinal fungus *Ganoderma lucidum*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 26: 1563-1568
- Andersson**, D. I., Levin, B. R. (1999) The biological cost of antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*. 2: 489-493
- Anderson**, E., Katunga L., Willis M. (2012) Mitochondria as a Source and Target of Lipid Peroxidation Products in Healthy and Diseased Heart. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 39: 1440-1681
- Andrae-Marobela**, K., Ghislain, F. W., Okatch, H., Majinda, R. R. T. (2013) Polyphenols: A diverse class of multi-target anti-HIV-1 agents. *Current Drug Metabolism*. 14: 392-413
- Angus**, J. A., Cocks, T. M. (1989) Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacology and Therapeutics*. 41: 303-351
- Arrigo**, A.-P., Paul, C., Ducasse, C., Manero, F., Kretz-Remy, C., Viroit, S., Javouhey, E., Mounier, N., Diaz-Latoud, C. (2002) Small stress proteins: Novel negative modulators of apoptosis induced independently of reactive oxygen species. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*. 28: 185-204
- Arnao**, M. B., Cano, A., Acosta, M. (2001) The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*. 73: 239-244
- Arora**, D. K. (2004) Handbook of Fungal Biotechnology. 2. издање. Marcel Dekker, Inc. New York. Basel.
- Asada**, K. (1977) Biochemical and medical aspects of active oxygen. *Japan Science Society Press*. 84: 45-52
- Ayaz**, F. A., Torun, H., Colak, A., Sesli, E., Millson, M., Grew, R. H. (2011) Macro- and microelement contents of fruiting bodies of wild-edible mushrooms growing in the East Black Sea Region of Turkey. *Food and Nutrition Sciences*. 2: 53-59
- Babior**, B. M., Lamberth, J. D., Nauseff, W. (2002) The neutrophil NADPH oxidase. *Archives of Biochemistry Biophysics*. 397: 342-344
- Baby**, S., Johnson, A. J., Govidan, B. (2015) Secondary metabolites from *Ganoderma*. *Phytochemistry*. 114: 66-101
- Balasundram**, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidants activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99: 191-203
- Baldrian**, P. (2003) Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 32: 78-91

6. Литература

- Baldrian, P.** (2008) Enzymes of Saprotrophic Basidiomycetes. 2. Поглавље. из Boddy, L., Frankland, J. C., Van West, P. (2008) Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes. 1. издање. *University of Aberdeen, UK*
- Baldrian, P.** (2008) Enzymes of Saprotrophic Basidiomycetes. 2. Поглавље. из Boddy, L., Frankland, J. C., Van West, P. (2008) Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes. 1. издање. *University of Aberdeen, UK*
- Balls, A. K., Hale, W. S., Harris, T. H.** (1942) A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chemistry*. 19: 279–288
- Bang, T. H., Suhara, H., Doi, K., Ishikawa, H., Fukami, K., Prasad Parajuli, G., Katakura, Y., Yamashita, S., Watanabe, K., Kumar Adhikari, M., Manandhar, H. K., Kondo, R., Shimizu, K.** (2014) Wild mushrooms in Nepal: Some potential candidates as antioxidant and ACE-inhibition sources. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014. Article ID 195305. 11 pages. <http://dx.doi.org/10.1155.2014.195305>
- Bano, Z.** (1993) Food value of mushrooms. *Gram Pradyogiki*. 3: 224-225
- Bano, S.** (2007) Chemistry of Natural Products. Terpenoids. Department of Chemistry. Faculty of Science. New Delhi. 1-21
- Bano, Z., Rajarathnam, S.** (1988) Pleurotus mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 27: 87-158
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Morais, J. S., Ferreira, I. C. F. R.** (2007) 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: 4781-4788
- Barros, L., Ferreira, M-J, Queiros, B., Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P.** (2007) Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 103: 413-419
- Batista, O., Duarte, A., Nascimento, J., Simones, M. F.** (1994) Structure and antimicrobial activity of diterpenes from the roots of *Plectranthus hereroensis*. *Journal of Natural Products*. 57: 858–861
- Beara, I. N., Lesjak, M. M., Četojević-Simin, D. D., Marjanović, Ž. S., Ristić, J. D., Mrkonjić, Z. O., Mimica-Dukić, N. M.** (2014) Phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of black (*Tuber aestivum* Vittad.) and white (*Tuber magnatum* Pico) truffles. *Food Chemistry*. 165: 460-466
- Beara, I., Orčić, D., Lesjak, M., Mimica-Dukić, N., Peković, B., Popović, M.** (2010) Liquid chromatography/tandem mass spectrometry study of anti-inflammatory activity of Plantain (*Plantago* L.) species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 52: 701 – 706
- Beara, I.** (2010) Fitohemijski skrining i procena antioksidantnog i antiinflamatornog potencijala sekundarnih biomolekula u vrstama roda *Plantago* L. Doktorska disertacija. Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
- Beauchamp, C., Fridovich, I.** (1970) A mechanism for the production of ethylene from methional. *The Journal of Biological Chemistry*. 245: 4641-4646
- Beers, R. F. J., Sizer, J. W.** (1950) Spectrophotometric method for measuring of breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*. 195: 133-140
- Bendich, A., Chandra, R. K.** (1990) Antioxidant Micronutrients and Immune Responses. Micronutrients and Immune Functions. New York Academy of Sciences. New York. pp. 175.
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J.** (1999) Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid and concentration. *Methods Enzymology*. 299: 15-17
- Berghe, A. D., Vlietnick, A. J.** (1991) Screening Methods for Antimicrobial and Antiviral Agents from Higher Plants. *Methods in Plant Biochemistry*. 6: 47-69
- Bergmeyer, U. H.** (1974) In: Methods of Enzymatic Analysis. New York: Academic Press Inc., Verlag Chemie. 521-522
- Bhosle, S., Ranadive, K., Bapat, G., Garad, S., Deshpande, G., Vaidya, J.** (2010) Taxonomy and Diversity of *Ganoderma* from the Western parts of Maharashtra (India). *Mycosphere*. 1: 249-262
- Blackwell, M.** (2010) Fungal evolution and taxonomy. *Journal of the International Organisation for Biological Control*. 55: 7-16
- Blackwell, M.** (2011) The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*. 98: 426-438
- Blagojević, M.** (2013) Antibakterijska aktivnost ekstraktata gljiva roda *Ganoderma*, *Stereum* i *Coriolus*. Master rad. Departman za biologiju i ekologiju. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

6. Литература

- Bobek, P., Galbavy, S.** (1999) Hypocholesterolemic and Antiatherogenic Effect of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in Rabbit. *Nahrung*. 43: 339-342
- Boddy, L., Frankland, J. C., Van West, P.** (2008) Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes. 1. Издање. The British Mycological Society. *Published by Elsevier Ltd.*
- Bogdanović, G., Raletić-Savić, J., Marković, N.** (1994) In vitro assays for antitumor-drug screening on human tumor cell lines: dye exclusion test and colorimetric cytotoxicity assay. *Onkološki arhiv*. 2: 181-184
- Boh, B., Berovič, M., Zhang, J., Zhi-Bin, L.** (2007) *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnology Annual Review*. 13: 265-301
- Boh, B., Hodžar, D., Dolničar, D., Berovič, M., Pohleven, F.** (2000) Isolation and quantification of triterpenoid acids from *Ganoderma applanatum* of Istrian Origin. *Food Technology and Biotechnology*. 38: 11-18
- Borchers, A. T., Stern, J. S., Hackman, R. M., Keen, C. L., Gershwin, M. E.** (1999) Minireview: Mushrooms, tumors and immunity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 221: 281-293
- Borovička, J., Řanda, Z., Jelínek, E.** (2006) Antimony content of macrofungi from clean and polluted areas. *Chemosphere*. 64: 1837-1844
- Boumendjel, A., Pietro, A. D., Dumontet, C., Barron, D.** (2002) Recent advances in the discovery of flavonoids and analogs with high-affinity binding to P-glycoprotein responsible for cancer cell multidrug resistance. *Medicinal Research Reviews*. 22: 512-529
- Bowcock, A. M.** (1999) Breast cancer: Molecular genetics, Pathogenesis and Therapeutics. Totowa. Humana Press Inc.
- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Chemistry*. 72: 248-254
- Brandt, C. R., Piraino, F.** (2000) Mushroom antivirals. *Recent Research and Development of Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 4: 11-26
- Brantner, A., Males, Z., Papeljnjak, S., Antolic, A.** (1996) Antimicrobial activity of *Paliurus spina-christi* mill. *Journal of Ethnopharmacology*. 52: 119-122
- Buege, A. L., Aust, D. S.** (1978) Microsomal lipid peroxidation. In: Fleisher, S., Parker, L. (eds.): *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press. 306-310
- Bray, R. C., Meriwether, L.S.** (1966) Electron spin resonance of xanthine oxidase substituted with molybdenum-95. *Nature*. 212: 467-469
- Candenas, E., Davies, K. J.** (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 29: 222-230
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L.** (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*. 29: 749-760
- Čapo, I.** (2013) Uticaj gljive *Coprinus comatus* na regeneratorna svojstva Langerhansovih ostrvaca u aloksanskom dijabetesu kod pacova. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet
- Carlson, K.** (2005) Working with bacteriophages: common techniques and methodological approaches. V: Kutter, E., Sulakvelidze, A. (ur.), *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press. Boca Raton. Florida.
- Carr, A. C., Frei, B.** (1999) Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 69: 1086-1107
- Carr, A. C., Zhu, B-Z., Frei, B.** (2000) Potential Antiatherogenic Mechanisms of Ascorbate (Vitamin C) and α -Tocopherol (Vitamin E). *Circulation Research*. 87: 349-354
- Carretero-Paulet, L., Ahumada, I., Cunillera, N., Rodriguez-Concepcion, M., Ferrer, A., Boronat, A., Campos, N.** (2002) Expression and molecular analysis of the Arabidopsis DXR gene encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-c-methyl-d-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Physiology*. 129: 1581-1591
- Cathcart, M. K.** (2004) Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 24: 23-28
- Čeković, Ž.** (2000) Jedan vek hemije slobodnih radikala 1900-2000. *Hemijski pregled*. 1: 4-12
- Chai, H., Wang, F., Zhang, Z., Yang, J., Zhang, Y.** (1997) Constituents from the fruiting body of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi (Chinese Journal of Materials in Medicine)*. 22: 552-553
- Chang, H. C.** (1999) Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Plant Sciences*. 18: 609-636

6. Литература

- Chang, S. T., Miles, P. G.** (2004) Mushrooms-Cultivation, Nutritional value, Medicinal Effect and Environmental impact. Друго издање. *CRC press*. p. 451
- Chang, M. Y., Tsai, G. J., Houng, J. Y.** (2006) Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 407-414
- 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: 178-182
- Cheeseman, K. H., Beavis, A., Esterbauer, H.** (1998) Hydroxyl-radical induced iron catalysed degradation of 2-deoxyribose quantitative determination of malondialdehyde. *Biochemical Journal*. 252: 649-653
- Cheeseman, K. H., Slater, T. F.** (1993) An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*. 49: 481-493
- Chen, A. W.** (2001) Cultivation of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. Reishi in North America. *Mushroom World*. 1-9
- Chen, D.-H., Chen, W. K.-D.** (2003) Determination of ganoderic acids in triterpenoid constituents of *Ganoderma tsugae*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 11: 195-201
- Chen, S., Oh, S. R., Phung, S., Hur, G., Ye, I. J., Kwok, S. L., Shrode, G. E., Belury, M., Adams, L. S., Williams, D.** (2006) Anti-aromatase activity of phytochemicals in White Button Mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Cancer Research*. 66: 12026-12034
- Chen, J., Seviour, R.** (2007) Medicinal importance of fungal - (1→3), (1→4) - glucans. *Mycological research*. 3: 635-652
- Chen, Y., Xie, M.-Y., Nie, S.-P., Li, C., Wang, Y.-X.** (2008) Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. *Food Chemistry*. 107: 231-241
- Chen, C. F., Yang, X. T., Li, X. Q., Mi, K., Yang, Q. Y.** (2007) A comparison study on the physical/chemical properties and immunomodulatory activities of mycelial polysaccharide extracts from five *Ganoderma* species. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 4: 628-633
- Cheng, C.-R., Li, Y.-F., Xu, P.-P., Feng, R.-H., Yang, M., Guan, S.-H., Guo, D.-A.** (2012) Preparative isolation of triterpenoids from *Ganoderma lucidum* by counter-current chromatography combined with pH-zone-refining. *Food Chemistry*. 130: 1010-1016
- Cheng, C.-R., Yue, Q.-X., Wu, Z.-Y., Song, X.-Y., Tao, S.-J., Wu, X.-H., Xu, P.-P., Liu, X., Guan, S.-H., Guo, D.-A.** (2010) Cytotoxic triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*. 71: 1579-1585
- Cheng, P.-G., Phan, C.-W., Sabaratnam, V., Abdulla, N., Abdulla, M. A., Kuppusamy, U. R.** (2013) Polysaccharides-rich extract of *Ganoderma lucidum* (M.A. Curtis:Fr.) P. Karst accelerates wound healing in Streptozocin-induced diabetic rats. *Hindawi Publishing Corporation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013: 9 pages
- Cheung, C. K.** (2013) Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: preparation and health benefits. *Food Science and Human Wellness*. 2: 162-166
- Chew, B. P., Park, J. S.** (2004) Carotenoid action on the immune response. *The Journal of nutrition*. 134: 2575-2615
- Chin, P. T. Y., Stults, F. H., Tappel, A. L.** (1976) Purification of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochemistry and Biophysical Acta*. 445: 558-660
- Chittaragi, A., Naika, R.** (2014) Determination of trace elements on some wild mushroom samples encountered from Western ghats of Karnataka. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 6: 2124-2135
- Choi, J.-G., Kang, O.-H., Brice, O.-O., Lee, Y.-S., Chae, H.-S., Oh, Y.-C., Sohn, D.-H., Park, H., Choi, H.-G., Kim, S.-G., Shin, D.-W., Kwon, D.-Y.** (2010) Antibacterial activity of *Ecklonia cava* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. 7: 435-441. doi: 10.1089/fpd.2009.0434.
- Clericuzio, M., Mella, M., Toma, L., Vita Finzi, P., Vidari, G.** (2002) Atlanticones, new protoilludane sesquiterpenes from the mushroom *Lactarius atlanticus* (Basidiomycetes). *European Journal of Organic Chemistry*. 6: 988-994
- Cohen, G., Heikkila, R. E., MacNamee, D.** (1974) The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *The Journal of Biological Chemistry*. 249: 2447-245
- Cole, R. J., Schweikert, M. A.** (2003) Handbook of Secondary Fungal Metabolites, Vol. II, Academic Press, San Diego. 816 pp
- Conforti, F., Menichini, F., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Arnold-Apostolides, N. A., Piazzi, F.** (2009) Comparative chemical composition, free radical-scavenging and cytotoxic properties of essential oils of six *Stachys* species from different regions of the Mediterranean Area. *Food Chemistry*. 116: 898-905
- Corner, E. J. H.** (1932) A *Fomes* with two systems of hyphae. *Transactions of the British Mycological Society*. 17: 51-81
- Corner, E. J. H.** (1966) Monograph of cantharelloid fungi. *Annals of Botany*. 2: 1-255

6. Литература

- Cowan**, M. M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 564-582
- Craig**, R. L., Levetin, E. (2000) Multi-year study of *Ganoderma* aerobiology. *Aerobiologia*. 16: 75-81
- Cunningham**, G. H. (1954-1955) Taxonomic problems of some Hymenomycetes. *Transactions and Proceedings of the Royal Society of New Zealand*. 82: 893-896
- Curtis-Prior**, P. (2004) The Eicosanoids. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- Daniewski**, W. M., Vidari, G. (1999) Constituents of Lactarius (Mushrooms), in the series: Progress in the chemistry of organic natural products (Eds.: W. Herz, H. Falk, G. W. Kirby, R. E. Moore, Ch. Tamm), *Springer-Verlag, Wien, New York*. 77: 69-171
- Davidović**, M. (2007) Gljive- blago naših krajeva. Beograd. *Metaphysica*.
- Davin**, L. B., Lewis, N. G. (2005) Lignin primary structures and dirigent sites. *Current Opinion in Biotechnology*. 16: 407-415
- De Gara**, L., De Pinto, M. C., Tommasi, F. (2003) The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41: 868-870
- De Silva**, D. D., Rapior, S., Hyde, K. D., Bahkali, A. H. (2012) Medicinal mushrooms in prevention and control of *diabetes mellitus*. *Fungal Diversity*. 56: 1-29
- De Silva**, E. D., Van der Sar, S. A., Santha, R. G. L., Wijesundera, R. L. C., Cole, A. L. J., Blunt, J. W., Munro, M. H. G. (2006) Lanostane triterpenoids from the Sri Lankan Basidiomycete *Ganoderma applanatum*. *Journal of Natural Products*. 69: 1245-1248
- Deacon**, J. (2006) Fungal biology. 4. издање. Blackwell Publishing Limited.
- Deepalakshmi**, K., Mirunalini, S., Krishnaveni, M., Arulmozhi, V. (2013) *In vitro* and *in vivo* antioxidant potentials of an ethanolic extract of *Ganoderma lucidum* in rat mammary carcinogenesis. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 11: 0621-0627
- Deng**, J.S., Chi, C.S., Huang, S.S., Shie, P.H., Lin, T.H., Huang, G.J. (2011) Antioxidant analgesic, and anti-inflammatory activities of the ethanolic extracts of *Taxillus liquidambaricola*. *Journal of Ethnopharmacology*. 137: 1161-1171
- Deponte**, M. (2013) Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1830: 3217-3266
- Desco**, M. C., Asensi, M., Marquez, R., Martinez-Valls, J. (2002) Xantine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: Protection by Allopurinol. *Life Extension Found*. 1: 1-6
- Dexter**, E. A. (1997) Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition Reviews*. 55: 396-398
- Deyrup**, S., Gloer, J., O'Donnel, K., Wickloe, D. (2007) Triterpenoid glycosides from a Hawaiian isolate of *Xylaria* sp. *American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy. Published on Web*.
- Diaz**, M. N., Frei, B., Vita, J. A., Keaney, J. F. (1997) Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *The New England Journal of Medicine*. 337: 408-416
- Diaz**, P., Jeong, S. C., Lee, S., Khoo, C., Koyyalamudi, S. R. (2012) Antioxidant and anti-inflammatory activities os selected medicinal plants and fungi containing phenolic and flavonoid compounds. *Journal of Chinese Medicine*. 7: 26
- Dill**, I., Kraepelin, G. (1986) Palo Podrigo: Model for extensive delignification of wood by *Ganoderma applanatum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 52: 1305-1312
- Dix**, J. N., Webster J. (1995) Fungal ecology. London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.
- Đorđević**, V. B., Pavlović, D. D., Kocić, G. M. (2000) Biohemija slobodnih radikala. Sirius Print. Medicinski fakultet u Nišu
- Duan**, J., Kasper, D. L. (2011) Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. *Glycobiology*. 21: 401-409
- Dudhgaonkar**, S., Thyagarajan, A., Sliva, D. (2009) Suppression of the inflammatory response by triterpenes isolated from the mushroom *Ganoderma lucidum*. *International Immunopharmacology*. 9: 1272-1280
- Duke**, J. A. (1985) Handbook of medicinal herbs. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Duraković**, S., Duraković, L. (2003) Mikologija u biotehnologiji. Kugler – (Manualia Universitatis studiorum Zagrabienis – Udžbenici sveučilišta u Zagrebu), Zagreb. 434. crp.
- Duran**, N. (1982) Singlet oxygen in biological processes, in chemical and biochemical generation of excited states. New York: Academic Press. 345

6. Литература

- Eastwood, M. A.** (1999) Interaction of dietary antioxidants in vivo: how fruit and vegetables prevent disease? *QJM: An International Journal of Medicine*. 92: 527-530
- Ede, S. O., Olaniru, E., Otimenyin, S., Aguiyi, J. C., Ekwere, E. O.** (2012) Analgesic and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract of the mushroom *Ganoderma applanatum*. *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences*. 13: 349-352
- Ekwall, B.** (1981) Preliminary studies on the validity of in vitro measurement of drug toxicity using *HeLa cells*: IV. Therapeutic effect of 50 drugs related to the *HeLa* toxicity of the therapeutic concentrations. *Toxicology Letters*. 7: 359-366
- Ekwall, B., Silano, V., Paganuzzi-Stammati, A., Zucco, F.** (1990) Toxicity tests with mammalian cell culture, in Bourdeau, P., Somers, E., Richardson, G. M., Hickman, J. R. Short term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects. New York: John Wiley and Sons. Inc. 75-78
- Eliassen, A. H., Hendrickson, S. J., Brinton, L. A., Buring, J. E., Campos, H., Dai, Q., Dorgan, J. F., Franke, A. A., Gao, Y-t., Goodman, M. T., Hallmans, G., Helzlsouer, K. J., Hoffman-Bolton, J., Hulten, K., Sesso, H. D. Sowell, A. L., Tamimi, R. M., Toniolo, P., Wilkens, L. R., Winkvist, A., Zeleniuch-Jacquotte, A., Zheng, W., Hankinson, S. E.** (2012) Circulating carotenoids and risk of breast cancer: pooled analysis of eight prospective studies. *JNCI Oxford Journals. Journal of the national cancer institute*. 104: 1905-1916
- Elsayed, A. E., Enshasy, H. E., Wadaan, M. A. M., Aziz, R.** (2014) Mushrooms: Potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications. Hindawi Publishing Corporation. *Mediators of Inflammation*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/805841>. 15.pages
- Elstner, E. F.** (1982) Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annual Review of Plant Physiology*. 33: 73-96
- Eo, S. K., Kim, Y. S., Lee, C. K., Han, S. S.** (1999) Antiviral activities of various water and methanol soluble substances isolated from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 68: 129-136
- Eo, S. K., Kim, Y. S., Lee, C. K., Han, S. S.** (2000) Possible mode of antiviral activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* on herpes simplex viruses. *Journal of Ethnopharmacology*. 72: 475-481
- Espin, C. J., Soler-Rivas, G., Wichers, J. H.** (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: 648-656
- Etuk, E. U.** (2010) Animals models for studying *diabetes mellitus*. *Agriculture and Biology Journal of North America*. 1: 130-134
- Falandysz, J., Borovička, J.** (2012) Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: health benefits and risks. *Appl Microbiol Bi*
- Falandysz, J., Szymczyk, K., Ichihashi, H., Bielawski, L., Gucia, M., Frankowska, A., Yamasaki, S.** (2001) ICP/MS and ICP/AES elemental analysis (38 elements) of edible wild mushrooms growing in Poland. *Food Additives and Contaminants*. 18: 503-513
- Fan, J. M., Zhang, J. S., Tang, Q. J., Liu, Y. F., Zhang, A. Q., Pan, Y. J.** (2006) Structural elucidation of a neutral fucogalactan from the mycelium of *Coprinus comatus*. *Carbohydrate Research*. 341: 1130-1134
- Fan, L., Li, J., Deng, K., Ai, L.** (2012) Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*. 87: 1849-1854
- Fatmawati, S., Shimizu, K., Kondo, R.** (2011) Ganoderol B: A potent α -glucosidase inhibitor isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. *Phytomedicine*. 18: 1053-1055
- Fenoll, L. G., Rodriguez-Lopez, J. N., Garcia-Sevilla, F., Tudela, J., Garcia-Ruiz, P. A., Varon, R. et al.** (2000) Oxidation by mushroom tyrosinase of monophenols generating slightly unstable *o*-quinones. *European Journal of Biochemistry*. 267: 5865-5878
- Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Abreu, R. M.** (2009) Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*. 16: 1543-1560
- Ferreira, I. C. F. R., Heleno, S. A., Reis, F. S., Stojkovic, D., Queiroz, M. J. R. P., Vasconcelos, M. H., Sokovic, M.** (2015) Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. *Phytochemistry*. 114: 38-55
- Findlay, W. P. K.** (1982) *Fungi: folklore, fiction, and fact*. The Mad River Press. Eureka
- Flood, J., Bridge, P. D., Holderness, M.** (2000) *Ganoderma* diseases of perennial crops. CABI Publishing. USA.
- Fontes Vieira, P. A., Gontijo, D. C., Vieira, B. C., Fontes, E. A. F., Soares de Assuncao, L., Leite, J. P. V., Goret de A. Oliveira, M., Kasuya, M. C. M.** (2013) Antioxidant activities, total phenolics and metal contents in *Pleurotus ostreatus* mushrooms enriched with iron, zinc or lithium. *LWT - Food Science and Technology*. 54: 421-425
- Forstermann, U., Closs, E. I., Pollock, J. S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., Kleinert, H.** (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*. 23: 112-131
- Fotakis, G., Timbarell, J. A.** (2006) In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*. 160: 171-177
- Fridovich, I.** (1975) Superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*. 44: 147-159

6. Литература

- Fridovich, I.** (1986) Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology*. 58: 62-97
- Gallagher, A. M., Flatt, P. R., Duffy, G., Abdel-Wahab, Y. H. A.** (2003) The effects of traditional antidiabetic plants on in vitro glucose diffusion. *Nutrition Research*. 23: 413-424
- Gallie, D. R.** (2012) The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *Journal of Experimental Botany*. 64: 433-443
- Gao, Y., Chan, E., Zhou, S.** (2004) Immunomodulating activities of *Ganoderma*, a mushroom with medicinal properties. *Food Reviews International*. 20: 123-161
- Gao, Y., Dai, X., Chen, G., Ye, J., Zhou, S.** (2003) A randomized, placebo-controlled, multicenter study of *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) Lloyd (Aphylloromycetidae) polysaccharides (Ganopoly R) in patients with advanced lung cancer. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 5: 369-381
- Gao, Y., Zhou, S., Huang, M., Xu, A.** (2003) Antibacterial and antiviral value of the genus *Ganoderma*. *International Journal Of Medicinal Mushrooms*. 3: 235-296
- Garcia-Lafuente, A., Guillamon, E., Villares, A., Rostagno, M. A., Martinez, J. A.** (2009) Flonoids as anty-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*. 58: 537-552
- Geleijnse, J. M., Launer, L. J., Hofman, A., Pols, H. A. P., Witteman, J. C. M.** (1999) Tea flavonoids may protect against atherosclerosis. *Archives of Internal Medicine*. 159: 2170-2174
- Giovaninni, I. S.** (2006) Cultivated Basidiomycetee as source of new products: - *in vitro* cultivation development, - selection of resistant to *Trichoderma viride*,- search for new active compounds, - factor influencing plasticity in *Grifola frondosa*. Universite de Neuchatel, Faculte des Sciences
- Glatzle, D., Vuillenmir, Y. P., Weber, F., Decker, K.** (1974) Glutathione reductase test with whole blood-a convenient procedure for the assesment of the riboflavine status in humans. *Experientia*. 30: 565-638
- Gloer, J. B.** (1995) The Chemistry of Fungal Antagonism and Defence. *Canadian Journal of Botany*. 73: S1265-S1274
- Gomberg, M.** (1900) *Journal of American Chemical Society*. 22: 757; *Chemische Berichte*. 33: 31-50
- Gomes Castro, A. J., Will Castro, L. S. E. P., Nascimento Santos, M. S., Faustino, M. G. C., Pinheiro, T. S., Guerra Dore, C. M. P., Baseia, I. G., Leite, E. L.** (2013) Anti-inflammatory, anti-angiogenic and antioxidant activities of polysaccharide-rich extract from fungi *Caripia montagnei*. *Biomedicine and Preventive Nutrition*. 4: 121-129
- Gornall, H. G., Nardwall, C. L.** (1949) Estimation of total protein in tissue homogenate. *The Journal of Biological Chemistry*. 177: 751-756
- Goto, T., Takahashi, N., Hirai, S., Kawada, T.** (2010) Various terpenoids derived from herbal and dietary plants function as PPAR modulators and regulate carbohydrate and lipid metabolism. *PPAR Research*. 2010: 9 pp.
- Gottlieb, A. M., Wright, J. E.** (1999) Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Ganoderma*. *Mycology Research*. 6: 661-673
- Gowrie, U. S., Chathurdevi, G., Rani, K.** (2014) Evaluation of Bioactive Potential of Basidiocarp Extracts of *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Pharmaceutical Research and Allied Sciences*. 3: 36-46
- Grover, A. K., Samson, S. E.** (2014) Antioxidants and vision health: Facts and fiction. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 388: 173-183
- Green, C. E., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R.** (1982) Analysis of nitrate, nitrite and nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry Journal*. 243: 709-714
- Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S., Teran, L. M.** (2010) Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and diseases. *Clinical Immunology*. 135: 1-11
- Guardia, T., Rotelli, A. E., Osvaldo, A.** (2001) Anti inflammatory properties of plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rats. *Il farmaco*. 56: 683-687
- Gupta, S., Mal, M.** (2005) Evaluation of hyperglycemia potential of *S. xanthocarpum* fruit in normal and streptozin induced diabetic rats. *European Bulletin of Drug Research*. 13: 51-55
- Hadad, N., Levy, R.** (2012) Anti-inflammatory effect of *Lycium* fruit water extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 53: 1381-1391
- Halliwell, B.** (1984) Chloroplast Metabolism. Oxford University Press. New York. 160-162

6. Литература

- Halliwell, B.** (2001) Free radicals and other reactive species in Disease. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group. London. 1-7
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., Aruoma, O. I.** (1987) The deoxyribose method: A simple test tube assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radical. *Analytical Biochemistry*. 165: 215-219
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M.** (1989) Free radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press. Oxford UK.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M.** (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Letters*. 1992 Jul 27. 307: 108-112
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M.** (2008) Free radicals in Biology and Medicine. 4 издање. Oxford. University press Inc. US
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C.** (2007) Free radicals in Biology and Medicine. 4. издање. Oxford. University Press.
- Hammel, K. E., Kapich, A. N., Jensen, K. A., Ryan, Z. C.** (2002) Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 445-453
- Han, M. D., Han, Y. S., Hyun, S. H., Shin, H. W.** (2008) Solubilization of water β -glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Environmental Biology*. 29: 237-242
- Harborne, J. B.** (1989) Plant phenolics. In: Dey, P.M., Harborne, J.B. (eds.): Methods in Plant Biochemistry. London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press. 493-508
- Harhaji, Lj., Mijatović, S. Maksimović-Ivanić, D.** (2008) Anti-tumor effect of *Coriolous versicolor* methanol extract against mouse B16 melanoma cells: *In vitro* and *in vivo* study. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 1825-1833
- Hart, L., McGartoll, M., Chapman, H., Bray, R.** (1970) The composition of milk xantine oxidase. *Biochemical Journal*. 116: 851
- Hasnat, M. A., Pervin, M., Min Cha, K., Kim, S. K., Lim, B. O.** (2015) Anti-inflammatory activity on mice of extract of *Ganoderma lucidum* grown on rice via modulation of MAPK and NF- κ B pathways. *Phytochemistry*. 114: 125-136
- Havsteen, B. H.** (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*. 96: 67-202
- Hawksworth, D. L.** (1991) The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*. 95: 641-655
- Health Canada, 1998. Policy paper – nutraceuticals/functional foods and health claims on foods. 2014. Health Canada, Canada. <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/label-etiquet/claims-reclam/nutra-funct_foods-nutra-fonct_aliment-eng.php> Accessed 23 January 2014.
- Hecker, M., Ulrich, V.** (1989) On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A2 biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 264: 141-150
- Heleno, S. A., Barros, L., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R.** (2012) Frutining 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: 135-140
- Heleno, S. A., Barros, L., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R.** (2012) Phenolic, Polysaccharidic, and Lipidic Fractions of Mushrooms from Northeastern Portugal: Chemical Compounds with Antioxidant Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60: 4634-4640
- Heleno, S. A., Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Esteves, A. P., Queiroz, M. J. R. P.** (2014) Cytotoxicity of *Coprinopsis atramentaria* extract, organic acids and their synthesized methylated and glucuronate derivatives. *Food Research International*, 55: 170-175
- Herzenberg, L. A., De Rosa, S. C., Dubs, J. G., Roederer, M., Anderson, M. T., Ela, S. W., Deresinski, S. C., Herzenberg, L. A.** (1997) Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease. *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*. 94: 1967-1972
- Hibbett, D. M., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lucking, R., Lumbsch, H. T., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y. C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Koljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K. H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J. M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schuessler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y. J., Zhang, N.** (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. 111: 509-547
- Hille, R.** (2006) Structure and function of xantine oxidoreductase. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 1913-1926
- Hippeli, S., Elstner, E. F.** (1997) OH-Radical type reactive oxygen species: A short review on the mechanisms of OH-radical and peroxyxynitrite toxicity. *Naturforsch*. 52: 555-563

6. Литература

- Hoang-Minh**, T., Lai Le, T., Kasbohm, J., Giere, R. (2011) Substituting non-natural agents in UV-protection cream by a mixture of clay with *Ganoderma pfeifferi* extract. *Applied Clay Science*. 53: 66-72
- Hobbs**, C. (2002) Medicinal Mushrooms: An Exploration of Tradition, Healing, & Culture. Botanica Press
- Hong**, S. A., Kim, K., Nam, S. J., Kong, G., Kim, M. K. (2008) A case-control study on the dietary intake of mushrooms and breast cancer risk among Korean women. *International Journal of Cancer*. 122: 919-923
- Hong**, S. G., Jung, H. S. (2004) Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondrial small-subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia*. 96: 742-755
- Hood**, I. A. (2006) The mycology of the Basidiomycetes. y Potter, K., Rimbawanto, A., Beadle, C. (2006) Heart rot and root rot in tropical Acacia plantations. Proceedings of a workshop held in Yogyakarta, Indonesia, 7-9 February 2006. Canberra, ACIAR Proceedings No. 124
- Hosoya**, M., Balzarini, J., Shigeta, S., De Clercq, E. (1991) Differential inhibitory effects of sulfated polysaccharides and polymer on the replication of various myxoviruses and retroviruses, depending on the composition of the target amino acid sequences of the viral envelop glycoproteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35: 2515-2520
- Hseu**, Y.-C., Chang, W.-C., Hseu, Y.-T., Lee, C.-Y., Yech, Y.-J., Chen, P.-C., Chen, J.-Y., Yang, H.-L. (2002) Protection of oxidative damage by aqueous extract from *Anrodia camphorata* mycelia in normal human erythrocytes. *Life Sciences*. 71: 469-482
- Hsin**, I. L., Ou, C. C., Jan, M. S., Wu, M. F., Chiu, L. Y., Lue, K. H., Ko, J. L. (2011) GMI, an immunomodulatory protein from *Ganoderma microsporum*, induces autophagy in non-small cell lung cancer cells. *Autophagy*. 7: 873-882
- Huie**, C. W., Di, X. (2004) Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. *Journal of Chromatographi B*. 812: 241-257
- Hung**, P. V., Nhi, N. N. Y. (2012) Nutritional composition and antioxidant capacity of several edible mushrooms grown in the Southern Vietnam. *International Food Research Journal*. 19: 611-615
- Hunt**, J. V., Bottoms, M. A. Mitchinson, M. J. (1992) Ascorbic acid oxidation: A potential cause of the elevated severity of atherosclerosis in *diabetes mellitus*? *FEBS Letters*. 311: 161-164
- 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: 602-605
- Inkster**, M. E., Cotter, M. A., Cameron, N. E. (2007) Treatment with the xanthine oxidase inhibitor, allopurinol, improves nerve and vascular function in diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*. 561: 63-71
- Inouye**, A., Kodama, N., Nanba, H. (2002) Effect of Maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the control of the T-lymph node Th-1/Th-2 proportion. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 25: 536-540
- Inouye**, S., Abe, S., Yamaguchi, H. (2004) Fungal terpenoid Antibiotics and Enzyme Inhibitors. Mycology Series, Handbook of Fungal Biotechnology (2nd Edition), New York. 20: 379-399
- 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: 206-210
- Ito**, A., Shamon, L. A., Yu, B., Mata-Greenwood, E., Lee, S. K., van Breemen, R. B., Mehta, R. G., Farnsworth, N. R., Fong, H. H. S., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D. (1998) Antimutagenic constituents of *Casimiroa edulis* with potential cancer chemopreventive activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 3509-3516
- Jacobs**, E. J., Connell, C. J., McCullough, M. L. (2002) Vitamin C, Vitamin E, and Multivitamin Supplement Use and Stomach Cancer Mortality in the Cancer Prevention Study II Cohort. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 11: 35-41
- Jaeschke**, H. (2004) Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 284: G15-G26
- Jarak**, M., Đurić, S. (2004) Praktikum iz mikrobiologije. Poljoprivredni fakultet. Novi Sad.
- Jeong**, Y.-T., Yang, B.-K., Jeong, S.-C., Kim, S.-M., Song, C.-H. (2008) *Ganoderma applanatum*: A promising mushroom for antitumor and immunomodulating activity. *Phytotherapy Research*. 22: 614-619
- Jia**, J., Zhang, X., Hu, Y.-S., Wu, Y., Wang, Q.-Z., Li, N.-N., Guo, Q.-C., Dong, X.-C. (2009) Evaluation of in vivo antioxidants activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in STZ-diabetic rats. *Food Chemistry*. 115: 32-36
- Jinn**, T.-R., Wu, C.-M., Tu, W.-C., Ko, J.-L., Tzen, J. T. C. (2006) Functional expression of FIP-gts, a fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae* in Sf21 Insect Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 70: 2627-2634
- Jonathan**, S. G., Awotona, F. E. (2010) Studies on antimicrobial potentials of three *Ganoderma* species. *African Journal of Biomedical Research*. 13: 133-139

6. Литература

- Jones**, D. P. (2008) Radical-free biology of oxidative stress. *Americal Journal of Physiology-Cell Physiology*. 295: C849-C868
- Jong**, S. C., Birmingham, J. M. (1992) Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. *Advances in Applied Microbiology*. 37: 101-134
- Joseph**, M., Tonnel, A. B., Capron, A., Voisin, C. (1980) Enzyme release and superoxide anion production by human alveolar macrophages stimulated with immunoglobulin E. *Clinical and Experimental Immunology*. 40: 416-422
- Joseph**, S., Janardhanan, K. K., George, V., Baby, S. (2011) A new epoxidic ganoderic acid and other phytoconstituents from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry Letters*. 4: 386-388
- Joseph**, S., Sabulal, B., George, V., Antony, K. R., Janardhanan, K. K. (2011) Antitumor and anti-inflammatory activities of polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum*. *Acta Pharmaceutica*. 65: 335-342
- Joseph**, S., Sabulal, B., George, V., Smina, T. P., Janardhanan, K. K. (2009) Antioxidative and Antiinflammatory Activities of the Chloroform Extract of *Ganoderma lucidum* Found in South India. *Scientia Pharmaceutica*. 77: 111-121
- Josephy**, P. D. (2010) Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. *Human Genomics and Proteomics*. 2010: 1-14
- Jovanovic**, S. V., Steenken, S., Hara, Y., Simic, M. G. (1996) Reduction potentiala of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity? *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*. 11: 2497-2504
- Jung**, S. H., Lee, Y. S., Shim, S. H., Lee, S., Shin, K. H., Kim, J. S., Kim, Y. S., Kang, S. S. (2005) Inhibitory effects of *Ganoderma applanatum* on rat lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Phytotherapy Research*. 19: 477-480
- Kabata-Pendias**, A. (2011) Trace elements in soils and plants. 4. издање. Taylor & Francis Group, Boca Raton London New York.
- Kahkonen**, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J-P., Pihaja, K., Kujala, T. S., Heinonen, M. (1999) Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 3954-3962
- Kaliyaperumal**, M., Thangavelu Kalaichelvan, P. (2007) *Ganoderma australe* from Southern India. *Microbiological Research*. 163: 286-292
- Kamra**, A., Bhatt, A. B. (2012) Evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* extracts against human pathogenic bacteria. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutica; Sciences*. 4: 359-362
- Kao**, C. H. J., Jesuthasan, A. C., Bishop, K. S., Glucina, M. P., Ferguson, L. R. (2013) Anti-cancer activities of *Ganoderma lucidum*: active ingredients and pathways. *Functional Foods in Health and Disease*. 3: 48-65
- Kapetanović**, I. M., Mieval, I. I. (1997) Inhibition of acetaminophen induced hepatotoxicity by phenacetin and its alkoxy analogs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 209: 25-30
- Karadžić**, D. (1992) Zaštita šuma (šumska fitopatologija) za III razred šumarske i drvoprerađivačke škole. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd. Zavod za udžbenike, Novi Sad. Zavod za školstvo, Podgorica.
- Karaman**, M. (2009) Autohtone vrste Basidiomycotina – potencijalni resursi biološki aktivnih materija. Doktorska disertacija. Departman za biologiju i ekologiju. Prirodno-matematički fakultet. Univerzitet u Novom Sadu
- Karaman**, M. (2012a) Lekovitost autohtonih makrogljiva. Zadužbina Andrejević. Prirodno matematički fakultet. Univerzitet u Novom Sadu. Departman za Biologiju i Ekologiju. Novi Sad
- Karaman**, M., Jovin, E., Malbaša, R., Matavulj, M., Popović, M. (2010) Medicinal and edible Lignicolous fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agents. *Phytotherapy research*. 24: 1473-1481
- Karaman**, M., Matavulj M. (2005) Macroelements and heavy metals in some lignicolous and tericolous fungi. *Proceedings of Natural Sciences, Matica Srpska*, Novi Sad. 108: 255-267
- Karaman**, M., Matavulj, M., Janjić, Lj. (2012b) Antibacterial agents from lignicolous macrofungi. In the book: "Antimicrobial agents", ed. By Varaprasad Bobbarala, InTech, September 9, 2012, Chapter 18. pp: 361-386
- Karaman**, M., Mimica-Dukić, N., Matavulj, M. (2005): Lignicolous fungi as potential natural sources of antioxidants. *Archives of Biological Sciences. Belgrade*. 57: 93-100
- Karaman**, M., Mimica-Dukić, N., Matavulj, M. (2009) Lignicolous fungi from northern Serbia as natural sources of antioxidants. *Central European Journal of Biology*. 4: 387-396
- Karaman**, M., Stahl, M., Novaković, M., Janjić, Lj., Matavuly, M. (2012) Bioactive properties of wild-growing muushroom species *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. from Fruška Gora Forest (Serbia). *RPMP Ethnomedicine and Therapeutic Validation*. 32: 361-377

6. Литература

- Karaman, M., Stahl, M., Vulić, J., Vesić, M., Canadanović-Brunet, J. (2014) Wild-growing lignicolous mushroom species as source of novel agents with antioxidative and antibacterial potentials. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 65: 311-319
- Karaman, M., Vesic, M., Stahl, M., Novaković, M., Janjić, Lj., Matavulj, M.** (2012c) Bioactive Properties of Wild-Growing Mushroom Species *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. from Fruška Gora Forest (Serbia). *RPMP Ethnomedicine and Therapeutic Validation*. 32: 361-377
- Kaur, J., Singh, P., Sowers, J. R.** (2002) Diabetes and cardiovascular diseases. *American Journal of Therapy*. 9: 510-515
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M.** (1999) Antiproliferative effects of the readily extractable fractions prepared from various Citrus juices on several cancer cell lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 2509-2512
- Kernodle, S. P., Scandalios, J. G.** (1996) A comparison of the structure and function of the highly homologous maize antioxidant Cu/Zn superoxide dismutase genes, SOD4 and SOD4A. *Genetics*. 144: 317-328
- Keypour, S., Riahi, H., Moradali, M. F., Rafati, H.** (2008) Investigation of the antibacterial activity of a chlorophorm extract of Ling Zhi or Reishi Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr) P. Karst. (Aphyllphoromzctetidae) from Iran. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 10: 345-349
- Khamlue, R., Ounaron, A., Saelim, N.** (2012) Purification and characterization of polysaccharides extracted from *Tremella fuciformis* and *Auricularia auricula*. 1st Mae Fah Luang University International Conference. 1-9
- 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: 496-505
- Kim, Y.-S., Eo, S.-K., Oh, K.-W., Lee, C.-K., Han, S.-S.** (2000) Antiherpetic activities of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* alone and in combination with interferons. *Journal of Ethnopharmacology*. 72: 451-458
- Kim, D.-O., Jeong, S. W., Lee, C. Y.** (2003) Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivators of plums. *Food Chemistry*. 81: 321-326
- Kim, H. S., Kacew, S., Lee, B. M.** (1999) *In vitro* chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis* Miller, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). *Carcinogenesis, Integrative Cancer Research*. 20: 1637-1640
- Kim, H. W., Kim, B. K.** (1999) Biomedical triterpenoids of *Gandorma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst.(Aphyllphoromycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 1: 121-138
- Kim, Y. S., Ryu, K. H., Lee, C. K., Han, S. S.** (1994) Antimicrobial activity of *Elfvngia applanata* extract alone and in combination with some antibiotics. *Yakhak Hoeji*. 38: 742-748
- Kim, G.-N., Shin, J.-G., Jang, H.-D.** (2009) Antioxidant and antidiabetic activity of *Dangyuja* (*Citrus grandis* Osbeck) extract treated with *Aspergillus saitoi*. *Food Chemistry*. 117: 35-41
- Kim, M.-Y., Seguin, P., Ahn, J.-K., Kim, J.-J., Chun, S.-C., Kim, E.-H., Seo, S.-H., Kangm E.-Y., Kim, S.-L., Park, Y.-J., Ro, H.-M., Chung, I.-M.** (2008) Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 7265-7270
- Kiritoshi, S., Nishikawa, T., Sonoda, K., Kukidome, D., Senokuchi, T., Matsuo, T., Matsumara, T., Tokunaga, H., Brownlee, M., Araki E.** (2003) Reactive Oxygen Species from Mitochondria Induce Cyclooxygenase-2 Gene Expression in Human Mesangial Cells. *Diabetes*. 52: 2570-2577
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., Stalpers, J. A.** (2008) Dictionary of the Fungi. 10. издање. *Wallingford: CABI*, 272
- Kišpatić, J.** (1982) Šumarska fitopatologija. Sveučilište u Zagrebu. Fakultet poljoprivrednih znanosti. Zagreb.
- Ko, H.-H., Hung, C.-F., Wang, J.-P., Lin, C.-N.** (2008) Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry*. 69: 234-239
- Kohda, H., Tokumoto, W., Sakamoto, K., Fujii, M., Hirai, Y., Yamasaki, K., Komoda, Y., Nakamura, H., Ishihara, S., Uchida, M.** (1985) The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (FR.) Karst. Histamine release-inhibitory triterpenes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 33: 1367-1374
- Kosanić, M., Ranković, B., Dašić, M.** (2012) Mushrooms as possible antioxidant and antimicrobial agents. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 11: 1095-1102
- Koyama, K., Imaizumi, T., Akiba, M., Kinoshita, K., Takahashi, L., Suzuki, A.** (1997) Antinociceptive components of *Ganoderma lucidum*. *Planta Medica*. 63: 224-227
- Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, J. P. F. G., Van Griensven, L. J. L. D.** (2011) Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry*. 129: 1667-1675

6. Литература

- Kozarski, M.**, Klaus, A., Nikšić, M., Vrvčić, M. M., Todorović, N., Jakovljević, D., Van Griensven, L. J. L. D. (2012) Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis*. 26: 144-153
- Kretzschmar, M.** (1996) Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 48: 439-446
- Kris-Etherton, P. M.**, Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F. (2002) Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*. 113:71S-88S
- Krstić, B.**, Marjanović, N. (1998) Instrumentalne metode u biološkim istraživanjima. Univerzitet u Novom Sadu. Tehnološki i Prirodno-matematički fakultet. Novi Sad. 74-77
- Kubisch, H. M.**, Wang, J., Luche, R., Carlson, E., Bray, T. M., Epstein, C. J., Phillips, J. P. (1994) Transgenic copper/zinc superoxide dismutase modulates susceptibility to type I diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. 91: 9956-9959
- Kundalić, S.**, Kocić, G., Ćosić, V., Jevtović-Stoimenov, T., Đorđević, V. B. (2003) The role of xantine dehydrogenase/xantine oxidase in atherogenesis in patients with hyperlipidaemia. *Yugoslav Medical Biochemistry*. 22: 151-158
- Lam, T. B. T.**, Iiyama, K., Stone, B. A. (1992) Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and phalaris internodes. *Phytochemistry*. 31: 1179-1183
- Lang, J.** (1999) Molecular mechanism and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *European Journal of Biochemistry*. 259: 3-17
- Lattanzio, V.**, Lattanzio, V. M. T., Cardinali, A. (2006) Role of phenolics in the resistance mechanism of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry*. 23-67
- Lawson, L. D.** (1998) Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. In: Lawson, L.D., Bauer, R. (ur.) *Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity*. ACS Symposium Series, No 691. Washington, DC: American Chemical Society.
- Leal, A. R.**, Barros, L., Barreira, J. C. M., Sousa, M. J., Martins, A., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R. (2013) Portuguese wild mushrooms at the "pharma-nutrition" interface: Nutritional characterization and antioxidant properties. *Food Research International*. 50: 1-9
- Lee, J.**, Hong, J.-H., Kim, J.-D., Jun Ahn, B., Seok Kim, B., Kim, G.-H., Kim, J.-J. (2013) The antioxidant properties of solid-culture extracts of basidiomycetous fungi. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 59: 279-285
- Lee, K. -M.**, Kang, H., -S., Yun, C. -H., Kwak, H. -S. (2012) Potential *in vitro* protective effects of quercetin, catechin, caffeic acid and phytic acid against ethanol-induced oxidative stress in SK-Hep-1 cells. *Biomolecules and Therapeutics*. 20: 492-498
- Lee, N.**, Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J. A., Robinson, J. P. (2003) Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 8516-8525
- Lee, W. Y.**, Park, Y., Ahn, J. K., Ka, K. H., Park, S. Y. (2007) Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. *Enzyme and Microbial Technology*. 40: 249-254
- Lee, W.-J.**, Nie, S.-P., Liu, X.-Z., Zhang, H., Yang, Y., Yu, Q., Xie, M.-Y. (2012) Antimicrobial properties, antioxidant activity and cytotoxicity of ethanol-soluble acidic components from *Ganoderma atrum*. *Food and Chemical Toxicology*. 50: 689-694
- Lenzen, S.** (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 51: 216-226
- Leonarda, S. S.**, Xiab, C., Jiangb, B.-H., Stinefeltc, B., Klandorf, H., Harrisa, G. K., Shia, X. (2003) Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 309: 1017-1026
- Leonowicz, A.**, Matusjewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N.-S., Hofrichter, M., Roglaski, J. (1999) Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 27: 175-185
- Lesjak, M.** (2011) Biopotencijal i hemijska karakterizacija ekstrakata i etarskih ulja vrsta roda *Juniperus L.* (Cupressaceae). Doktorska disertacija. Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine. Prirodno-matematički fakultet. Univerzitet u Novom Sadu
- Lesjak, M. N.**, Beara, I. N., Orčić, D. Z., Ristić, J. D., Anačkov, G. T., Božin, B. N., Mimica-Dukić, N. M. (2013) Chemical characterisation and biological effects of *Juniperus foetidissima* Willd. 1806. *LWT – Food Science and Technology*. 53: 530-539
- Leskosek-Cukalovic, I.**, Despotovic, S., Lakic, N., Niksic, M., Nedovic, V., Tesevic, V. (2010) *Ganoderma lucidum* — Medical mushroom as a raw material for beer with enhanced functional properties. *Food Research International*. 43: 2262-2269
- Leutner, S.**, Eckert, A., Muller, W. E. (2001) ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *Journal of Neural Transmission*. 108: 955-967

6. Литература

- Levine, M.,** Cantilena, C. C., Dhariwal, K. R. (1995) Determination of optimal vitamin C requirements in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. 62: 1347S-1356S
- Li, F., Li, Q., Gao, D., Peng, Y.** (2009) The optimal extraction parameters and anti-diabetic activity of flavonoids from *Ipomoea batatas* leaf. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 6: 195-202
- Li, J. W., Liu, Y. F., Fan, L. P., Ai, L. Z., Shan, L.** (2011) Antioxidant activities of polysaccharides from the fruiting bodies of *Zizyphus Jujuba* cv. *Jinsixiaozao*. *Carbohydrate Polymers*. 84: 390-394
- Li, W.-J., Nie, S.-P., Liu, X.-Z., Zhang, H., Yang, Y., Yu, Q., Xie, M.-Y.** (2012) Antimicrobial properties, antioxidant activity and cytotoxicity of ethanol-soluble acidic components from *Ganoderma atrum*. *Food and Chemical Toxicology*. 50: 689-694
- Li, C., Shi, L., Chen, D., Ren, A., Gao, T., Zhao, M.** (2015) Functional analysis of the role of glutathione peroxidase (GPx) in the ROS signaling pathway, hyphal branching and the regulation of ganoderic acid biosynthesis in *Ganoderma lucidum*. *Fungal Genetics and Biology*. 82: 168-180
- Li, Y.-B., Liu, R.-M., Zhong, J.-J.** (2013) A new ganoderic acid from *Ganoderma lucidum* mycelia and its stability. *Fitoterapia*. 84: 115-122
- Liddell, H. G., Scott, R.** (1980) A Greek-English Lexicon (Abridged Edition). United Kingdom: Oxford University Press. ISBN 0-19-910207-4
- Lin, M.-S., Yu, Z.-R., Wang, B.-J., Wang, C.-C., Weng, Y.-M., Koo, M.** (2015) Bioactive constituent characterization and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* extract fractionated by supercritical carbon dioxide. *Sains Malaysiana*. 44: 1685-1691
- Lin, Z.B., Zhang, H. N.** (2004) Anti-tumor and immunoregulatory activities of *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms. *Acta Pharmacologica Sinica*. 25: 1387-1395
- Lindequist, U., Jurlich, W.-D., Witt, S.** (2015) *Ganoderma pfeifferi* – A European relative to *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*. 114: 102-108
- Lindequist, U., Niedermeyer T. H. J., Julich W. D.** (2005) The Pharmacological potential of mushrooms. eCAM, Published by Oxford University Press. *Evidence-based Complementary And Alternative Medicine*. 2: 285-299
- Liu, J., Shimizu, K., Konishi, F., Noda, K., Kumamoto, S., Kurashiki, K., Kondo, R.** (2007) Antiandrogenic Activities of the Triterpenoids Fraction of *Ganoderma lucidum*. *Food Chemistry*. 100: 1691–1696
- Liu, J., Yang, F., Ye, L.-B., Yang, X.-J., Timani, K. A., Zheng, Y., Wang, Y.-H.** (2004) Possible mode of action of herpetic activities of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum* in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*. 95: 265-272
- Liu, X. T., Winkler, A. L., Schwan, W. R., Volk, T. J., Rott, M. A., Monte, A.** (2010) Antibacterial compounds from mushrooms I: a lanostane-type triterpene and prenylphenol derivatives from *Jahnporus hirtus* and *Albatrellus flettii* and their activities against *Bacillus cereus* and *Enterococcus faecalis*. *Planta Medica*. 76: 182-185
- Liu, Y.-J., Du, J.-L., Cao, L.-P., Jia, R., Shen, Y.-J., Zhao, C.-Y., Xu, P., Yin, G.-J.** (2015) Anti-inflammatory and hepatoprotective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *International Immunopharmacology*. 25: 112-120
- Liu, Y.-J., Shen, J., Xia, Y.-M., Zhang, J., Park, H.-S.** (2012) The polysaccharide from *Ganoderma lucidum*: Are they always inhibitors on human hepatocarcinoma cells? *Carbohydrate Polymers*. 90: 1210-1215
- Liu, Y.-W., Gao, J.-L., Guan, J., Qian, Z.-M., Feng, K., Li, S.-P.** (2009) Evaluation of Antiproliferative Activities and Action Mechanisms of Extracts from Two Species of *Ganoderma* on Tumor Cell Lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 3087-3093
- Longvah, T., Deosthale, Y. G.** (1998) Composition and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. *Food Chemistry*. 63: 331-334
- Lorenzen, K., Anke, T.** (1998) Basidiomycetes as a sources for new Bioactive Natural Products. *Current Organic Chemistry*. 2: 329-36
- Lorian, V.** (2005) Antibiotics in Laboratory Medicine. 5. издање. *Lippincott Williams and Wilkins*
- Lull, C., Wickers, H. J., Savelkoul, H. F. B.** (2005) Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation*. 2: 63-80
- Ma, H. T., Hsieh, J. F., Chen, S. T.** (2015) Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*. 114: 10-113
- Ma, B., Ren, W., Zhou, Y., Ma, J., Ruan, Y., Wen, C.-N.** (2011) Triterpenoids from the spores of *Ganoderma lucidum*. *North America Journal of Medicinal Sciences*. 3: 495-498
- Macedo, C. S., Capelletti, S. M., Mercadante, M. C. S., Padovani, C. R., Spadella, C. T.** (2005) Role of metabolic control on diabetic nephropathy. *Acta Cirulica Brasileira*. 17: 37-5

6. Литература

- Mahmoud**, Y. A.-G., Mohamed, E. H. F. A., Abd Elzaher, E. H. F. (2007) Response of the Higher Basidiomycetic *Ganoderma resinaceum* to Sodium Chloride Stress. *Microbiology*. 35: 124-128
- Majkić-Sing**, N., Spasić, S., Stojanov, M., Jelić-Ivanović, Z., Kalimanovska-Spasojević, V. (1995) Medicinska biohemija: principi i metodi. Praktikum. Beograd.
- Makino**, T. (1989) Makino's New Illustrated Flora of Japan. The Hokuryukan Co. Ltd: Tokyo.
- Maksimović**, I., Pajević, S. (2002) Praktikum iz fiziologije biljaka. Poljoprivredni fakultet, Prirodno-matematički fakultet. Novi Sad. 88-91
- Man**, J. L., Lin, H. C., Chen, C. C. (2002) Antioxidant Properties of Several Medicinal Mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 6072 – 6077
- Manasseh**, A. T., Godwin, J. T. A., Ubleni, E. E., Borisde, O. O. (2012) Phytochemical properties of *Ganoderma applanatum* as potential agents in the application of nanotechnology in modern day medical practice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2: S580-S583
- Manzi**, P., Aguzzi, A., Pizzoferrato, L. (2001) Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry*. 73: 321-325
- Manzi**, P., Aguzzi, A., Vivanti, V., Paci, M., Pizzoferrato, L. (1999) Mushrooms as a source of functional ingredients. In: *Euro. Food Chem.*, X European conference on: Functional foods, A new challenge for the food chemist. Budapest, Hungary, 1999. 86-93
- Marchetti**, M., Pisani, S., Pietropaolo, V., Seganti, L., Nicoletti, R., Orsi, N. (1994) Inhibition of herpes simplex virus infection by negatively charged and neutral carbohydrate polymers. *Journal of Chemotherapy*. 7: 90-96
- Marrs**, K. A. (1996) The functions and regulation of glutathione-S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47: 127-158
- Martinez**, A. T., Speranza, M., Ruiz-Duenas, F. J., Ferreira, P., Guillen, F., Martinez, M. J., Gutierrez, A., del Rio, C. J. (2005) Biodegradation of lignocellulosics: Microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*. 8: 195-204
- Masuko**, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majimab, T., Nishimurac, S.-I., Lee, Y. C. (2005) Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*. 339: 69-72
- Mates**, J. M., Perez-Gomez, C., Nunez de Castro, I. (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. 32: 595-603
- Mattila**, P., Konko, K., Euroala, M., Pihlava, J.-M., Astola, J., Vahteristo, L., Hietaniemi, V., Kumpulainen, J., Valtonen, M., Piironen, V. (2001) Contents of Vitamins, Mineral Elements, and Some Phenolic Compounds in Cultivated Mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 2343-2348
- Mau**, J.-L., Lin, H.-C., Chen, C.-C. (2001) Non-volatile taste components of several medicinal mushrooms. *Food Research International*. 34: 521-526
- Mau**, J.-L., Lin, H.-C., Chen, C.-C. (2002) Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50: 6072-6077
- Mayes**, P. A., Botham, K. M. (2003) Metabolism of unsaturated fatty acids and eicosanoids. *Y: Harper's Illustrated Biochemistry*, Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. Lange Medical Books/ McGraw-Hill, Columbus, Ohio. 190-196
- McCall**, R. M., Frei, B. (1999) Can antioxidants vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biology and Medicine*. 26: 1034-1053
- McCord**, J. M., Fridovich, I. (1988) Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5: 363-369
- McMeekin**, D. (2005) The perception of *Ganoderma lucidum* in Chinese and Western culture. *Mycologist*. 18: 165-169
- Meister**, A. (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of Biological Chemistry*. 263: 17205-17208
- Meydani**, S. N., Beharka, A. A. (1996) Recent Developments in Vitamin E and Immune Response. *Nutrition Reviews*. 58: S49-S58
- Meydani**, S. N., Wu, D., Santos, M. S., Hayek, M. G. (1995) Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 62: 1462S-1476S
- Miles**, P. G., Chang, S. T. (1997) Mushroom Biology: concise basics and current development. World Scientific, Singapore.
- Mills**, G. C. (1957) Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *Journal of Biological Chemistry*. 229: 189-197

6. Литература

- Min**, B. S., Nakamura, N., Miyashiro, H., Bae, K. W., Hattori, M. (1998) Triterpenes from the Spores of *Ganoderma lucidum* and Their Inhibitory Activity Against HIV-1 Protease. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 46: 1607–1612
- Ming**, D. S., Chilton, J., Fogarty, F., Towers, G. H. N. (2002) Chemical constituents of *Ganoderma applanatum* of British Columbia forests. *Fitoterapia*. 73: 147-152
- Mitić**, M. (2011) Kinetika degradacije fenolnih jedinjenja hidroksil radikalima. Doktorska disertacija. Departman za hemiju. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu.
- Mittler**, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*. 9: 490-498
- Mizumoto**, K., Yamashita, A., Kii, M., Sumio, H. (1990) Antiretrovirus Agent. JP Patent.
- Mohamed**, A., Adelaiye, A. B., Abubakar, M. S., Abdurahman, E. M. (2007) Effects of aqueous extract of *Ganoderma lucidum* on blood glucose levels of normoglycemic and alloxan-induced diabetic wistar rats. *Journal of Medicinal Plants Research*. 1: 34-37
- Mohanty**, P. S., Harsh, N. S. K., Pandey, A. (2011) First report of *Ganoderma resinaceum* and *G. weberianum* from North India based on ITS sequence analysis and micromorphology. *Mycosphere*. 469-474
- Monsigny**, M., Petit, C., Roche, A. C. (1988) Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod. *Analytical Biochemistry*. 175: 525–530
- Morigiwa**, A., Kitabatake, K., Fujimoto, Y. Ikekawa, N. (1986) Angiotensin converting enzyme inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 34: 3025–3028
- Mosmann**, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55–63
- Mothana**, R. A. A., Awadh Ali, N. A., Jansen, R., Wegner, U., Mentel, R., Lindequist, U. (2003) Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi*. *Fitoterapia*. 74: 177-180
- Mothana**, R. A. A., Jansen, R., Jurlich, W.-D., Lindequist, U. (2000) Ganomycins A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. *Journal of Natural Products*. 63: 416–418
- Moustafa**, M., Sharma, R. K., Thornton, J., Mascha, E., Abdel-Hafez, M. A., Thomas, A. J., Agarwal, A. (2004) Relation between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction*. 19: 129-138
- Muhsin**, T. M., Al-Duboon, A.-H. A., Khalaf, K. T. (2011) Bioactive compounds from a polypore fungus *Ganoderma applanatum* (Pers. ex Wallr.) Pat. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 4: 205-212
- Muller**, F.L., Lustgarten, M. S., Jang, Y., Richardson, A., Van Remmen, H. (2007) Trends in oxidative aging theories. *Free Radical in Biology and Medicine*. 43: 477–503
- Murad**, F. (1999) Discovery of Some of the Biological Effects of Nitric Oxide and Its Role in Cell Signaling (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*. 38: 1856-1868
- Murray**, M. T. (1998) Quercetin: Nature's antihistamine. *Better Nutrition*. 60:10
- Murugesan**, K., Nam, I.-H., Kim, Y.-M., Chang, Y.-S. (2007) Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme and Microbial Technology*. 40: 1662-1672
- Nagaraj**, K., Naika, R., Mallikarjun N. (2013) Nutritive value of the potential macrofungi *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. from Shivamogga District-Karnataka, India. *Journal of Natural Product and Plant Resources*. 3: 51-61
- Natella**, F., Nardini, M., Di Felice, M., Scaccini, C. (1999) Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 1453-1459
- Nathan**, C. F., Hibbs, J. B. (1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current Opinion in Immunology*. 3: 65-70
- Nayak**, R. N., Nayak, A., Bhat, K. (2010) Antimicrobial activity of aqueous extract of spore powder of *Ganoderma lucidum* – an *in vitro* study. *Journal of International Oral Health*. 2: p. 68
- Negre-Salvayre**, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Trolly, M., Salvayre, R., Penicand, L., Casteilla, L. (1997) A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 11: 809–815
- Ng**, T. B. (2004) Peptides and proteins from fungi. *Peptides*. 25: 1055-1073

6. Литература

- Ngai, P. H. K., Ng, T. B.** (2004) A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 314: 988–993
- Ngai, P. H., Ng, T. B.** (2003) Lectin, 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: 63–74
- Ngai, P. H., Zhao, Z., Ng, T. B.** (2005) Agrocybin, an antifungal peptide from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Peptides*. 26: 191–196
- Nie, S., Zhang, H., Li, W., Xie, M.** (2013) Current development of polysaccharides from *Ganoderma*: Isolation, structure and bioactivities. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 1: 10-20
- Niedermeyer, T. H. J., Jira, T., Lalk, M., Lindequist, U.** (2013) Isolation of farnesylhydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. *Natural Products and Bioprospecting*. 3: 137-140
- Niedermeyer, T. H. J., Lindequist, U., Mentel, R., Gördes, D., Schmidt, E., Thurow, K., Lalk, M.** (2005) Antiviral Terpenoid Constituents of *Ganoderma pfeifferi*. *Journal of Natural Products*. 68: 1728-1731
- Nishikimi, M., Rao, N. A., Yagi, K.** (1972) The occurrence of super oxide anion in the reaction of reduced Phenazine methosulphate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 46: 849-853
- Niu, X. M., Li, S. H., Xiao, W. L., Sun, H.D., Che, C. T.** (2007) Two new lanostanoids from *Ganoderma resinaceum*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 6–8: 659–664
- Ofofille, L. N., Uma, N. U., Kokubun, T., Grayer, R. J., Ogunidipe, O. T., Simmonds, M. S. J.** (2005): Antimicrobial Activity of Some *Ganoderma* species from Nigeria. *Phytotherapy Research*. 19: 310–313
- Ogidi, O. C., Oyetayo, V. O.** (2016) Phytochemical property and assessment of antidermatophytic activity of some selected wild macrofungi against pathogenic dermatophytes. *Mycology*. DOI: 10.1080/21501203.2016.1145608
- Ookhtens, M., Kaplowitz, N.** (1998) Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. *Seminars in Liver Disease*. 18: 3131-329
- Orhan, D. D., Ozcelik, B., Ozgen, S., Ergun, F.** (2010) Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research*. 165: 496-504
- Ossola, B., Kaariainen, T. M., Raasmaja, A., Mannisto, P. T.** (2008) Time-dependent protective and harmful effects of quercetin on 6-OHDA-induced toxicity in neuronal SH-SY5Y cells. *Toxicology*. 250: 1-8
- Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G., Moncada, S.** (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 327: 524-526
- Pan, D., Wang, L., Chen, C., Teng, B., Wang, C., Xu, Z., Hu, B., Zhou, P.** (2012) Structure characterization of a novel neutral polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *Food Chemistry*. 135: 1097-1103
- Pan, D., Zhang, D., Wu, J., Chen, C., Xu, Z., Yang, H., Zhou, P.** (2013) Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of a novel proteoglycan from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies on db/db mice and the possible mechanism. *Plos One*. 8: 1-10
- Papazisis, K. T., Geromichalos, G. D., Dimitriadis, K. A., Kortsaris, A. H.** (1997) Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *Journal of Immunological methods*. 208: 151-158
- Papp, V., Geosel, A., Eros-Honti, Z.** (2012) Native *Ganoderma* species from the Carpathian basin with the perspective of cultivation. Review. *Acta Alimentaria*. 41: 160-170
- Pardini, R. S.** (1995) Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 29: 101-118
- Patel, S., Goyal, A.** (2012) Recent developments in mushroom as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotechnology*. 2: 1-15
- Paterson, R. R. M.** (2006) *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*. 67: 1985-2001
- Paterson, R. R. M.** (2007) *Ganoderma* disease of oil palm – A white rot perspective necessary for integrated control. *Crop Protection*. 26:1369-1376
- Pavlović, S.** (1996) Gajenje permanentnih sisarskih ćelijskih linija u kulturi. *Jugoslovenska Medicinska Biohemija*. 15 : 107-112
- Pelicano, H., Feng, L., Zhou, Y., Carew, J. S., Hileman, E. O., Plunkett, W., Keating, M. J., Huang, P.** (2003) Inhibition of Mitochondrial Respiration: A novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(39): 37832-37839

6. Литература

- Pelzer**, L. E., Guardia, T., Osvaldo Juarez, A., Guerreiro, E. (1998) Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *II Farmaco*. 53: 421-424
- Peng**, X.-R., Liu, J.-Q., Han, Z.-H., Yuan, X.-X., Luo, H.-R., Qiu, M.-H. (2013) Protective effects of triterpenoids from *Ganoderma resinaceum* on H₂O₂-induced toxicity in HepG2 cells. *Food Chemistry*. 141: 920-926
- Pergola**, C., Jazzar, B., Rossi, A., Buehring, U., Luderer, S., Dehm, F., Northoff, H., Sautebin, L., Werz, O. (2011) Cinnamyl-3,4-dihydroxy- α -cyanocinnamate is a potent inhibitor of 5-lipoxygenase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 338: 205-213
- Perner**, A., Andersen, L., Pedersen, G., Rask-Madsen, J. (2002) Superoxide production and expression of NAD(P)H oxidases by transformed and primary human colonic epithelial cells. *GUT: Epithelial Cell Biology*. 52: 231-236
- Persson**, I., Weiderpass, E., Bergkvist, L., Bergstrom, R., Schairer, C. (1999) Risk of breast and endometrial cancer after estrogen and estrogen-progestin replacement. *Cancer Causes Control*. 10: 253-260
- Petersen**, S. V., Oury, T. D., Ostergaard, L., Valnickova, Z., Wegrzyn, J., Thogersen, I. B., Jacobsen, C., Bowler, R. P., Fattman, C. L., Crapo, J. D., Enghild, J. J. (2004) Extracellular Superoxide Dismutase (EC-SOD) Binds to Type I Collagen and Protects Against Oxidative Fragmentation. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 13705-13710
- Petrović**, O., Knežević, P., Simeunović, J. (2007) Mikologija – Skripta za studente biologije. Univerzitet u Novom Sadu. Prirodno-matematički fakultet. Novi Sad
- Pillai**, T. G., Bincy, C. P., Janardhanan, K. K. (2004) Antioxidant activity of terpenes isolated from *Ganoderma lucidum*. *Amala Research Bulletin*. 24: 185-190
- Pisani**, L. F., Lecchi, C., Invernizzi, G., Sartorelli, P., Savoini, G., Cecilian, F. (2009) In vitro modulatory effect of ω -3-poyunsaturated fatty acid (EPA and DHA) on phagocytosis and ROS production of goat neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 131: 79-85
- Popov**, D. (2011) Novel protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors: interaction requirements for improved intracellular efficacy in type 2 diabetes mellitus and obesity control. *Biochemistry and Biophysic Research Communications*. 410: 377-381
- Popović**, M., Jakovljević, V., Mimica-Dukić, N., Kaurinović, B., Čebović, T. (2002) Effects of different extracts of *Hypericum perforatum* L. on the CCl₄ - induced hepatotoxicity in rats. *Oxidation Communications*. 25: 273-278
- Popović-Bijelić**, A., Kowol, C. R., Lind, M. E. S., Luo, J., Himo, F., Enyedy, E. A., Arion, V. B., Graslund, A. (2011) Ribonucleotide reductase inhibition by metal complexes of Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone): A combined experimental and theoretical study. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 105: 1422-1431
- Prasad**, Y., Wesely, W. E. G. (2008) Antibacterial activity of the bio-multidrug (*Ganoderma lucidum*) on multidrug resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Advanced Biotechnology*. 09-16
- Primiano**, T., Sutter, T. T., Kensler, T. W. (1997) Antioxidant-inducible genes. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 38: 293-328
- Pryor**, W. A. (2000) Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free radicals Biology and Medicine*. 28: 141-164
- Queiroz**, L. S., Nascimento, M. S., Cruz, A. K. M., Castro, A. J. G., Moura, M. de F. V., Baseia, I. G., Araujo, R. M., Benevides, N. M. B., Lima, L. F. A., Leite, E. L. (2010) Glucans from the *Carpinia montagnei* mushroom present anti-inflammatory activity. *International Immunopharmacology*. 10: 34-42
- Racker**, E. (1955) Glutathione reductase from bakers' yeast and beef liver. *Journal of Biological Chemistry*. 217: 855-865
- Rahman**, I., MacNee, W. (1999) Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *American Journal of Physiology*. 277: L1067-L1088
- Rajasekaran**, M., Kalaimagal, C. (2011) In vitro antioxidant activity of ethanolic extract of a medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum*. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 3: 1427-1433
- Ramarathnam**, N., Osawa, T., Ochi, H., Kawakishi, S. (1995) The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Science and Technology*. 6: 75-82
- Rang**, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Moore, P. K. (2003) Pharmacology. Edinburgh. New York. Churchill Livingstone.
- Ranković**, B. (2003) Sistematika gljiva. Univerzitet u Kragujevcu. Prirodno-matematički fakultet Kragujevac. 276-279.
- Rathee**, S., Rathee, D., Rathee, D., Kumar, V., Rathee, P. (2012) Mushrooms as therapeutic agents. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 22: 459-474
- Rayman**, M. P. (2008) Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *British Journal of Nutrition*. 100: 254-268

6. Литература

- Razumov, I.A., Kosogova, T.A., Kazachinskaia, E.I., Puchkova, L.I., Shcherbakova, N.S., Gorbunova, I.A., Mikhaïlovskaja, I.N., Loktev, V.B., Tepliakova, T.V.** (2010) Antiviral activity of aqueous extracts and polysaccharide fractions from mycelium and fruit bodies of higher fungi. *Antibiotiki i Khimioterapija*. 55: 14-18
- Reid, I. D.** (1995) Biodegradation of lignin. *Canadian Journal of Botany*. 73: 1011-1018
- Ren, L., Hemar, Y., Perera, C. O., Lewis, G., Krissansen, G. W., Buchanan, P. K.** (2014) Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 3: 41-51
- Riley, P. A.** (1994) Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and Effects of Ionizing Radiation. *International Journal of Radiation Biology*. 65: 27-33
- Rios, J.-L.** (2010) Effects of triterpenes on the immune system. *Journal of Ethnopharmacology*. 128: 1-14
- Roberts, L. M.** (2004) Australian Ganoderma: identification, growth and antibacterial properties. Ph.D. Thesis, Swinburne University of Technology, Australia.
- Roberts, A., Porter, K. E.** (2013) Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes and Vascular Disease Research*. 10: 472-482
- Rosecke, J., Konig, W.** (2000) Constitution of various wood rooting Basidiomycets. *Phytochemistry*. 54: 603-610
- Roupas, P., Keogh, J., Noakes, M., Margetts, C., Taylor, P.** (2012) The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. *Journal of Functional Foods*. 4: 687-709
- Ruilope, L. M. Pontremoli, R.** (2013) Serum uric acid and cardio-renal diseases. *Current Medical Research and Opinion*. 29: 25-31
- Ryvarden, L.** (1995) Can we trust morphology in *Ganoderma*? Proceedings of Contributed Symposium, 59A, B 5th International Mycological Congress (eds. PK Buchanan, RS Hseu and JM Moncalvo). 19-24
- Ryvarden, L.** (2000) Studies in neotropical polypores 2: a preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with a laccate pileus. *Mycologia*. 92: 180-191
- Sadava, D., Still, D. W., Mudry, R. R., Kane, S. E.** (2009) Effect of *Ganoderma* on drug-sensitive and multidrug-resistant small-cell lung carcinoma cells. *Cancer Letters*. 277: 182-189
- Sadhar, H. K., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., Sharma, P.** (2011) A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 1: 25-41
- Sakthivigneswari, G., Dharmaraj, K.** (2013) Studies on analysis of few secondary metabolites and antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Pharmacy Research*. 1: 781-786
- Saltarelli, R., Ceccaroli, P., Iotti, M., Zambonelli, A., Buffalini, M., Casadei, L., Vallorani, L., Stocchi, V.** (2009) Biochemical characterization and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from Central Italy. *Food Chemistry*. 116: 143-151
- Samarakoon, K. W., Lee, J.-H., De Silva, E. D., Kim, E.-A., Wijesundara, R. L. C., Lakmal, H. H. C., Jeon, Y.-J.** (2013) Bioactivity evaluation of organic solvent extractions of *Ganoderma lucidum*: A Sri Lankan Basidiomycete. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*. 41: 249-257
- Sambrook, J., Russell, D.W.** (2001) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3. издање. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. USA
- Samorini, G.** (2001) New data on the ethnomycology of psychoactive mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 3: 257-278
- Samra, M., Abcar, A. C.** (2012) False estimates of elevated creatinine. *The Permanente Journal*. 16: 51-52
- Sanodiya, B. S., Thakur, G. S., Baghel, R. K., Prasad, G. B. K. S., Bisen, P. S.** (2009) *Ganoderma lucidum*: A Potent Pharmacological Macrofungus. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 10: 717-74
- Sapakal, V. D., Shikalgar, T. S., Ghadge, R. V., Adhnaik, R. S., Naikwade, N. S., Magdum, C. S.** (2008) In vivo screening of antioxidant profile: a review. *Journal of Herbal Medicine nad Toxicology*. 2: 1-8
- Sarnesto, A., Under, N., Raivio, K. O.** (1996) Organ distribution and molecular forms of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase protein. *Laboratory Investigation*. 74: 48-56
- Schechter, A. N., M.D., Gladwin, M. T.** (2003) Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide. *The New England Journal of Medicine*. 348: 1483-1485
- Schroeder, W. A., Shelton, J. R., Shelton, J. B., Robberson, B., Apell, G.** (1969) The amino acid sequence of bovine liver catalase: a preliminary report. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 131: 653-655

6. Литература

- Schwarze**, F. W. M. R. (2000) Holzersetzungsstrategien von Pilzen und ihre Bedeutung für die Fäuledynamik im lebenden Baum. Habilitationsschrift Univ. Freiburg, Germany, 91 pp.
- Schwarze**, F. W. M. R. (2007) Wood decay under the microscope. *Fungal Biology Reviews*. 1-38
- Schwarze**, F. W. M. R., Engels, J., Mattheck, C. (2000) Fungal strategies of Wood Decay in Trees. *Springer. Berlin*.
- Shwarze**, F. W. M. R., Ferner, D. (2003) *Ganoderma* on Tress – Differentiation of species and studies of invasiveness. *Arboricultural Journal: The International Journal of Urban Forestry*. 27: 59-77
- Seo**, G.-S., Kirk, P. M. (2000) Ganodermataceae: Nomenclature and Classification. in: Flood, J., Bridge, P. D., Holderness, M. *Ganoderma Diseases of Perennial Crops. CABI Publishing. London*.
- Shan**, X., Ty, A., Jones, D. P. (1990) *Pharmacological Therapy*. 47: 61-71
- Shang**, D., Zhang, J., Wen, L., Li, Y., Cui, Q. (2009) Preparation, characterization, and antiproliferative activities of the Se-containing polysaccharide SeGLP-2B-1 from Se-enriched *Ganoderma lucidum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57:7737-7742
- Sheena**, N., Lakshmi, B., Janardhanan, K. K. (2005) Therapeutic potential of *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst. *Natural Product Radianc*e. 4: 382-386
- Sheikh**, I. A., Vyas, D., Ganaie, M. A., Dehariya, K, Singh, V. (2014) HPLC determination of phenolics and free radical scavenging activity of ethanolic extracts of two polypore mushrooms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6: 679-684
- Sheikh**, I. A., Vyas, D., Lone, R., Singh, V. (2015) *Ganoderma lucidum* and *Trametes hirsute* as potent antioxidants in free radical systems *in vitro*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4: 1695-1710
- Shen**, Y., Zhang, H., Cheng, L., Wang, L., Qian, H., Qi, X. (2016) In vitro and in vivo antioxidant activity of polyphenols extracted from black highland barley. *Food Chemistry*. 194: 1003-1012
- Shi**, Y., Sun, J., He, H., Guo, H., Zhang, S. (2008) Hepatoprotective effects of *Ganoderma lucidum* peptides against D-galactosamine-induced liver injury in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 117: 415-419
- Sies**, H. (1997) Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. *Experimental Physiology*. 82: 291-295
- Sies**, H., Stahl, W. (1995) Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 62: 1315S-1321S
- Silva**, A. M., Miranda, A., Fernandes, E., Santos, S., Fraga, I., Santos, D. L., Dias, A.A., Bezerra, R. M. (2013) Endopolysaccharides from *Ganoderma resinaceum*, *Phlebia rufa* and *Trametes versicolor* affect differently the proliferation rate of HepG2 cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 169: 1919-1926
- Simon**, L. M., Fatrai, Z., Jonas, D. E., Matkovics, B. (1974) Study of metabolism enzymes during the development of phaseous vulgaris. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. 166: 389-393
- Simonić**, J., Stajić, M., Glamočlija, J., Vukojević, J., Duletić-Laušević, S., Brčeski, I. (2008) Optimization of submerged cultivation conditions for extra- and intracellular polysaccharide production by medicinal Ling Zhi of Reishi Mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 10: 351-360
- Singleton**, V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299: 152-178
- Si-xue**, C., Schopfer, P. (1999) Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *European Journal of Biochemistry*. 260: 726-735
- Skehan**, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, T. J., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, R. M. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of National Cancer Institute*. 82: 1107-1112
- Sliva**, D., (2006) *Ganoderma lucidum* in cancer research. *Leukemia Research*. 30: 767-768
- Sliva**, D., Loganathan, J., Jiang, J., Jedinak, J., Lamb, J. G., Terry, C., Baldrige, L. A., Adamec, J., Sandusky, G. E., Dudhgaonkar, S. (2012) Mushroom *Ganoderma lucidum* prevents colitis-associated carcinogenesis in mice. *Plos One*. 7: 1-13
- Sliva**, D., Sedlak, M., Slivova, V., Valachovicova, T., Lloyd, F. P., Ho, N.W.Y. (2003) Biologic activity of spores and dried powder from *Ganoderma lucidum* for the inhibition of highly invasive human breast and prostate cancer cells. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 9: 491-497
- Slivova**, V., Valachovicova, T., Jiang, J., Sliva, D. (2004) *Ganoderma lucidum* inhibits invasiveness of breast cancer cells. *Journal of Cancer Integrative Medicine*. 2: 25-30
- Smania**, A. J., Monache, F. D., Smania, E. D. F. A., Cuneo, R. S. (1999) Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (Aphyllphoromycetidae) fruit body. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v1i4.40 325-330

6. Литература

- Smania**, E. F. A., Delle Monache, F., Smania, J. A., Yunes, R. A., Cuneo, R. S. (2003) Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. *Fitoterapia*. 74: 375–377
- Smith**, M. R. (2016) Cord-forming Palaeozoic fungi in terrestrial assemblages. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 180: 452-460
- Smith**, B. J., Sivasithamparam, K. (2003) Morphological studies of *Ganoderma* (Ganodermataceae) from the Australasian and Pacific regions. *Australian Systematic Botany*. 16: 487-503
- Soares**, A. (2013) Hepatoprotective effects of mushrooms. *Molecules*. 18: 7609-7630
- Somanjana**, K., Snigdha, P., Krishendu, A. (2013) Mushrooms as the potential source of new generation of antioxidant: A review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 6: 496-505
- Sone**, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E., Misaki, A. (1985) Structure and antitumor activities of polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 49: 2641-2653
- Souza**, L. A. R., Dore, C. M. P. G., Castro, A. J. G. et al. (2012) Galactans from the red seaweed *Amansia multifida* and their effects on inflammation, angiogenesis, coagulation and cell viability. *Biomedicine and Preventive Nutrition*. 2: 154-162
- Spasić**, S., Jelić-Ivanović, Z., Kalimanovska-Spasojević, V. (2003) Medicinska biohemija. Beograd.
- Srinivasan**, C., Dsouza, T. M., Boominathan, K., Reddy C. A. (1995) Demonstration of laccase in white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. BKM –F1767. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 4274-4277
- Sriram**, P. G., Subramanian, S. (2011) Fisetin, a bioflavonoid ameliorates hyperglycaemia in streptozotocin-induced experimental diabetes in rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 6: 68-74
- Stahl**, W., Sies, H. (2003) Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*. 24: 345-351
- Stamler**, J. S. (2003) Hemoglobin and Nitric Oxide. *The New England Journal of Medicine*. 349: 402-405
- Stark**, D. M., Shopsis, C., Borenfreund, E., Babich, H. (1986) Progress and problems in evaluating and validating alternative assays in toxicology. *Food and Chemical Toxicology*. 24 (6 /7): 449- 455
- Stilinović**, N., Škrbić, B., Živančev, J., Mrmoš, N., Pavlović, N., Vukmirović, S. (2014) The level of elements and antioxidant activity of commercial dietary supplement formulations based on edible mushrooms. *Food and Function*. 5: 3170-3178
- Su**, Z.-Y., Hwang, L. S., Chiang, B.-H., Sheen, L.-Y. (2013) Antihepatoma and liver protective potentials of *Ganoderma lucidum* (Ling Zhi) fermented in a medium containing black soybean (Hei Dou) and Astragalus Membranaceus (Sheng Huang Qi). *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 3: 110-118
- Sudheer**, S., Keat Yeoh, W., Manickam, S., Ali, A. (2016) Effect of ozone gas an elicitor to enhance the bioactive compounds in *Ganoderma lucidum*. *Postharvest Biology and Technology*. 117: 81-88
- Sumiya**, T., Fujimoto, Y., Nishida, H., Morikawa, Y., Sakuma, S., Fujita, T. (1993) Effects of reactive oxygen species on arachidonic acid metabolism in rabbit platelets. *Free Radical Biology and Medicine*. 15: 101-104
- Szkudelski**, T. (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*. 50: 536-546
- Takemura**, H., Sakakibara, H., Yamazaki, S., Shimoi, K. (2013) Breast cancer and flavonoids - a role in prevention. *Current Pharmaceutical Design*. 19: 6125-6132
- Tanaka**, S., Ko, K., Kino, K., Tsuchiya, K., Yamashita, A., Murasugi, A., Sakuma, S., Tsunoo, H. (1989) Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8). An immunomodulator from a fungus, *Ganoderma lucidum*, having similarity to immunoglobulin variable regions. *Journal of Biological Chemistry*. 264: 16372–16377
- Tapas**, A. R., Sakarkar, D. M., Kakde, R. B. (2008) Flavonoids as nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 7: 1089-1099
- Taylor**, T. N., Remy, W., Hass, H., Kerp, H. (1995) Fossil arbuscular mycorrhizae from the Early Devonian. *Mycologia*. 87: 560-573
- Tel-Cayan**, G., Ozturk, M., Duru, M. E., Ur Rehman, M., Adhikari, A., Turkoglu, A., Choudhary, M. I. (2015) Phytochemical investigation, antioxidant and anticholinesterase activities of *Ganoderma adspersum*. *Industrial Crops and Products*. 76: 749-754
- Terpinc**, P., Čeh, B., Ulrih, N. P., Abramovič, H. (2012) Studies of the correlation between antioxidant properties and the total phenolic content of different oil cake extracts. *Industrial Crops and Products*. 39: 10-217
- Tobert**, J. A. (2003) Lovastatin and beyond: history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nature Reviews*. 2: 517-526

6. Литература

- Toh, J. Y., Tan, V. H. M., Lim, P. C. Y., Lim, S. T., Chong, M. F. F.** (2013) Flavonoids from fruit and vegetables: A focus on cardiovascular risk factors. *Current Atherosclerosis Reports*. 15: 368
- Townsend, D. M., Tew, K. D., Tapiero, H.** (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 57: 145-155
- Trigos, A., Suarez Medellin, J.** (2011) Biologically active metabolites of the genus *Ganoderma*: Three decades of myco-chemistry research. *Revista Mexicana de Micología*. 34: 63-83
- Turrens, J. F.** (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports*. 17: 3-8
- Uzelac, B.** (2010) Gljive Srbije i Zapadnog Balkana. BGV Logik.
- Van Marter, L. J., Allred, E. N., Pagano, M., Sanocka, U., Parad, R., Moore, M., Susser, M., Paneth, N., Leviton, A.** (2000) Do Clinical Markers of Barotrauma and Oxygen Toxicity Explain Interhospital Variation in Rates of Chronic Lung Disease? *Pediatrics*. 105: 1194-1201
- Veitch, N. C.** (2004) Structural determinations of plant peroxidase function. *Phytochemistry Reviews*. 3: 3-18
- Vidari, G., Finzi, P. V.** (1995) Sesquiterpenes and Other Secondary Metabolites of Genus *Lactarius* (Basidiomycetes): Chemistry and Biological Activities, in: Studies in Natural Product Chemistry (Ed.: Atta-ur-Rahman), Elsevier, Amsterdam. 17: 153-206
- Vijay, H. M., Comtois, P., Sharma, R., Lemieux, R.** (1991) Allergenic components of *Ganoderma applanatum*. *Grana*. 30: 167-170
- Vulcano, M., Rosa, M. F., Breyer, I., Isturiz, M. A.** (1998) Hydroxyl radical scavengers inhibit TNF-alpha production in mononuclear cells but not in polymorphonuclear leukocytes. *International Journal of Immunopharmacology*. 20: 709-722
- Wachtel-Galor, S., Yuen, J., Buswell, J. A., Benzie, I. F. F.** (2011) *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi): A Medicinal Mushroom. In: Benzie, I. F. F., Wachtel-Galor, S. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2. издање. Boca Raton (FL): CRC Press.
- Wagner, R., Mitchell, D. A., Sasaki, G. L., De Almeida Amazonas, M. A. L.** (2004) Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide. *Journal of Biotechnology*. 114: 153-164
- Wang, F., Dong, Z.-J., Liu, J.-K.** (2007) Benzopyran -4-one derivatives from the fungus *Ganoderma applanatum*. *Zeitschrift für Naturforschung*. 62b: 1329-1332
- Wang, G. J., Huang, Y. J., Chen, D.H., Lin, Y. L.** (2009) *Ganoderma lucidum* extract attenuates the proliferation of hepatic stellate cells by blocking the PDGF receptor. *Phytotherapy Research*. 23: 833-839
- Wang, H. X., Ng, T. B.** (2006) A laccase from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72: 508-513
- Wang, H. X., Ng, T. B., Chiu, S. W.** (2004) A distinctive ribonuclease from fresh fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Biochemistry and Biophysics Research Communications*. 314: 519-522
- Wang, H., Ng, T. B.** (2006) Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides*. 27: 27-30
- Wang, J., Wang, Y., Liu, X., Yuan, Y., Yue, T.** (2013) Free radical scavenging and immunomodulatory activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides derivatives. *Carbohydrate Polymers*. 91: 33-38
- Wang, S. Y., Hsu, M. L., Hsu, H. C., Tzeng, C. H., Lee, S. S., Shiao, M. S., Ho, C. K.** (1997) Study of anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *International Journal of Cancer*. 70: 699-705
- Wasser, S. P.** (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60: 258-274
- Wasser, S. P.** (2005) Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*). In: Coates, P. M., Betz, J. M., Blackman, M. R., Cragg, G. M., Levine, M., Moss, J., White, J. D. (Eds): *Encyclopedia of dietary supplements*. Marcel Dekker, New York (USA), pp. 603-622
- Wasser, S. P., Nevo, E., Sokolov, D., Reshetnikov, S., Timor-Tismenetsky, M.** (2000) Dietary supplements from medicinal mushrooms: Diversity of types and variety of regulations. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2: 1-19
- Wasser, S. P., Weis A. L.** (1999) Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical Reviews in Immunology*. 19: 65-96
- Wasserman, H. H., Murray, R. W.** (1979) Singlet Oxygen. *Academic Press. New York*. Pp: 59-114
- Watson, R. E., McKim, J. M., Cockerell, G. L., Goodman, J. I.** (2004) The Value of DNA methylation analysis in basic, initial toxicity assessments. *Toxicological Sciences*. 79: 178-188

6. Литература

- Webster**, J., Weber, R. W. S. (2007) Introduction to fungi. Part I. 3. издање. *Cambridge*.
- Wei**, S., Van Griensven, J. L. D. (2008) Pro- and antioxidant properties of medicinal mushroom extracts. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 10: 315-324
- Wendehenne**, D., Pugin, A., Klessig, D. F., Durner, J. (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends in Plant Science*. 6: 177-183
- Weng**, Y., Xiang, L., Matsuura, A., Zhang, Y., Huang, Q., Qi, J. (2010) Ganodermasides A and B, two novel anti-aging ergosterols from spores of a medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* on yeast via *UTH1* gene. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 18: 999-1002
- Wiesinger**, H. (2001) Arginine metabolism and synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Progress in Neurobiology*. 64: 365-391
- Wild**, R. (1994) The complete book of natural and medicinal cures. Rodale Press, Inc., Emmaus, Pa.
- Wild**, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H. (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 27: 1047-1053
- Wilson**, A. P. (1989) Citotoxicity and viability assays. In: Animal cell culture (Freshney RI, издавач)
- Wolf-Reiner**, A. (2001) Bioactive Sesquiterpenes Produced by Fungi: are they Useful for Humans as Well? *Current Medicinal Chemistry*. 8: 583-606
- Woodford**, N., Ellington, M. J. (2007) The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*. 13: 5-18
- World Cancer Report (2014). World Health Organization. 2014. pp. Chapter 1.1. ISBN 92-832-0429-8
- Wu**, D.-T., Xie, J., Hu, D.-J., Zhao, J., Li, S.-P. (2013) Characterization of polysaccharides from *Ganoderma* spp. Using saccharide mapping. *Carbohydrate Polymers*. 97: 398-405
- XiaoPing**, C., Yan, C., ShuiBing, L., YouGuo, C., JianYun, L., LanPing, L. (2009) Free radical scavenging of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes and immunity activities in cervical carcinoma rats. *Carbohydrate Polymers*. 77: 389-393
- Xie**, J., Zhao, J., Hu, D.-J., Duan, J.-A., Tang, Y.-P., Li, S.-P. (2012) Comparison of Polysaccharides from Two Species of *Ganoderma*. *Molecules*. 17: 740-752
- Xu**, Z., Chen, X., Zhong, Z., Chen, L., Wang, Y. (2011) *Ganoderma lucidum* polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities. *American Journal of Chinese Medicine*. 39: 12-27
- Xu**, X., Yan, H., Chen, J., Zhang, X. (2011) Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology Advances*. 29: 667-674
- Yáñez**, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente- García, O., Canteras, M., Lazano Teruel, J. A. (2004) Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. *Nutrition and Cancer*. 49: 191-199
- Yihuai**, G., Zhou, S., Huang, M., Xu, A. (2003) Antibacterial and antiviral value of the genus *Ganoderma* P. Karst. species (Aphylllophoromycetidae): A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 5: 235-246
- Yildiz**, O., Can, Z., Laghari, A. Q., Sahin, H., Malkoc, M. (2014) Wild edible mushrooms as a natural source of phenolics and antioxidants. *Journal of Food Biochemistry*. 39: 148-154
- Yoon**, H.-M., Jang, K.-J., Han, M. S., Jeong, J.-W., Kim, G. Y., Lee, J.-H., Choi, Y. H. (2013) *Ganoderma lucidum* ethanol extract inhibits the inflammatory response by suppressing the NF- κ B and toll-like receptor pathways in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 5: 957-963
- Yoon**, J. H., Baek, S. J. (2005) Molecular Targets of Dietary Polyphenols with Antiinflammatory Properties. *Yonsei Medicinal Journal*. 46: 585-596
- Yoon**, S. Y., Eo, S. K., Kim, Y. S., Lee, C. K., Han, S. S. (1994) Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics. *Archives of Pharmacal Research*. 17: 438-442
- You**, Y. H., Lin, Z. B. (2002) Protective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide on injury of macrophages induced by reactive oxygen species. *Acta Pharmacologica Sinica*. 23: 787-791
- Yuan**, J.-P., Wang, J.-H., Liu, X., Kuang, H.-C., Huang, X.-N. (2006) Determination of ergosterol in *Ganoderma* spore lipid from the germinating spores of *Ganoderma lucidum* by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 6172-6176

6. Литература

- Yuan, J. F., Zhang, Z. Q., Fan, Z. C., Yang, J. X.** (2008) Antioxidant effects and cytotoxicity of three purified polysaccharides from *Ligusticum chuanxiong* Hort. *Carbohydrate Polymers*. 74: 822-827
- Yue, Q.-X., Song, X.-Y., Ma, C., Feng, L.-X., Guan, S.-H., Wu, W.-Y., Yang, M., Jiang, B.-H., Liu, X., Cui, Y.-J., Guo, D.-A.** (2010) Effects of triterpenes from *Ganoderma lucidum* on protein expression profile of HeLa cells. *Phytomedicine*. 17: 606-613
- 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: 453-468
- Zaninotto, F., La Camera, S., Polverari, A., Delledonne, M.** (2006) Cross Talk between Reactive Nitrogen and Oxygen Species during the Hypersensitive Disease Resistance Response. *Plant Physiology*. 141: 379-383
- Zengin, G., Sarikurkcu, C., Gunes, E., Uysal, A., Ceylan, R., Uysal, S., Gungor, H., Aktumsek, A.** (2015) Two *Ganoderma* species: profiling of phenolic compounds by HPLC-DAD, antioxidant, antimicrobial and inhibitory activities on key enzymes linked to diabetes mellitus, Alzheimer's disease and skin disorders. *Food and Function*. 6: 2794-2802
- Zhang, N., Chen, H., Zhang, Y., Xing, L., Li, S., Wang, X., Sun, Z.** (2015) Chemical composition and antioxidant properties of five edible Hymenomycetes mushrooms. *International Journal of Food Science and Technology*. 50: 465-471
- Zhang, H. N., He, J. H., Yuan, L., Lin, Z. B.** (2003) *In vitro* and *in vivo* protective effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on alloxan-induced pancreatic islets damage. *Life Sciences*. 73: 2307-2319
- Zhang, H. N., Lin, Z. B.** (2004) Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Acta Pharmacologica Sinica*. 25: 11-195
- Zhang, Y., Lewis, K.** (1997) Fabatins: new antimicrobial plant peptides. *FEMS Microbiology Letters*. 149: 59-64
- Zhang, G.-L., Wang, Y.-H., Ni, W., Teng, H.-L., Lin, Z.-B. (2002) Hepatoprotective role of *Ganoderma lucidum* polysaccharides against BCG-induced immune liver injury in mice. *World Journal of Gastroenterology*. 8: 728-733
- Zhao, L., Dong, Y., Chen, G., Hu, Q.** (2010) Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*. 80: 783-789
- Zhu, K., Nie, S., Li, C., Xing, M., Li, W., Gong, D., Xie, M.** (2013) A newly identified polysaccharide from *Ganoderma atrum* attenuates hyperglycemia and hyperlipidemia. *International Journal of Biological Macromolecules*. 57: 142-150
- Zhu, M., Chang, Q., Wong, L. K., Chong, F. S., Li, R. C.** (1999) Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum*. *Phytoterapy Research*. 13: 529-531
- Ziegenbein, F. C., Hansen, H.-P., Konig, W. A.** (2006) Secondary metabolites from *Ganoderma lucidum* and *Spongiporus leucomallendus*. *Phytochemistry*. 67: 202-211
- Zimmet, P., Alberti, K. G., Shaw, J.** (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 414: 782-787
- Zjawiony, J. K.** (2004) Biologically active compounds from *Aphyllphorales* (Polypore) fungi. *Journal of Natural Products*. 67: 300-310
- Zwenger, S., Basu, C.** (2008) Plant terpenoids: applications and future potentials. Stanard Review. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. 3: 1-7
- <http://chemistry.umeche.maine.edu/Fort/Cole-Fort.htm> (22.06.2014)
- <http://www.alohaculturebank.com/GanodermaresinaceumOct.html> (17.06.2014.)
- <http://www.hbp.usm.my/1b/GT/ganoderma.html> (11.06.2016.)
- <http://www.iucnredlist.org/static/stats> (22.05.2014.)
- <http://www.naturefg.com/pages/b-fungi/ganoderma%20lucidum.htm> (03.06.2014.)
- http://www.pharmanatur.com/Pagepolypore/Ganoderma_resinaceum5.jpg (17.06.2014.)
- www.scmsfungi.org/fungi/ganoderma_applanatum.html (02.06.2014.)
- www.wikimedia.org/Ganoderma_pfeifferi - Kupferroter Lackporling.JPG (10.06.2014.)
- <http://www.alohaculturebank.com/GanodermaresinaceumVDE1.html#Vfvehd-qgko> (17.06.2014.)
- <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:HYPHAE.png> (23.05.2016.)
- <http://www.mushroomthejournal.com/greatlakesdata/Terms/Polyp296.html> (23.05.2016.)
- <http://www.mushroomthejournal.com/greatlakesdata/Terms/dimit141.html> (23.05.2016.)

6. Литература

http://eol.org/data_objects/21243830 (29.05.2016.)

http://eol.org/data_objects/21243842 (29.05.2016.)

<http://www.discoverlife.org/mp/20m?map=Ganoderma+pfeifferi> (29.05.2016.)

www.alohaculturebank.com (28.05.2016.)

<http://www.nahuby.sk/atlas-hub/Ganoderma-applanatum/lesklokorovka-plocha/lesklokorka-ploska/ID246> (30.05.2016.)

http://www.mushroomexpert.com/ganoderma_applanatum.html (30.05.2016.)

<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp> (30.05.2016.)

http://www.mushroomexpert.com/Ganoderma_lucidum.html (30.05.2016.)

<http://zivinarstvo.com/wp-content/uploads/2014/03/PRAVILNIK-O-KOLICINAMA-PESTICIDA-METALA-I-METALOIDA-I-DRUGIH-OTROVNIH-SUPSTANCIJA-HEMIOTERAPEUTIKA-ANABOLIKA-I-DRUGIH-SUPSTANCIJA-KOJE-SE-MOGU-NALAZITI-U-NAMIRNICAMA.pdf> (19.06.2016.)

7.

ПРИЛОГ



7. Прилог

7.1. Хемијска карактеризација испитиваних врста гљива

7.1.1. Одређивање садржаја макро- и микроелемената атомском апсорпционом спектрофотометријом (AAS)

Табела 7.1. Садржај испитиваних макроелемената у узорцима гљива (mg/g)

Врста гљиве	Маса узорка (g)	Садржај испитиваног макроелемента mg/g		
		K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
<i>G. applanatum</i>	1,9996	2,34	2,97	1,10
	2	2,20	2,38	0,88
	2	2,00	2,50	0,76
		2,18±0,17 ^b	2,62±0,31 ^b	0,91±0,17 ^b
<i>G. lucidum</i>	2,0001	3,19	1,84	0,72
	2,0006	3,79	1,55	0,90
	1,999	4,01	1,60	0,91
		3,66±0,42 ^a	1,66±0,16 ^c	0,84±0,11 ^a
<i>G. pfeifferi</i>	2	0,94	4,82	1,31
	2	0,88	4,75	1,43
	2	0,84	4,08	1,25
		0,89±0,05 ^c	4,55±0,41 ^a	1,33±0,09 ^a
<i>G. resinaceum</i>	2,0001	1,83	0,95	0,69
	2	1,64	0,75	0,63
	2,0001	2,24	0,76	0,67
	1,90±0,31 ^b	0,82±0,11 ^d	0,66±0,03 ^c	

Резултати су изражени као средња вредност ± SD

^{a, b, c, d} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт (p<0,01, Tukey тест, ANOVA)

7. Прилог

Табела 7.2. Садржај испитиваних микроелемената у узорцима гљива (mg/kg)

Врста гљиве	Маса узорка (g)	Садржај испитиваног макроелемента mg/kg							
		Cu ²⁺	Ni ²⁺	Cd ²⁺	Pb ²⁺	Cr ³⁺	Mn ²⁺	Fe ²⁺	Zn ²⁺
<i>G. applanatum</i>	1,9996	16,92	2,05	0,87	2,53	17,15	52,11	0,28	18,11
	2	22,92	2,72	0,72	2,09	20,67	42,31	0,39	22,06
	2	26,32	2,75	0,87	2,04	14,57	34,59	0,43	23,09
		22,05±4,76 ^a	2,51±0,39 ^b	0,82±0,09 ^c	2,22±0,27 ^c	17,46±3,06 ^a	43,00±8,78 ^a	0,37±0,08 ^c	21,09±2,63 ^c
<i>G. lucidum</i>	2,0001	20,12	2,86	1,77	2,80	18,67	19,24	0,48	31,94
	2,0006	22,58	4,64	1,85	4,65	17,67	21,92	0,68	37,17
	1,999	23,45	5,03	1,75	3,66	19,23	22,87	0,69	37,97
		22,05±1,73 ^a	4,18±1,16 ^a	1,79±0,06 ^c	3,70±0,93 ^a	18,52±0,79 ^a	21,34±1,88 ^b	0,62±0,12 ^b	35,69±3,27 ^b
<i>G. pfeifferi</i>	2	17,37	4,14	4,91	3,18	24,31	24,20	0,94	43,59
	2	17,23	3,83	4,82	3,59	17,67	23,58	0,95	41,28
	2	17,34	4,04	5,06	3,59	22,49	22,74	0,95	40,23
		17,31±0,48 ^a	4,00±0,12 ^a	4,93±0,03 ^a	3,45±0,22 ^b	21,49±3,43 ^a	23,51±0,21 ^b	0,94±0,03 ^a	41,70±1,11 ^a
<i>G. resinaceum</i>	2,0001	22,18	0,68	2,84	2,77	9,40	6,80	0,16	33,05
	2	21,77	0,87	2,88	2,65	27,17	7,16	0,22	32,93
	2,0001	22,72	0,65	2,81	3,08	19,95	7,18	0,20	34,91
		22,22±0,48 ^a	0,73±0,12 ^c	2,84±0,03 ^b	2,84±0,22 ^a	18,84±8,93 ^a	7,05±0,21 ^c	0,19±0,03 ^c	33,63±1,11 ^b

Резултати су изражени као средња вредност ± SD

^{a, b, c} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт (p<0,01, Tukey тест, ANOVA)

7. Прилог

7.1.2. LC/MS-MS анализа одабраних фенолних једињења

Табела 7.3. LC-MS/MS параметри за квантификацију стандардних фенолних једињења у екстрактима испитиваних гљива рода *Ganoderma*

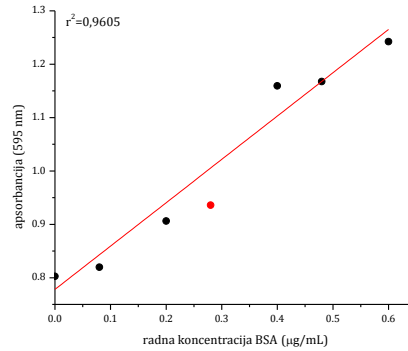
Једињење	Ретенционо време (min)	Напон фрагментора (V)	Јон прекурсор (m/z)	Јон производ (m/z)	Колизна енергија (V)
Гална киселина	0,58	90	169	125	10
Катехин	0,74	150	289	245	10
Протокатехинска киселина	0,79	105	153	109	9
Хлорогенска киселина	0,80	100	353	191	10
Епигалокатехин галат	0,81	165	457	169	16
Епикатехин	0,95	150	289	245	10
2,5-дихидроксибензојева киселина	1,03	100	153	109	9
p-хидроксибензојева киселина	1,08	80	137	93	10
Ескулетин	1,13	105	177	133	15
Кафена киселина	1,18	100	179	135	10
Ванилинска киселина	1,24	100	167	108	15
Сирингинска киселина	1,31	90	197	182	7
p-кумаринска киселина	1,69	90	163	119	9
Умбелиферон	1,73	120	161	133	19
Скополетин	1,77	80	191	176	8
Ферулна киселина	1,90	90	193	134	11
Витексин	1,90	200	431	311	22
Синапинска киселина	1,92	100	223	193	17
Лутеолин-7-O-глукозид	2,13	230	447	285	30
Хиперозид	2,16	200	463	300	30
Кверцетин-3-O-глукозид	2,25	210	463	300	30
Рутин	2,33	135	609	300	42
Апиин	2,60	250	563	269	36
o-кумаринска киселина	2,62	100	163	119	5
Мирицетин	2,67	150	317	179	20
Кверцитрин	2,75	190	447	300	27
Кемферол-3-O-глукозид	2,80	190	447	284	30
Апигенин-7-O-глукозид	2,81	135	431	268	41
Секоизоларицирезинол	2,90	130	361	165	26
3,4-диметоксициметна киселина	2,99	110	207	103	7
Бајкалин	3,40	140	445	269	22
Даидзеин	3,43	145	253	208	31
Матаирезинол	3,66	130	357	122	24
Кверцетин	3,74	130	301	151	15
Нарингенин	3,87	130	271	151	16
Циметна киселина	3,91	100	147	103	5
Лутеолин	4,03	135	285	133	25
Генистеин	4,12	145	269	133	32
Кемферол	4,55	130	285	285	0
Апигенин	4,71	130	269	117	25
Изорамнетин	4,79	160	315	300	21
Кризоеириол	4,82	125	299	284	20
Бајкалеин	5,15	165	269	269	0
Аментофлавон	5,78	220	537	375	35

7. Прилог

7.1.3. Одређивање концентрације протеина методом по Брадфорду

Табела 7.4. Калибрациона крива BSA

Почетна конц. BSA (µg/ml)	Радна конц. BSA (µg/ml)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{kor}	A Asr-Akor (595 nm)
3	0,60	1,033	1,149	1,708	1,297	0,045	1,242
2,4	0,48	1,211	1,249	1,173	1,211	0,044	1,168
2	0,40	1,155	1,159	1,304	1,206	0,047	1,159
1,4	0,28	0,957	0,970	1,014	0,981	0,045	0,936
1	0,20	0,913	0,945	0,998	0,952	0,046	0,906
0,4	0,08	0,859	0,875	0,846	0,860	0,040	0,820
0	0,00	0,826	0,849	0,876	0,850	0,047	0,803
A _{kontrola} (H ₂ O)		0,826	0,849	0,876	0,846		0,849



Графикон 7.1. Калибрациона крива за одређивање садржаја протеина у испитиваним екстрактима: функција зависности апсорбанције од концентрације BSA

Табела 7.5. Садржај протеина у испитиваним екстрактима (mg ек. протеина/ml узорка)

Врста гљиве/ екстракционо средство	Радна конц. µg/mL	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{kor}	A	Очитана конц. BSA (µg/mL)	mg ек. протеина/ml узорка		
<i>G. applanatum</i>	EtOH	2000	1,489	1,409	1,614	1,504	0,220	1,283	0,662	13,24	
		1000	1,387	1,419	1,592	1,466	0,109	1,357	0,756	15,12	
		500	1,402	1,338	1,403	1,381	0,076	1,305	0,690	13,79	
	H ₂ O	2000	0,919	0,886	0,870	0,892	0,055	0,836	0,091	1,82	
		1000	0,856	0,884	0,845	0,862	0,056	0,805	0,051	1,03	
		500	0,830	0,839	0,839	0,836	0,047	0,789	0,031	0,62	
	<i>G. lucidum</i>	EtOH	2000	2,266	2,272	2,184	2,241	0,113	2,128	1,740	34,79
			1000	1,705	1,652	1,689	1,682	0,078	1,604	1,071	21,42
			500	1,355	1,368	1,356	1,360	0,058	1,302	0,686	13,71

14,05±0,97^a

1,16±0,61^b

23,31±10,67^a

7. Прилог

		7. Прилог											
<i>G. pfeifferi</i>	H ₂ O	2000	0,930	1,003	1,026	0,987	0,051	0,935	0,217	4,35	2,82±1,35 ^b		
		1000	0,927	0,851	0,927	0,901	0,047	0,854	0,114	2,27			
		500	0,872	0,890	0,918	0,893	0,057	0,836	0,091	1,82			
	EtOH	2000	1,466	1,563	1,467	1,499	0,069	1,430	0,849	16,38		11,61±5,29 ^a	
		1000	1,273	1,271	1,278	1,247	0,062	1,212	0,571	11,42			
		500	1,083	1,082	1,091	1,085	0,069	1,016	0,321	6,42			
	H ₂ O	2000	0,955	1,012	1,003	0,990	0,082	0,908	0,183	3,65			2,21±1,32 ^b
		1000	0,878	0,931	0,880	0,896	0,056	0,840	0,096	1,92			
		500	0,840	0,843	0,897	0,860	0,054	0,806	0,053	1,06			
EtOH	2000	1,222	1,210	1,232	1,221	0,060	1,161	0,506	10,11	7,17±2,67 ^b			
	1000	1,111	1,074	1,082	1,089	0,070	1,019	0,324	6,49				
	500	0,991	1,027	1,017	1,012	0,055	0,957	0,245	4,90				
H ₂ O	2000	1,036	1,057	1,065	1,053	0,067	0,986	0,282	5,64		3,37±2,15 ^b		
	1000	0,939	0,921	0,956	0,939	0,053	0,886	0,154	3,09				
	500	0,867	0,878	0,859	0,868	0,049	0,819	0,069	1,38				

Резултати су изражени као средња вредност ± SD

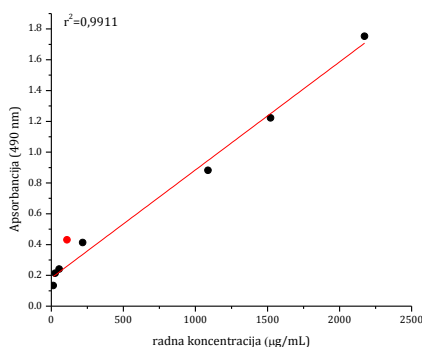
^{a,b} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт (p<0,01, Tukey тест, ANOVA)

7.1.4. Одређивање садржаја шећера (PSA тест)

Табела 7.6. Одређивање концентрације шећера, калибрациона крива глукоза

Почетна конц. Glc (mg/mL)	Радна конц. Glc (µg/ml)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{Sr}	A _{Kor}	A Asr-Akor (490nm)
10	2173,91	2,109	1,312	1,975	1,799	0,046	1,752
7	1521,74	1,370	1,427	1,010	1,269	0,047	1,222
5	1086,96	0,702	1,292	0,780	0,925	0,043	0,882
1	217,39	0,371	0,535	0,460	0,455	0,042	0,413
0,5	108,70	0,433	0,429	0,569	0,477	0,047	0,430
0,25	54,35	0,284	0,322	0,264	0,290	0,050	0,241
0,125	27,17	0,210	0,344	0,229	0,261	0,047	0,214
0,0625	13,59	0,146	0,237	0,238	0,207	0,074	0,133
Aslepa proba (H ₂ O)		0,137	0,222	0,168	0,208		0,184

7. Прилог



Графикон 7.2. Калибрациона крива за одређивање садржаја шећера у испитиваним екстрактима: функција зависности апсорбације од концентрације глукозе

Табела 7.7. Садржај глукозе у испитиваним екстрактима (mg ек. Glc/g с.м.)

Врста гљиве/ екстракционо средство	Радна конц. Glc µg/mL	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{кор}	A	Очитана конц. Glc (µg/mL)	mg ек. Glc/g с.м.		
<i>G. applanatum</i>	EtOH	1086,96	1,602	1,792	1,529	1,641	0,235	1,406	1743,03	2004,48	724,94±80,65 ^a
		869,57	0,665	0,938	1,001	0,868	0,176	0,692	725,99	667,91	
		543,48	0,609	0,648	0,534	0,597	0,115	0,481	424,98	781,97	
	H ₂ O	8695,65	1,661	1,229	1,284	1,391	0,151	1,240	1506,24	173,22	
		6521,74	1,373	1,129	1,002	1,168	0,132	1,036	1215,01	186,30	
		4347,83	0,993	0,928	0,940	0,954	0,101	0,852	954,04	219,43	
<i>G. lucidum</i>	EtOH	543,48	0,862	0,882	0,930	0,891	0,270	0,622	625,04	1150,08	620,77±75,35 ^a
		271,74	0,506	0,543	0,594	0,547	0,236	0,312	183,17	674,05	
		135,87	0,324	0,369	0,351	0,348	0,111	0,237	77,11	567,50	
	H ₂ O	43478,26	2,584	2,643	1,679	2,302	0,311	1,992	2577,72	59,29	
		32608,70	1,759	1,772	1,652	1,727	0,328	1,399	1733,19	53,15	
		21739,13	1,103	1,389	1,162	1,218	0,057	1,019	1191,43	54,81	
<i>G. pfeifferi</i>	EtOH	8695,65	1,459	2,256	1,871	1,862	0,162	1,700	2162,07	248,64	303,87±54,80 ^b
		6521,74	1,921	1,952	2,047	1,973	0,396	1,577	1987,40	304,73	
		3260,87	1,289	1,234	0,979	1,168	0,165	1,003	1168,13	358,23	

7. Прилог

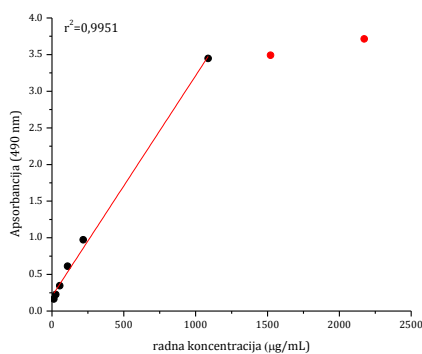
H ₂ O	10869,57	1,880	2,131	2,135	2,049	0,281	1,161	2258,81	207,81	222.33±12.65 °
	8695,65	1,811	1,838	1,650	1,766	0,191	1,019	1984,58	228,23	
	6521,74	1,298	1,677	1,292	1,422	0,182	0,957	1506,23	230,96	
EtOH	5695,65	2,032	1,736	2,348	2,039	0,435	1,603	2024,28	232,79	241.35±21.43 °
	6521,74	1,408	1,682	1,410	1,410	0,285	1,215	1470,82	225,53	
	3260,87	0,936	1,012	0,932	0,932	0,169	0,791	866,53	265,74	
G. resinaceum	13043,48	1,872	2,109	1,952	1,978	0,281	1,697	2157,50	165,41	168.30±5.91 °
	8695,65	1,296	1,507	1,346	1,383	0,197	1,186	1429,59	164,40	
	4347,83	0,831	1,001	0,673	0,832	0,118	0,717	761,31	175,10	

Резултати су изражени као средња вредност ± SD.

^{a, b, c, d} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт (p<0,01, Tukey тест, ANOVA)

Табела 7.8. Одређивање концентрације шећера, калибрациона крива фруктоза

Почетна конц. F _{gu} (mg/mL)	Радна конц. F _{gu} (µg/ml)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{kor}	A Asr-Akor (490nm)
10	2173,91	3,628	3,971	3,700	3,767	0,052	3,714
7	1521,74	3,442	3,726	3,443	3,537	0,046	3,491
5	1086,96	3,572	3,318	3,588	3,493	0,044	3,448
1	217,39	1,299	0,942	0,808	1,016	0,045	0,971
0,5	108,70	0,790	0,616	0,566	0,657	0,045	0,612
0,25	54,35	0,469	0,337	0,373	0,393	0,048	0,345
0,125	27,17	0,306	0,212	0,294	0,271	0,047	0,224
0,0625	13,59	0,190	0,231	0,225	0,215	0,051	0,164
A slepa proba (H ₂ O)		0,137	0,222	0,168	0,208		0,184



Графикон 7.3. Калибрациона крива за одређивање садржаја шећера у испитиваним екстрактима: функција зависности апсорбанције од концентрације фруктозе

7. Прилог

Табела 7.9. Садржај фруктозе у испитиваним екстрактима (mg ек. Fru/g с.м.)

Врста гљиве/ екстракционо средство	Радна конц. Fru µg/mL	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{kor}	A	Очитана конц. Fru (µg/mL)	mg ек. Fru/g с.м.		
<i>G. applanatum</i>	EtOH	869,57	1,602	1,792	1,529	1,641	0,235	1,406	399,27	459,17	452,00±6.81 ^a
		217,39	0,590	0,633	0,687	0,637	0,141	0,496	96,87	445,62	
		108,70	0,440	0,428	0,445	0,438	0,086	0,352	49,05	451,22	
	H ₂ O	10869,57	1,605	1,866	1,506	1,659	0,181	1,478	423,38	38,95	
		8695,65	1,661	1,229	1,284	1,391	0,151	1,240	344,07	39,57	
		65211,65	1,373	1,129	1,002	1,168	0,132	1,036	276,16	42,35	
<i>G. lucidum</i>	EtOH	2173,91	3,913	3,709	3,552	3,725	1,092	2,632	806,91	371,18	375,52±15,25 ^b
		1630,43	2,553	2,552	2,468	2,524	0,394	2,130	639,88	392,46	
		1086,96	1,699	1,736	1,641	1,692	0,300	1,391	394,46	362,91	
	H ₂ O	65217,39	2,697	3,770	3,130	3,199	0,612	2,587	791,74	12,14	
		43478,26	2,584	2,643	1,679	2,302	0,311	1,992	593,89	13,66	
		32608,70	1,759	1,772	1,652	1,727	0,328	1,399	396,98	12,17	
<i>G. pfeifferi</i>	EtOH	10869,57	1,420	1,919	2,142	1,827	0,208	1,619	470,01	43,24	56,78±13,36 ^c
		8695,65	1,459	2,256	1,871	1,862	0,162	1,700	496,97	57,15	
		6521,74	1,921	1,952	2,047	1,973	0,396	1,577	456,25	69,96	
	H ₂ O	10869,57	1,880	2,131	2,135	2,049	0,281	1,768	519,53	47,80	
		8695,65	1,811	1,838	1,650	1,766	0,191	1,575	455,59	52,39	
		6521,74	1,298	1,677	1,292	1,422	0,182	1,240	344,06	52,76	
<i>G. resinaceum</i>	EtOH	8695,65	2,032	1,736	2,348	2,039	0,435	1,603	464,85	53,46	54,91±4,33 ^c
		6521,74	1,408	1,682	1,410	1,410	0,285	1,215	335,81	51,49	
		3260,87	0,936	1,012	0,932	0,932	0,169	0,791	194,92	59,77	
	H ₂ O	13043,48	1,872	2,109	1,952	1,978	0,281	1,697	495,91	38,02	
		8695,65	1,296	1,507	1,346	1,383	0,197	1,186	326,20	37,51	
		4347,83	0,831	1,001	0,673	0,832	0,118	0,717	170,38	39,19	

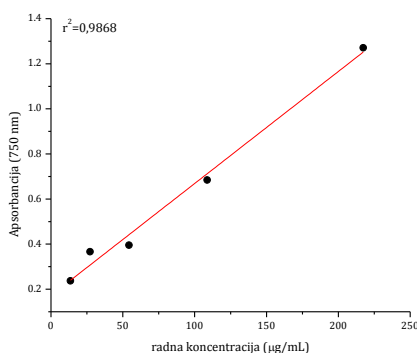
Резултати су изражени као средња вредност ± SD.

^{a, b, c, d} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт (p<0,01, Tukey тест, ANOVA)

7. Прилог

Табела 7.10. Одређивање концентрације шећера, калибрациона крива сахароза

Почетна конц. Sah (mg/mL)	Радна конц. Sah (µg/ml)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{kor}	A Asr-Akor (750nm)
1	217,39	1,109	1,258	1,576	1,315	0,044	1,271
0,5	108,70	0,748	0,700	0,765	0,738	0,054	0,684
0,25	54,35	0,516	0,430	0,421	0,455	0,060	0,395
0,125	27,17	0,437	0,424	0,383	0,415	0,049	0,366
0,0625	13,59	0,292	0,279	0,270	0,280	0,043	0,237
Aslepa proba (H ₂ O)		0,137	0,222	0,168	0,208		0,184



Графикон 7.4. Калибрациона крива за одређивање садржаја шећера у испитиваним екстрактима: функција зависности апсорбације од концентрације сахарозе

Табела 7.11. Садржај сахарозе у испитиваним екстрактима (mg ек. Sah/g с.м.)

Врста гљиве/ екстракционо средство	Радна конц. Sah µg/mL	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{kor}	A	Очитана конц. Sah (µg/mL)	mg ек. Sah/g с.м.		
<i>G. applanatum</i>	EtOH	434,78	1,063	1,117	0,997	1,059	0,117	0,941	154,85	340,35±16,36 ^b	
		217,39	0,590	0,629	0,681	0,633	0,112	0,521	70,32		
		108,70	0,438	0,423	0,441	0,434	0,078	0,356	37,11		
		H ₂ O	10869,57	1,615	1,864	1,506	1,662	0,180	1,482	263,69	25,24±1,33 ^c
			8695,65	1,669	1,229	1,279	1,392	0,152	1,240	241,91	
			65211,65	1,376	1,129	1,009	1,171	0,132	1,039	174,50	
<i>G. lucidum</i>	EtOH	1086,96	2,607	2,846	2,777	2,743	0,482	2,261	420,48	427,60±35,91 ^a	
		271,74	0,863	0,953	0,921	0,912	0,144	0,768	119,94		
		135,87	0,514	0,597	0,516	0,542	0,063	0,479	61,76		

7. Прилог

<i>G. pfeifferi</i>	H ₂ O	43478,26	2,588	2,646	1,679	2,304	0,309	1,996	367,04	8,44	7,95±0,45 ^c	
		32608,70	1,765	1,795	1,627	1,729	0,331	1,398	246,69	7,57		
		21739,13	1,103	1,383	1,172	1,219	0,200	1,019	170,53	7,84		
	EtOH	8695,65	1,454	2,245	1,837	1,845	0,204	1,641	295,63	34,00		
		6521,74	1,923	1,926	2,034	1,961	0,263	1,698	307,17	47,10		
		3260,87	1,298	1,239	0,981	1,173	0,151	1,022	171,00	52,44		
	H ₂ O	10869,57	1,867	2,131	2,110	2,036	0,315	1,721	311,71	28,68		30,69±1,89 ^c
		8695,65	1,806	1,846	1,641	1,765	0,192	1,573	281,95	32,43		
		6521,74	1,287	1,687	1,299	1,424	0,249	1,176	202,04	30,98		
EtOH	8695,65	2,022	1,743	2,352	2,039	0,355	1,684	304,22	34,99			
	6521,74	1,414	1,684	1,380	1,493	0,259	1,234	213,63	32,76			
	3260,87	0,926	1,006	0,939	0,957	0,152	0,805	127,35	39,05			
H ₂ O	8695,65	1,305	1,505	1,343	1,384	0,198	1,186	204,11	23,47	23,50±1,21 ^c		
	4347,83	0,820	0,999	0,666	0,828	0,122	0,706	107,49	24,72			
	2173,91	0,504	0,516	0,475	0,498	0,085	0,413	48,50	22,31			

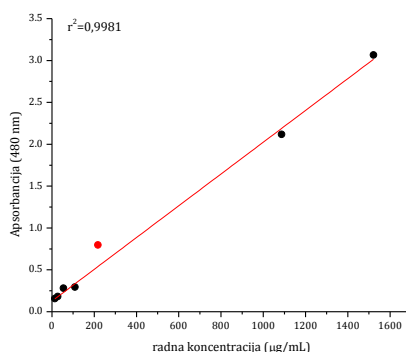
Резултати су изражени као средња вредност ± SD.

^{a, b, c} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт (p<0,01, Tukey тест, ANOVA)

Табела 7.12. Одређивање концентрације шећера, калибрациона крива ксилоза

Почетна конц. Xyl (mg/mL)	Радна конц. Xyl (µg/ml)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{кор}	A Asr-Akor (480nm)
10	2173,91	3,236	4,000	3,616	3,617	0,057	3,560
7	1521,74	2,670	3,924	2,777	3,124	0,057	3,067
5	1086,96	2,409	1,853	2,263	2,175	0,058	2,117
1	217,39	0,833	0,719	1,006	0,853	0,055	0,798
0,5	108,70	0,299	0,422	0,322	0,348	0,052	0,295
0,25	54,35	0,241	0,383	0,366	0,330	0,049	0,281
0,125	27,17	0,214	0,275	0,223	0,237	0,055	0,182
0,0625	13,59	0,174	0,199	0,241	0,205	0,048	0,157
A _{слепа проба} (H ₂ O)		0,137	0,222	0,168	0,208		0,184

7. Прилог



Графикон 7.5. Калибрациона крива за одређивање садржаја шећера у испитиваним екстрактима: функција зависности апсорбације од концентрације ксилозе

Табела 7.13. Садржај ксилозе у испитиваним екстрактима (mg ек. Xyl/g с.м.)

Врста гљиве/ екстракционо средство	Радна конц. Xyl µg/mL	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{кор}	A	Очитана конц. Xyl (µg/mL)	mg ек. Xyl/g с.м.		
<i>G. applanatum</i>	EtOH	3260,87	4,000	4,000	4,000	4,000	1,736	2,264	1115,57	342,11	277,93±33,22 ^a
		1086,96	0,665	0,938	1,001	0,868	0,176	0,692	276,57	254,44	
		543,48	0,609	0,648	0,534	0,597	0,115	0,481	163,81	301,42	
	H ₂ O	10869,57	1,605	1,866	1,506	1,659	0,181	1,478	696,26	64,06	
		8695,65	1,661	1,229	1,284	1,391	0,151	1,240	568,84	65,42	
		65211,65	1,373	1,129	1,002	1,168	0,132	1,036	459,75	70,50	
<i>G. lucidum</i>	EtOH	543,48	0,862	0,885	0,930	0,891	0,270	0,622	238,75	439,31	258,04±16,20 ^a
		271,74	0,506	0,543	0,594	0,547	0,236	0,312	73,23	269,50	
		235,87	0,324	0,369	0,351	0,348	0,111	0,237	33,50	246,59	
	H ₂ O	43478,26	2,584	2,643	1,679	2,302	0,311	1,992	970,20	22,32	
		32608,70	1,759	1,772	1,652	1,727	0,328	1,399	653,85	20,05	
		21739,13	1,103	1,389	1,162	1,218	0,199	1,019	450,92	20,74	
<i>G. pfeifferi</i>	EtOH	10869,57	1,420	1,919	2,142	1,827	0,208	1,619	771,18	70,95	93,16±21,96 ^b
		8695,65	1,459	2,256	1,871	1,862	0,162	1,700	814,51	93,67	
		6521,74	1,921	1,952	2,047	1,973	0,396	1,577	749,08	114,86	
	H ₂ O	10869,57	1,880	2,131	2,135	2,049	0,281	1,768	850,74	78,27	
		8695,65	1,811	1,838	1,650	1,766	0,191	1,575	748,02	86,02	
		6521,74	1,298	1,677	1,292	1,422	0,182	1,240	598,84	87,22	
									83,84±4,86 ^b		

7. Прилог

<i>G. resinaceum</i>	EtOH	1086,96	0,808	0,782	0,726	0,772	0,139	0,633	245,04	225,44	233.18±11.37 ^a
		543,48	0,526	0,483	0,451	0,487	0,061	0,425	133,82	246,24	
		271,74	0,386	0,346	0,324	0,352	0,061	0,291	61,92	227,88	
	H ₂ O	8695,65	1,296	1,507	1,346	1,383	0,197	1,186	540,13	62,12	
		4347,83	0,831	1,001	0,673	0,835	0,118	0,717	289,80	66,65	
		2173,91	0,505	0,521	0,474	0,500	0,082	0,418	129,94	59,77	
										62.85±3.50 ^b	

Резултати су изражени као средња вредност ± SD.

^{a, b, c} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт (p<0,01, Tukey тест, ANOVA)

7. Прилог

7.2 Одређивање антиоксидантне активности екстраката гљива *in vitro*

Табела 7.14. Антиоксидантни потенцијал анализираних екстраката гљива и синтетичког стандарда (PG)

Тест	<i>G. applanatum</i>		<i>G. lucidum</i>		<i>G. pfeifferi</i>		<i>G. resinaceum</i>		PG
	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	
ABTS (mg ек. Т/g с.м.)	159,84±102,59 ^a	59,70±5,92 ^a	151,35±24,81 ^a	16,34±4,63 ^a	49,55±8,11 ^a	86,09±20,62 ^a	32,18±0,48 ^a	27,74±11,56 ^b	-
A.E.A.C (mg AAE/g d.w.)	143,09±2,30 ^a	68,71±31,26 ^b	37,65±5,88 ^b	53,90±4,72 ^b	97,06±4,21 ^a	99,61±42,15 ^a	34,43±11,72 ^b	72,42±16,05 ^b	-
FRAP (mg AAE/g d.w.)	215,96±22,08 ^b	296,19±19,35 ^b	110,70±24,24 ^c	697,78±51,99 ^a	151,53±21,19 ^c	65,23±18,04 ^c	80,17±20,49 ^c	296,68±65,08 ^b	-
TP (mg GAE/g d.w.)	265,38±62,81 ^a	18,73±1,66 ^c	81,95±5,53 ^b	4,26±1,39 ^c	43,69±2,60 ^c	23,13±1,91 ^c	44,01±1,24 ^c	11,43±2,36 ^c	-
TF (mg QE/g d.w.)	54,02±21,23 ^b	166,10±61,22 ^a	73,02±3,65 ^b	14,90±7,12 ^b	26,29±2,74 ^b	10,12±3,79 ^b	22,99±1,15 ^c	4,38±0,85 ^b	-
DPPH (µg/mL)	2,55±0,17 ^a	0,85±0,30 ^a	3,64±0,15 ^a	2,75±0,01 ^a	18,92±0,41 ^b	36,12±2,88 ^c	22,38±2,97 ^b	14,03±2,59 ^b	0,39±0,01 ^a
OH (µg/mL)	3,63±1,69 ^c	0,06±0,02 ^a	5,35±0,014 ^c	0,23±0,01 ^a	0,18±0,05 ^a	0,20±0,01 ^a	0,62±0,08 ^a	1,36±0,34 ^b	0,66±0,01 ^a
O₂^{•-} (µg/mL)	2,20±0,57 ^a	0,44±0,08 ^a	3,38±0,04 ^a	0,75±0,42 ^a	91,89±0,21 ^d	65,71±5,05 ^c	62,47±6,42 ^c	29,96±13,19 ^b	10,0±0,50 ^a
NO (µg/mL)	128,12±67,51 ^a	162,83±23,45 ^a	765,06±154,57 ^b	1108,31±148,29 ^b	369,51±99,99* ^a	273,79±37,43* ^a	215,18±35,77* ^a	830,81±37,33* ^b	6,10±0,84 ^a

*. достигнута IC₂₅

Резултати су изражени као средња вредност ± SD.

^{a, b, c} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт (p<0,01, Tukey тест, ANOVA)

7. Прилог

7.2.1. Одређивање капацитета „хватања“ DPPH• радикала

Табела 7.15. Неутрализација DPPH• радикала екстрактима гљива

Радна конц. (µg/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{кор}	RSC ₁ (%)	RSC ₂ (%)	RSC ₃ (%)	Средња вредност (%)
<i>G. applanatum</i> , EtOH								
40	0,054	0,075	0,049	0,050	97,88	86,76	100,53	95,06
20	0,069	0,058	0,047	0,048	88,89	94,70	100,53	94,70
10	0,067	0,080	0,072	0,047	89,41	82,52	86,76	86,23
5	0,117	0,115	0,109	0,055	67,16	68,22	71,40	68,92
2,5	0,147	0,140	0,137	0,045	45,97	49,68	51,27	48,97
1,25	0,163	0,162	0,160	0,044	36,96	37,49	38,55	37,67
A _{контрола} (EtOH)	0,177	0,192	0,174	0,212				0,189
IC ₅₀ (µg/mL)					2,70	2,57	2,37	2,55±0,17^a
<i>G. applanatum</i> , H ₂ O								
4	0,077	0,078	0,076	0,050	84,35	83,77	84,93	84,35
2	0,105	0,109	0,095	0,054	70,43	68,12	76,23	71,59
1	0,123	0,108	0,171	0,046	55,36	64,06	27,54	59,71
0,5	0,134	0,153	0,161	0,049	50,73	39,71	35,07	41,84
A _{контрола} (H ₂ O)	0,170	0,175	0,149	0,043				0,172
IC ₅₀ (µg/mL)					-	0,64	1,06	0,85±0,30^a
<i>G. lucidum</i> , EtOH								
40	0,053	0,063	0,056	0,045	95,77	90,48	94,18	93,47
20	0,080	0,079	0,070	0,042	79,89	80,42	85,19	81,83
10	0,095	0,103	0,105	0,042	71,96	67,72	66,67	68,78
5	0,126	0,130	0,134	0,046	57,67	55,56	53,44	55,56
2,5	0,152	0,151	0,137	0,043	42,33	42,86	50,26	42,59
A _{контрола} (EtOH)	0,177	0,192	0,174	0,212				0,189
IC ₅₀ (µg/mL)					3,53	3,74	-	3,64±0,15^a
<i>G. lucidum</i> , H ₂ O								
20	0,059	0,055	0,060	0,058	99,42	101,73	98,84	100,00
10	0,055	0,054	0,051	0,043	93,06	93,64	95,38	94,03
5	0,092	0,093	0,100	0,041	70,52	69,94	65,90	68,79
2,5	0,145	0,137	0,138	0,044	41,62	46,24	45,66	44,51
A _{контрола} (H ₂ O)	0,171	0,172	0,181	0,167				0,173
IC ₅₀ (µg/mL)					2,75	-	2,74	2,75±0,01^a
<i>G. pfeifferi</i> , EtOH								
80	0,077	0,083	0,085	0,042	71,07	66,12	64,46	67,22
60	0,080	0,080	0,081	0,048	73,55	73,55	72,73	73,28
30	0,093	0,089	0,098	0,047	61,98	65,29	57,85	63,64
20	0,110	0,108	0,098	0,049	49,59	51,24	59,50	53,44
10	0,115	0,115	0,118	0,042	39,67	39,67	37,19	38,84
5	0,124	0,123	0,119	0,043	33,06	33,88	37,19	34,71
A _{контрола} (EtOH)	0,121	0,121	0,121	0,120				0,121
IC ₅₀ (µg/mL)					19,35	18,87	18,53	18,92±0,41^b

7. Прилог

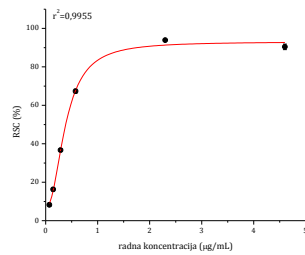
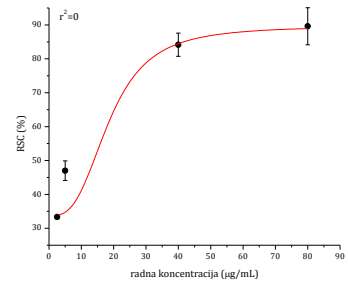
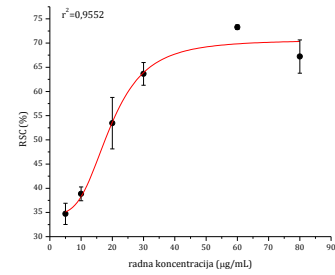
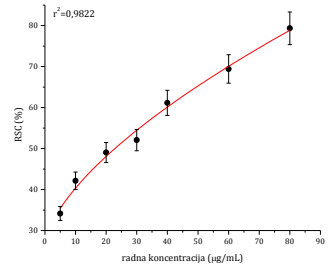
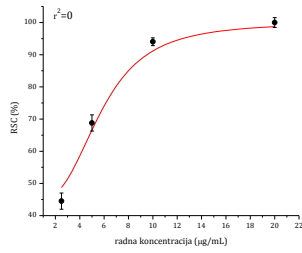
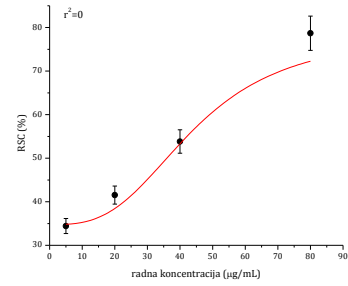
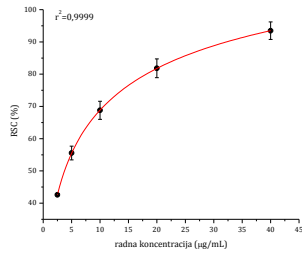
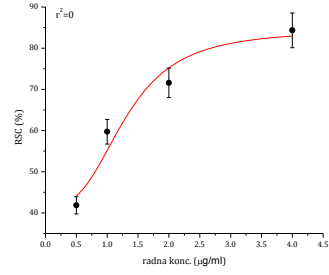
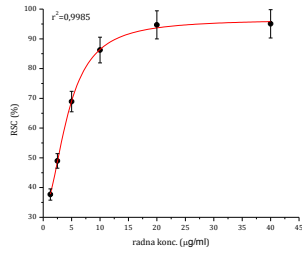
<i>G. pfeifferi</i> , H ₂ O								
80	0,087	0,088	0,095	0,064	81,15	80,33	74,59	78,69
40	0,113	0,103	0,109	0,052	50,00	58,20	53,28	53,83
20	0,118	0,111	0,117	0,044	39,34	45,08	40,16	41,53
5	0,121	0,125	0,120	0,042	35,25	31,97	36,07	34,43
A_{kontrola} (H ₂ O)	0,119	0,121	0,121	0,125				0,122
IC₅₀ (µg/mL)					39,07	33,32	35,97	36,12±2,88^c
<i>G. resinaceum</i> , EtOH								
80	0,070	0,069	0,068	0,044	78,51	79,34	80,17	79,34
60	0,087	0,101	0,094	0,050	69,42	57,85	63,64	69,42
40	0,086	0,091	0,097	0,047	67,77	63,64	58,68	61,16
30	0,100	0,104	0,111	0,042	52,07	48,76	42,98	52,07
20	0,112	0,106	0,114	0,049	47,93	52,89	46,28	49,04
10	0,114	0,126	0,116	0,051	47,93	38,02	46,28	42,15
5	0,126	0,129	0,128	0,048	35,54	33,06	33,88	34,16
A_{kontrola} (EtOH)	0,121	0,121	0,121	0,120				0,121
IC₅₀ (µg/mL)					24,82	19,07	23,25	22,38±2,97^b
<i>G. resinaceum</i> , H ₂ O								
80	0,103	0,094	0,090	0,083	83,61	90,98	94,26	89,62
40	0,085	0,083	0,091	0,067	85,25	86,89	80,33	84,15
20	0,099	0,097	0,100	0,046	56,56	58,20	55,74	-
5	0,118	0,125	0,122	0,057	50,00	44,26	46,72	46,99
2,5	0,131	0,132	0,131	0,050	33,61	32,79	33,61	33,33
A_{kontrola} (H ₂ O)	0,119	0,121	0,121	0,125				0,122
IC₅₀ (µg/mL)					11,24	14,49	16,35	14,03±2,59^b
PG								
4,60	0,064	0,059	0,062	0,045	88,93	91,80	90,48	90,40
2,30	0,057	0,056	0,056	0,046	93,45	94,17	94,02	93,88
1,15	0,057	0,055	0,058	0,058	100,54	101,97	99,78	-
0,58	0,103	0,100	0,101	0,045	66,24	68,25	67,57	67,35
0,29	0,155	0,156	0,158	0,046	37,42	36,79	35,88	36,70
0,14	0,188	0,190	0,191	0,044	17,25	16,11	15,45	16,27
0,07	0,202	0,205	0,205	0,045	9,24	7,62	7,90	8,25
A_{kontrola}	0,215	0,220	0,221					0,219
IC₅₀ (µg/mL)					0,39	0,38	0,39	0,39±0,01^a

Резултати су изражени као средња вредност ± SD.

^{a, b, c} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт (p<0,01, Tukey тест, ANOVA)

7. Прилог

Графикон 7.6. – 7.14. Зависност RSC (%) – радна концентрација ($\mu\text{g}/\text{mL}$) EtOH и H_2O екстраката гљива *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. pfeifferi*, *G. resinaceum* и PG стандарда код DPPH• теста

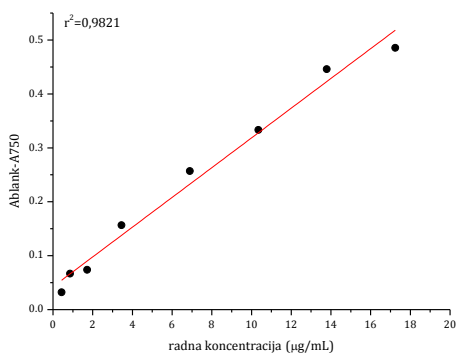


7. Прилог

7.2.2. Одређивање капацитета „хватања“ АВТС^{••} радикала

Табела 7.16. Калибрациона крива тролокса (Т)

Почетна конц. Т µg/mL	Радна конц. Т µg/mL	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{kor}	A A _{sr} -A _{kor} (750 nm)	A _{konačno} A _{kontrola} -A ₇₅₀
500	17,24	0,044	0,048	0,045	0,046	0,038	0,008	0,485
400	14,29	0,088	0,038	0,037	0,088	0,041	0,047	0,446
300	10,71	0,227	0,188	0,184	0,200	0,040	0,160	0,333
200	7,14	0,294	0,253	0,278	0,275	0,039	0,236	0,257
100	3,57	0,409	0,382	0,365	0,385	0,049	0,336	0,157
50	1,79	0,443	0,452	0,486	0,460	0,041	0,419	0,074
25	0,89	0,489	0,486	0,424	0,466	0,040	0,426	0,067
12,5	0,45	0,497	0,424	0,502	0,500	0,039	0,461	0,032
A _{kontrola} (EtOH)		0,511	0,513	0,512	0,436			0,493



Графикон 7.15. Калибрациона крива за одређивање неутрализације АВТС^{••} радикала у испитиваним екстрактима: функција зависности апсорбације од концентрације тролокса

Табела 7.17. Неутрализација АВТС^{••} радикала екстрактима гљива

Врста гљиве/ екстракционо средство	Радна конц. µg/mL	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{kor.}	A ₇₅₀	A _{kontrola} -A ₇₅₀	Очитана конц. Т (µg/mL)	mg ек. Т/g с.м.		
<i>G. applanatum</i>	EtOH	166,67	0,100	0,106	0,104	0,103	0,067	0,036	0,326	11,36	68,17	
		83,33	0,092	0,088	0,094	0,091	0,072	0,019	0,343	11,72	140,69	
		41,67	0,059	0,057	0,059	0,058	0,050	0,134	0,354	11,28	270,66	
	H ₂ O	41,67	0,363	0,371	0,370	0,368	0,045	0,323	0,114	2,59	62,14	
		20,83	0,396	0,406	0,419	0,407	0,043	0,364	0,073	1,10	52,94	
		16,67	0,413	0,402	0,400	0,405	0,040	0,365	0,072	1,07	64,00	
	<i>G. lucidum</i>	EtOH	83,33	0,101	0,077	0,075	0,084	0,047	0,037	0,325	10,23	122,71
			41,67	0,179	0,179	0,164	0,174	0,046	0,128	0,234	6,94	166,54
			16,67	0,289	0,312	0,283	0,295	0,051	0,244	0,118	2,75	164,78

104,43±51,28^a

59,70±5,92^a

151,335±24,81^a

7. Прилог

	H ₂ O	166,67	0,389	0,372	0,392	0,384	0,050	0,334	0,103	2,18	13,07	16,34±4,63 ^a
		83,33	0,447	0,392	0,359	0,399	0,050	0,349	0,088	1,63	19,62	
		41,67	0,405	0,388	0,403	0,399	0,047	0,352	0,085	1,55	37,20	
<i>G. pfeifferi</i>	EtOH	166,67	0,194	0,156	0,127	0,159	0,041	0,118	0,244	7,30	43,81	49,55±8,11 ^a
		83,33	0,260	0,221	0,219	0,233	0,041	0,192	0,170	4,61	55,29	
		41,67	0,266	0,268	0,292	0,275	0,055	0,220	0,142	3,59	86,21	
<i>G. pfeifferi</i>	H ₂ O	166,67	0,118	0,123	0,127	0,123	0,057	0,106	0,371	11,92	71,51	86,09±20,62 ^a
		83,33	0,206	0,219	0,214	0,213	0,050	0,058	0,274	8,39	100,67	
		41,67	0,294	0,265	0,265	0,275	0,061	0,033	0,223	6,55	157,26	
<i>G. resinaceum</i>	EtOH	166,67	0,210	0,236	0,226	0,224	0,051	0,142	0,424	5,31	31,85	32,18±0,48 ^a
		83,33	0,259	0,330	0,292	0,294	0,049	0,074	0,117	2,71	32,52	
		41,67	0,228	0,342	0,269	0,280	0,051	0,045	0,133	3,29	78,96	
<i>G. resinaceum</i>	H ₂ O	166,67	0,338	0,289	0,353	0,327	0,071	0,256	0,181	5,03	30,18	27,74±11,56 ^a
		83,33	0,400	0,368	0,355	0,374	0,067	0,307	0,130	3,16	37,89	
		41,67	0,409	0,439	0,469	0,439	0,062	0,377	0,060	0,63	15,16	

Резултати су изражени као средња вредност ± SD.

^{a, b} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт (p<0,01, Tukey тест, ANOVA)

7. Прилог

7.2.3. Одређивање капацитета „хватања“ ОН• радикала

Табела 7.18. Неутрализација ОН• радикала екстрактима гљива

Радна конц. ($\mu\text{g/mL}$)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kon}	RSC ₁ (%)	RSC ₂ (%)	RSC ₃ (%)	Средња вредност (%)
<i>G. applanatum</i> , EtOH								
47,98	0,121	0,134	0,133	0,062	58,94	64,02	56,10	59,69
23,99	0,114	0,127	0,113	0,071	56,71	64,55	51,22	57,49
12,00	0,109	0,131	0,108	0,042	54,88	64,55	45,73	55,05
6,00	0,133	0,131	0,124	0,050	51,63	56,08	50,61	51,63
3,00	0,110	0,114	0,151	0,036	45,73	60,85	52,44	53,29
1,50	0,147	0,145	0,144	0,036	34,55	42,33	34,76	37,21
A _{kontrola} (EtOH)	0,160	0,168	0,117	0,140				0,164
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)					4,99	5,37	15,76	3,63±1,69^c
<i>G. applanatum</i> , H ₂ O								
q	0,086	0,118	0,082	0,051	60,51	60,00	48,21	58,92
0,10	0,153	0,137	0,149	0,047	52,82	53,33	62,05	54,07
0,05	0,157	0,167	0,179	0,060	41,54	48,21	50,26	45,47
0,02	0,152	0,174	0,173	0,044	40,51	21,03	26,15	30,26
A _{kontrola} (H ₂ O)	0,126	0,212	0,159	0,215				0,195
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)					0,08	0,06	0,05	0,06±0,02^a
<i>G. lucidum</i> , EtOH								
9,60	0,108	0,109	0,127	0,044	60,98	30,37	49,39	60,67
7,20	0,114	0,112	0,116	0,044	57,32	58,54	56,10	57,32
4,80	0,107	0,123	0,114	0,038	57,93	48,17	53,66	50,91
3,60	0,131	0,130	0,123	0,044	46,95	47,56	51,83	48,78
A _{kontrola} (EtOH)	0,160	0,168	0,117	0,140				0,164
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)					5,34	5,36	-	5,35±0,014^c
<i>G. lucidum</i> , H ₂ O								
1,92	0,138	0,161	0,117	0,092	76,41	64,62	87,18	76,07
0,96	0,105	0,116	0,143	0,054	73,85	68,21	54,36	71,03
0,48	0,111	0,141	0,125	0,051	69,23	53,85	62,05	65,64
0,24	0,139	0,137	0,146	0,042	50,26	51,28	46,67	49,40
0,12	0,153	0,167	0,139	0,040	42,05	34,87	49,23	42,05
0,06	0,165	0,190	0,180	0,048	40,00	27,18	32,31	33,16
A _{kontrola} (H ₂ O)	0,126	0,212	0,159	0,215				0,195
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)					0,23	0,23	0,22	0,23±0,01^a
<i>G. pfeifferi</i> , EtOH								
0,48	0,117	0,114	0,099	0,054	55,63	57,75	68,31	60,56
0,38	0,117	0,115	0,110	0,054	55,63	57,04	60,56	57,75
0,24	0,113	0,110	0,119	0,048	54,23	56,34	50,00	53,52
0,19	0,111	0,125	0,170	0,043	52,11	42,25	10,56	52,11
0,12	0,160	0,168	0,144	0,080	43,66	38,03	54,93	40,85
0,10	0,116	0,126	0,113	0,017	30,28	23,24	32,39	28,64
A _{kontrola} (EtOH)	0,224	0,132	0,108	0,105				0,142
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)					0,15	0,16	0,24	0,18±0,05^a

7. Прилог

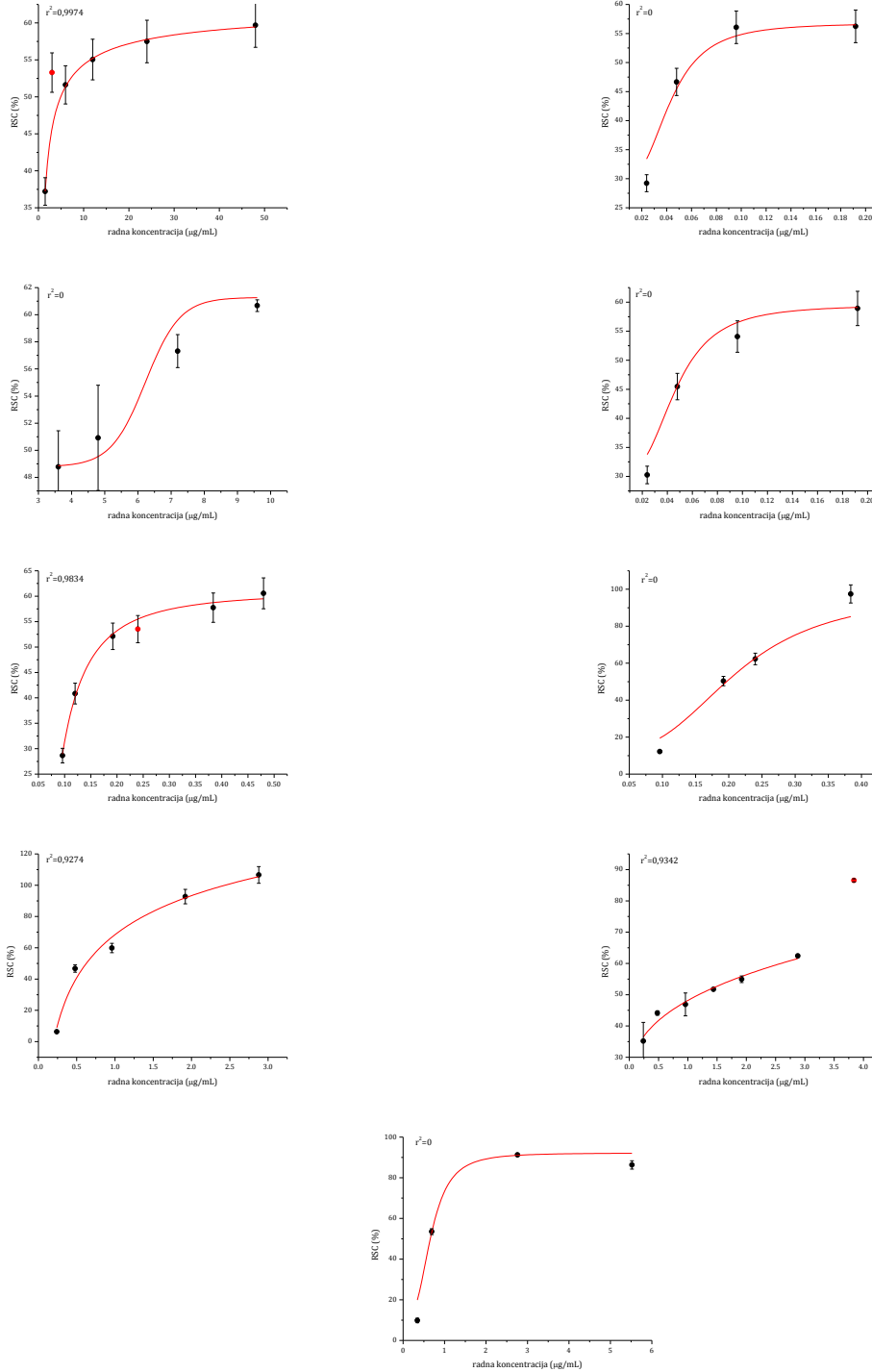
<i>G. pfeifferi</i> , H ₂ O								
0,38	0,115	0,123	0,160	0,129	109,66	104,14	78,62	97,47
0,24	0,116	0,121	0,122	0,065	64,83	61,38	60,69	62,30
0,19	0,117	0,117	0,129	0,049	53,10	53,10	44,83	50,34
0,12	0,133	0,136	0,163	0,050	42,76	40,69	22,07	-
0,10	0,221	0,218	0,198	0,085	6,21	8,28	22,07	12,18
A_{kontrola} (H ₂ O)	0,147	0,225	0,107	0,100				0,145
IC₅₀ (µg/mL)					0,19	0,19	0,21	0,20±0,01^a
<i>G. resinaceum</i> , EtOH								
2,88	0,132	0,128	0,138	0,142	107,04	109,86	102,82	106,57
1,92	0,127	0,125	0,124	0,115	91,55	92,96	93,66	92,72
1,44	0,187	0,197	0,200	0,142	71,83	64,79	62,68	-
0,96	0,118	0,117	0,125	0,063	61,27	61,97	56,34	59,86
0,48	0,142	0,152	0,119	0,062	43,66	36,62	59,86	46,71
0,24	0,196	0,198	0,194	0,063	6,34	4,93	7,75	6,34
A_{kontrola} (EtOH)	0,167	0,303	0,132	0,128				0,142
IC₅₀ (µg/mL)					0,64	0,69	0,53	0,62±0,08^a
<i>G. resinaceum</i> , H ₂ O								
3,84	0,123	0,118	0,117	0,098	82,76	86,21	86,90	86,55
2,88	0,108	0,109	0,136	0,054	62,76	62,07	43,45	62,41
1,92	0,125	0,124	0,127	0,060	55,17	55,86	53,79	54,94
1,44	0,116	0,141	0,177	0,046	51,72	34,48	9,66	51,72
0,96	0,116	0,124	0,114	0,041	48,28	42,76	49,66	46,90
0,48	0,122	0,123	0,121	0,041	44,14	43,45	44,83	44,14
0,24	0,150	0,135	0,150	0,051	31,72	42,07	31,72	35,17
A_{kontrola} (H ₂ O)	0,147	0,225	0,107	0,100				0,145
IC₅₀ (µg/mL)					1,07	1,73	1,28	1,36±0,34^b
PG								
5,52	0,064	0,059	0,062	0,045	84,23	88,33	86,44	86,33
2,76	0,057	0,056	0,056	0,046	90,67	91,69	91,48	91,28
1,38	0,057	0,055	0,058	0,058	101,09	102,80	99,69	-
0,69	0,103	0,100	0,101	0,045	53,50	54,78	53,81	53,5
0,35	0,155	0,156	0,158	0,046	9,84	9,98	8,67	9,84
A_{kontrola}	0,215	0,220	0,221	0,045				0,219
IC₅₀ (µg/mL)					0,67	0,65	0,66	0,66±0,01^a

Резултати су изражени као средња вредност ± SD.

^{a, b, c} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт (p<0,01)

7. Прилог

Графикон 7.16. – 7.24. Зависност RSC (%) – радна концентрација ($\mu\text{g/mL}$) EtOH и H₂O екстракта гљива *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. pfeifferi*, *G. resinaceum* и PG стандарда код OH• теста



7. Прилог

7.2.4. Одређивање капацитета „хватања“ O₂^{•-} радикала

Табела 7.19. Неутрализација O₂^{•-} радикала екстрактима гљива

Радна конц. (µg/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁ (%)	RSC ₂ (%)	RSC ₃ (%)	Средња вредност (%)
<i>G. applanatum</i> , EtOH								
6,62	0,072	0,068	0,054	0,050	86,83	89,22	97,60	91,22
3,31	0,062	0,090	0,130	0,049	92,22	75,45	54,50	73,05
1,66	0,137	0,149	0,140	0,049	47,31	40,12	45,51	44,31
0,82	0,164	0,175	0,167	0,052	32,93	26,35	31,14	30,14
0,41	0,174	0,136	0,165	0,046	23,35	46,11	28,74	26,05
A _{kontrola} (EtOH)	0,168	0,164	0,169	0,167				0,167
IC ₅₀ (µg/mL)					1,67	2,12	2,81	2,20±0,57^a
<i>G. applanatum</i> , H ₂ O								
0,66	0,086	0,118	0,082	0,051	76,35	54,73	79,05	70,05
0,33	0,153	0,137	0,149	0,047	28,38	39,19	31,08	35,14
0,17	0,157	0,167	0,179	0,060	34,46	27,70	19,59	27,25
0,08	0,152	0,174	0,173	0,044	27,03	12,16	12,84	17,34
A _{kontrola} (H ₂ O)	0,129	0,159	0,144	0,158				0,148
IC ₅₀ (µg/mL)					0,35	0,50	0,47	0,44±0,08^a
<i>G. lucidum</i> , EtOH								
6,62	0,075	0,075	0,058	0,041	79,64	79,64	89,82	83,03
3,31	0,133	0,118	0,132	0,033	40,12	49,10	40,72	43,31
1,66	0,160	0,150	0,168	0,032	23,35	29,34	18,56	23,75
0,83	0,156	0,172	0,156	0,028	23,35	13,77	23,35	20,16
0,41	0,167	0,164	0,167	0,040	23,95	25,75	23,95	24,55
A _{kontrola} (EtOH)	0,168	0,164	0,169	0,167				0,167
IC ₅₀ (µg/mL)					3,41	3,34	3,39	3,38±0,04^a
<i>G. lucidum</i> , H ₂ O								
6,62	0,051	0,051	0,048	0,037	90,54	90,54	92,57	91,22
3,31	0,049	0,053	0,055	0,022	87,16	84,46	83,11	83,78
1,66	0,052	0,093	0,100	0,047	96,62	68,92	64,19	76,58
0,41	0,083	0,129	0,081	0,040	70,95	39,86	72,30	55,41
0,21	0,149	0,132	0,130	0,36	23,65	35,14	36,49	31,76
A _{kontrola} (H ₂ O)	0,129	0,159	0,144	0,158				0,148
IC ₅₀ (µg/mL)					0,30	0,80	1,14	0,75±0,42^a
<i>G. pfeifferi</i> , EtOH								
132,45	0,085	0,162	0,132	0,051	76,43	22,38	43,36	59,90
105,96	0,185	0,182	0,191	0,122	55,94	58,04	51,75	56,99
66,23	0,143	0,142	0,143	0,051	35,66	36,36	35,66	35,90
52,98	0,143	0,148	0,144	0,049	34,27	30,77	33,57	32,87
33,11	0,162	0,162	0,159	0,062	30,07	30,07	32,17	30,77
26,49	0,159	0,163	0,160	0,056	27,97	25,17	27,27	26,81
16,56	0,184	0,185	0,181	0,067	18,18	17,48	20,28	18,65
A _{kontrola} (EtOH)	0,149	0,137	0,144	0,140				0,143
IC ₅₀ (µg/mL)					92,03	91,74	-	91,89±0,21^d

7. Прилог

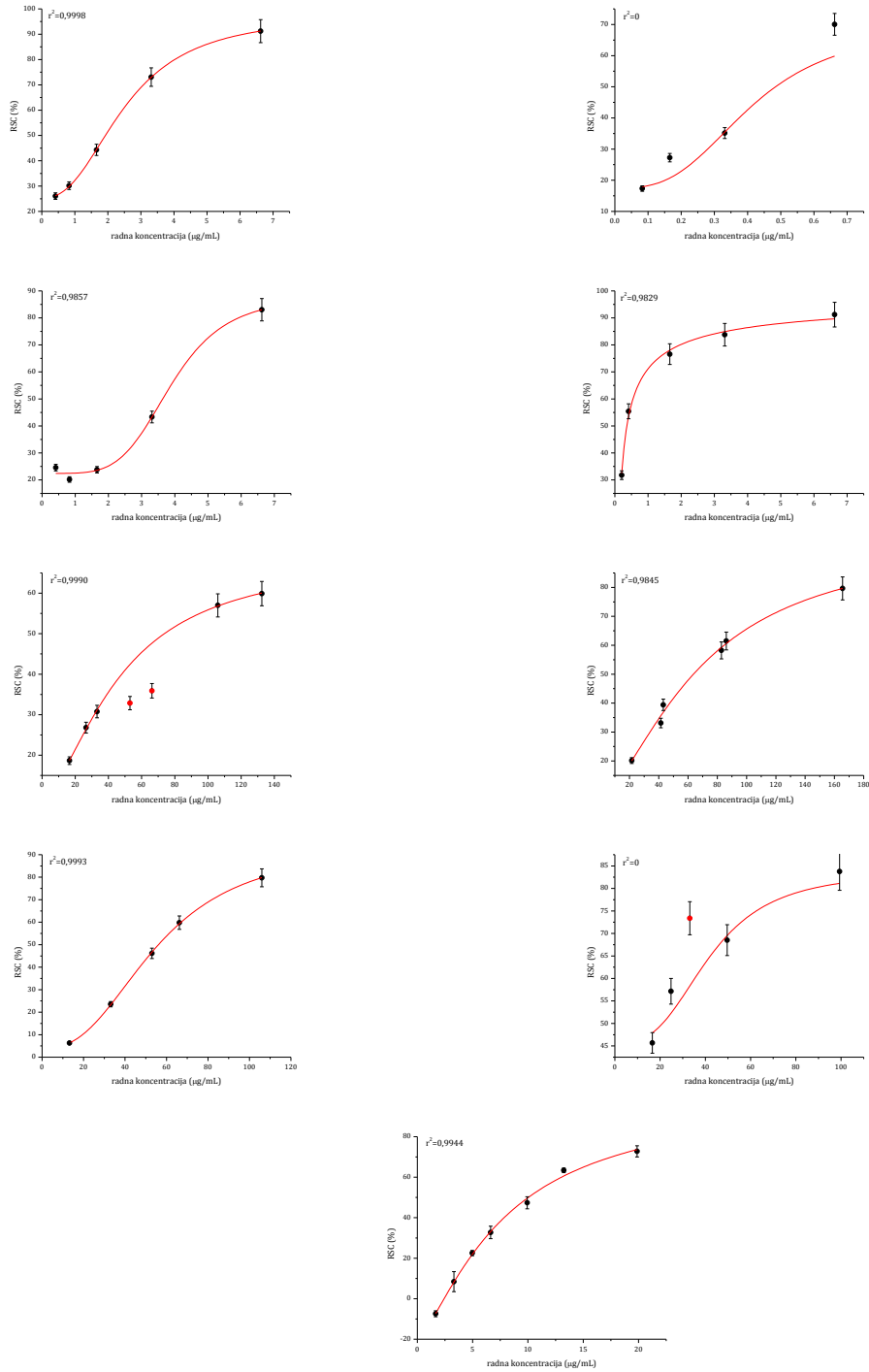
<i>G. pfeifferi</i> , H ₂ O								
165,56	0,086	0,076	0,070	0,046	74,03	80,52	84,42	79,65
86,09	0,112	0,096	0,099	0,043	55,19	65,58	63,64	61,47
82,78	0,111	0,112	0,105	0,045	57,14	56,49	61,04	58,23
43,05	0,129	0,136	0,123	0,036	39,61	35,06	43,51	39,39
41,39	0,166	0,152	0,165	0,058	29,87	38,96	30,52	33,12
21,52	0,169	0,142	0,160	0,046	20,13	37,66	25,97	20,13
A_{kontrola} (H ₂ O)	0,154	0,153	0,153	0,154				0,154
IC₅₀ (µg/mL)					69,28	80,38	62,14	65,71±5,05^c
<i>G. resinaceum</i> , EtOH								
105,96	0,154	0,232	0,193	0,164	106,99	52,45	79,72	79,72
66,23	0,197	0,219	0,176	0,129	52,45	37,06	67,13	59,79
52,98	0,197	0,231	0,160	0,120	46,15	22,38	72,03	46,15
33,11	0,226	0,189	0,219	0,102	13,29	39,16	18,18	23,54
13,25	0,218	0,199	0,216	0,077	1,40	14,69	2,80	6,29
A_{kontrola} (EtOH)	0,149	0,137	0,144	0,140				0,143
IC₅₀ (µg/mL)					61,11	69,46	56,84	62,47±6,42^c
<i>G. resinaceum</i> , H ₂ O								
99,34	0,161	0,142	0,135	0,121	74,03	86,36	90,91	83,77
49,67	0,148	0,156	0,171	0,111	75,97	70,78	61,04	68,51
33,11	0,165	0,132	0,149	0,124	73,38	94,81	83,77	73,38
24,83	0,146	0,130	0,189	0,089	62,99	73,38	35,06	57,14
16,56	0,159	0,123	0,179	0,070	42,21	65,58	29,22	45,67
A_{kontrola} (H ₂ O)	0,154	0,153	0,153	0,154				0,154
IC₅₀ (µg/mL)					20,63	-	39,28	29,96±13,19^b
PG								
19,87	0,115	0,101	0,103	0,032	69,60	74,73	73,99	69,60
13,25	0,137	0,134	0,131	0,034	62,27	63,37	64,47	62,27
9,93	0,172	0,172	0,186	0,033	49,08	49,08	43,96	49,08
6,62	0,206	0,221	0,220	0,032	36,26	30,77	31,14	36,26
4,97	0,210	0,242	0,247	0,033	35,16	23,44	21,61	35,16
3,31	0,298	0,272	0,279	0,033	2,93	12,45	9,89	2,93
1,66	0,331	0,324	0,324	0,033	-9,16	-6,59	-6,59	-9,16
A_{kontrola}	0,318	0,304	0,293					0,305
IC₅₀ (µg/mL)					9,47	10,09	10,45	10,00±0,50^a

Резултати су изражени као средња вредност ± SD.

^{a, b, c, d} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт (p<0,01)

7. Прилог

Графикон 7.25. – 7.33. Зависност RSC (%) – радна концентрација ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ЕтОН и H_2O екстракта гљива *G. arplanatum*, *G. lucidum*, *G. pfeifferi*, *G. resinaceum* и PG стандарда код O_2^- теста



7. Прилог

7.2.5. Одређивање капацитета „хватања“ NO• радикала

Табела 7.20. Неутрализација NO• радикала екстрактима гљива

Радна конц. (µg/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁ (%)	RSC ₂ (%)	RSC ₃ (%)	Средња вредност (%)
<i>G. applanatum</i> , EtOH								
1477,83	0,529	0,546	0,572	0,124	66,11	64,69	62,51	64,44
1182,27	0,548	0,545	0,542	0,137	66,11	66,36	66,61	66,36
886,70	0,567	0,619	0,626	0,119	62,51	58,16	57,57	62,51
738,92	0,629	0,636	0,642	0,137	58,83	58,24	57,74	57,74
369,46	0,616	0,649	0,675	0,130	59,33	56,57	54,39	56,76
184,73	0,606	0,647	0,685	0,089	56,74	53,31	50,13	53,39
18,47	0,771	0,828	0,925	0,076	41,84	37,84	28,95	35,96
A _{kontrola} (EtOH)	1,255	1,174	1,175	1,177				1,195
IC ₅₀ (µg/mL)					63,66	122,40	198,31	128,12± 67,51^a
<i>G. applanatum</i> , H ₂ O								
591,13	0,717	0,691	0,773	0,625	92,31	94,48	87,63	91,47
443,35	0,971	1,043	1,021	0,835	88,63	82,61	84,45	85,23
295,67	0,958	0,933	1,000	0,521	63,46	65,55	59,95	64,51
147,78	1,207	1,167	1,216	0,601	49,33	52,68	48,58	50,20
14,78	0,929	0,930	0,970	0,089	29,77	29,68	26,34	28,60
A _{kontrola} (H ₂ O)	1,223	1,209	1,194	1,157				1,196
IC ₅₀ (µg/mL)					164,80	138,46	185,24	162,83± 23,45^a
<i>G. lucidum</i> , EtOH								
1477,83	0,426	0,446	0,502	0,082	71,21	69,54	64,85	68,54
1182,27	0,521	0,536	0,608	0,071	62,34	61,09	55,06	59,50
886,70	0,628	0,649	0,660	0,129	58,24	56,49	55,56	57,36
738,92	0,708	0,723	0,749	0,093	48,54	47,28	45,10	46,19
369,46	0,835	0,924	0,971	0,082	36,99	29,54	25,61	30,71
184,73	1,150	1,166	1,165	0,082	10,63	9,29	9,37	9,76
A _{kontrola} (EtOH)	1,255	1,174	1,175	1,177				1,195
IC ₅₀ (µg/mL)					610,20	765,65	919,34	765,06± 154,57^b
<i>G. lucidum</i> , H ₂ O								
4433,50	0,310	0,326	0,378	0,063	79,35	78,01	73,66	77,01
2216,75	0,380	0,489	0,542	0,058	73,08	63,96	59,53	65,52
1477,83	0,590	0,743	0,699	0,057	55,43	42,64	46,32	-
738,92	0,675	0,706	0,712	0,069	49,33	46,74	46,24	47,44
369,46	0,677	0,795	0,823	0,052	47,74	37,88	35,03	40,22
184,73	0,838	0,848	0,825	0,048	33,95	33,11	35,03	34,03
18,47	0,896	0,877	0,848	0,062	30,27	31,86	34,28	32,13
A _{kontrola} (H ₂ O)	1,223	1,209	1,194	1,157				1,196
IC ₅₀ (µg/mL)					615,57	1003,45	1213,17	1108,31± 148,29^b
<i>G. pfeifferi</i> , EtOH								
738,92	0,689	0,727	0,733	0,062	47,53	44,35	43,85	45,24
591,13	0,803	0,818	0,847	0,077	39,25	37,99	35,56	37,60
443,35	0,953	1,011	1,011	0,085	27,36	22,51	22,51	22,51
295,57	0,943	1,017	1,032	0,070	26,95	20,75	19,50	22,51
147,78	1,042	1,073	1,052	0,077	19,25	16,65	18,41	18,10

7. Прилог

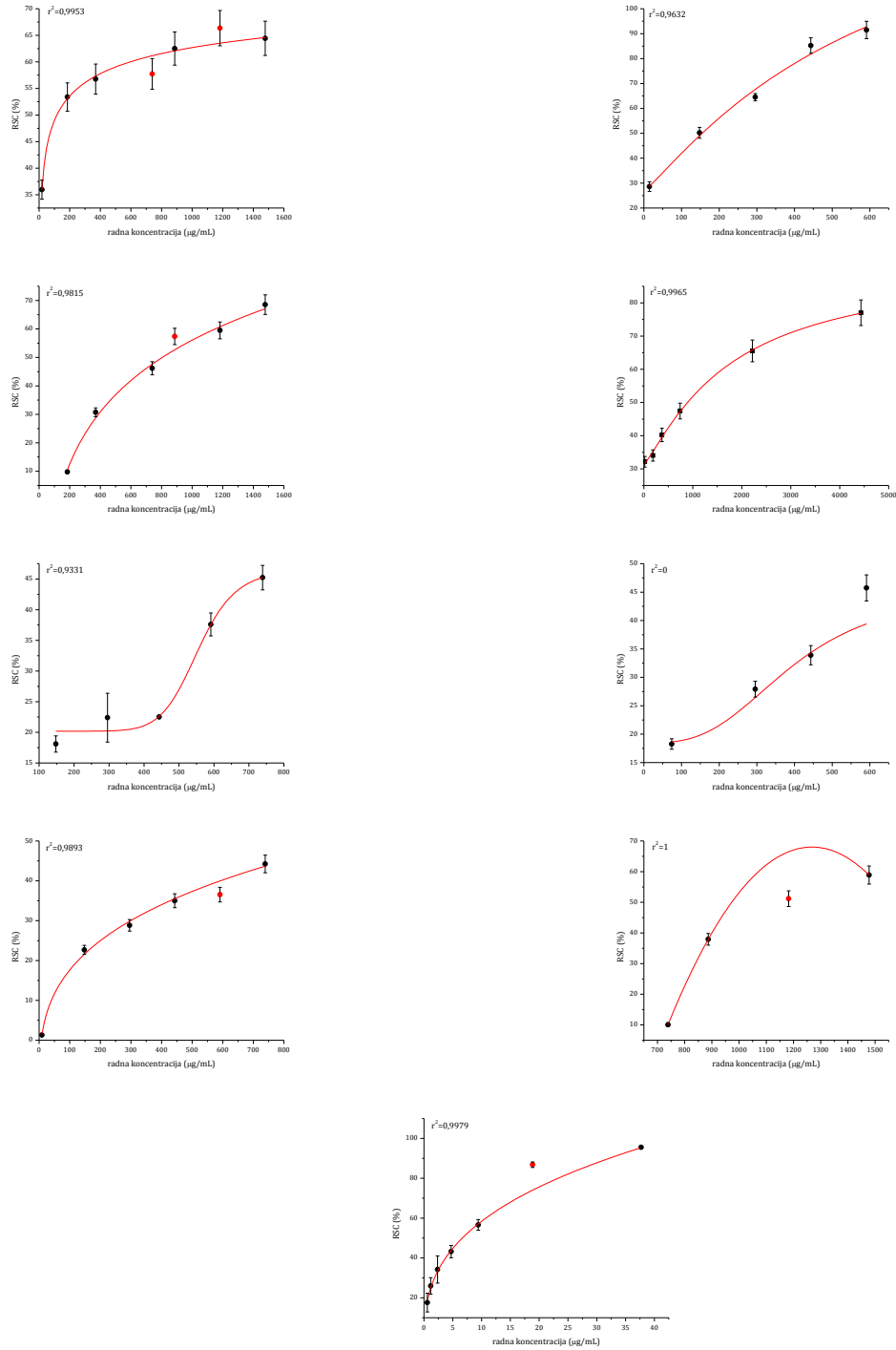
A kontrola (EtOH)	1,255	1,174	1,175	1,177					1,195
IC₂₅ (µg/mL)					282,51	347,28	478,75		369,51± 99,99^a
<i>G. pfeifferi</i> , H ₂ O									
591,13	0,715	0,731	0,726	0,075	46,49	45,15	45,57		45,74
443,35	0,823	0,857	0,896	0,075	36,87	34,03	30,77		33,89
295,57	0,940	0,941	0,939	0,078	27,93	27,84	28,01		27,93
147,78	0,933	0,976	0,981	0,081	28,76	25,17	24,75		-
73,89	1,064	1,013	1,047	0,064	16,37	20,64	17,79		18,27
A kontrola (H ₂ O)	1,223	1,209	1,194	1,157					1,196
IC₂₅ (µg/mL)					259,09	254,94	316,33		273,79± 37,43^a
<i>G. resinaceum</i> , EtOH									
738,92	0,715	0,727	0,746	0,063	45,44	44,44	42,85		44,24
591,13	0,818	0,853	0,839	0,070	37,41	34,48	35,65		36,53
443,35	0,816	0,839	0,858	0,061	36,82	34,90	33,31		35,01
295,57	0,917	0,933	0,950	0,083	30,21	28,87	27,45		28,84
147,78	1,000	0,984	0,943	0,068	22,01	23,35	26,78		22,68
18,47	0,940	0,987	1,028	0,054	25,86	21,92	18,49		-
9,24	1,165	1,256	1,321	0,068	8,20	0,59	-4,85		1,31
A kontrola (EtOH)	1,255	1,174	1,175	1,177					1,195
IC₂₅ (µg/mL)					194,11	194,96	256,48		215,18± 35,77^a
<i>G. resinaceum</i> , H ₂ O									
1477,83	0,544	0,565	0,591	0,075	60,79	59,03	56,86		58,89
1182,27	0,581	0,636	0,729	0,065	56,86	52,26	44,48		51,20
886,70	0,742	0,805	0,893	0,071	43,90	38,63	31,27		37,93
738,92	1,108	1,174	1,154	0,070	13,21	7,69	9,36		10,09
A kontrola (H ₂ O)	1,223	1,209	1,194	1,157					1,196
IC₅₀ (µg/mL)					793,07	831,65	867,72		830,81± 37,33^b
PG									
37,70	0,275	0,275	0,268	0,103	95,43	95,46	95,64		95,51
18,85	0,564	0,553	0,650	0,091	87,47	87,77	85,21		86,82
9,43	1,685	1,670	1,852	0,098	57,94	58,34	53,52		56,60
4,71	2,153	2,186	2,369	0,091	45,38	44,50	39,66		43,18
2,36	2,281	2,764	2,682	0,092	42,01	29,23	31,38		34,21
1,18	2,729	2,947	3,032	0,108	30,55	24,77	22,51		25,94
0,59	3,011	3,287	3,341	0,103	22,95	15,63	14,21		17,60
A kontrola	3,768	3,830	4,000						3,866
IC₅₀ (µg/mL)					5,27	6,10	6,94		6,10 ±0,84^a

Резултати су изражени као средња вредност ± SD.

^{a, b} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт (p<0,01, Tukey тест, ANOVA)

7. Прилог

Графикон 7.34. – 7.42. Зависност RSC (%) – радна концентрација ($\mu\text{g}/\text{mL}$) EtOH и H₂O екстракта гљива *G. arplanatum*, *G. lucidum*, *G. pfeifferi*, *G. resinaceum* и PG стандарда код NO• теста

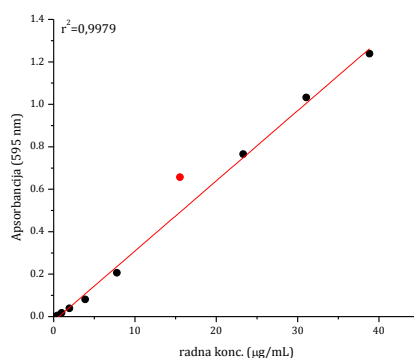


7. Прилог

7.2.6. Редукциони потенцијал (FRAP тест)

Табела 7.21. Калибрациона крива аскорбинске киселине (АК)

Почетна конц. АК ($\mu\text{g/mL}$)	Радна конц. АК ($\mu\text{g/mL}$)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{Sr}	A _{kor}	A A _{Sr} -A _{kontrola} (595 nm)
0	0,00	0,095	0,092	0,092	0,093	0,045	0,000
12,5	0,49	0,102	0,097	0,098	0,099	0,044	0,006
25	0,97	0,115	0,111	0,107	0,111	0,047	0,018
50	1,94	0,138	0,126	0,128	0,131	0,045	0,039
100	3,88	0,173	0,176	0,174	0,174	0,046	0,081
200	7,77	0,306	0,294	0,279	0,293	0,040	0,207
400	15,53	0,489	0,516	0,495	0,500	0,047	0,656
600	23,30	0,845	0,882	0,835	0,854	0,041	0,765
800	31,07	1,156	1,101	1,095	1,117	0,048	1,032
1000	38,84	1,276	1,331	1,333	1,313	0,050	1,239
A _{kontrola} (H ₂ O)		0,092	0,094	0,093	0,093		0,093



Графикон 7.43. Калибрациона крива за одређивање редокс потенцијала испитиваних екстраката: функција зависности апсорбанције од концентрације аскорбинске киселине

Табела 7.22. Редукциони потенцијал испитиваних екстраката (FRAP тест) (mg ек. АК/g с.м.)

Врста гљиве/ екстракционо средство	Радна конц. $\mu\text{g/mL}$	A ₁	A ₂	A ₃	A _{Sr}	A _{kont}	A	Очитана конц. АК ($\mu\text{g/mL}$)	mg ек. АК/g с.м.
<i>G. aprinatum</i>	EtOH	77,67	0,586	0,593	0,588	0,589	0,095	15,59	200,75
		38,84	0,316	0,343	0,355	0,338	0,095	7,99	205,86
		19,42	0,225	0,237	0,224	0,229	0,095	4,69	241,28
	H ₂ O	38,84	0,426	0,437	0,440	0,434	0,093	10,97	282,50
		19,42	0,245	0,294	0,273	0,271	0,093	6,02	309,87
		9,71	0,223	0,223	0,227	0,224	0,093	4,61	475,29

215,96±22,08^b

296,19±19,35^b

7. Прилог

	EtOH	77,67	0,313	0,296	0,293	0,301	0,095	0,206	6,86	88,38	110,70±24,24 ^c
		38,84	0,255	0,247	0,245	0,249	0,095	0,154	5,30	136,49	
		19,42	0,143	0,144	0,141	0,143	0,095	0,048	2,08	107,22	
<i>G. lucidum</i>	H ₂ O	77,67	1,799	1,628	1,747	1,725	0,093	1,632	50,03	644,11	697,78±51,99 ^a
		38,84	0,935	0,936	1,044	0,972	0,093	0,879	27,24	701,32	
		19,42	0,530	0,553	0,572	0,552	0,093	0,459	14,52	747,91	
<i>G. pfeifferi</i>	EtOH	77,67	0,449	0,408	0,373	0,410	0,095	0,315	10,16	130,86	151,53±21,19 ^c
		38,84	0,277	0,267	0,257	0,267	0,095	0,172	5,85	150,52	
		19,42	0,188	0,184	0,183	0,185	0,095	0,090	3,36	173,21	
<i>G. pfeifferi</i>	H ₂ O	77,67	0,191	0,213	0,192	0,199	0,093	0,106	3,84	49,41	65,23±18,04 ^c
		38,84	0,152	0,153	0,147	0,151	0,093	0,058	2,38	61,40	
		19,42	0,134	0,122	0,123	0,126	0,093	0,033	1,65	84,88	
<i>G. resinaceum</i>	EtOH	77,67	0,241	0,233	0,237	0,237	0,095	0,142	4,94	63,57	80,17±20,49 ^c
		38,84	0,168	0,174	0,164	0,169	0,095	0,074	2,87	73,87	
		19,42	0,144	0,138	0,138	0,140	0,095	0,045	2,00	103,06	
<i>G. resinaceum</i>	H ₂ O	77,67	0,647	0,656	0,652	0,652	0,093	0,559	17,55	225,95	296,68±65,08 ^b
		38,84	0,462	0,478	0,469	0,470	0,093	0,377	12,04	310,04	
		19,42	0,297	0,301	0,299	0,299	0,093	0,206	6,87	354,04	

Резултати су изражени као средња вредност ± SD.

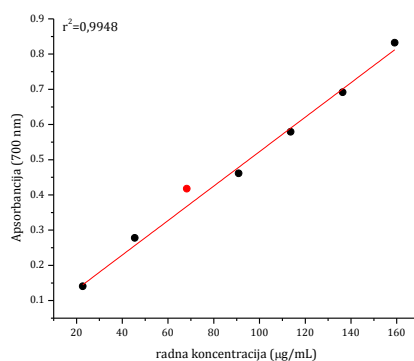
^{a, b, c} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт (p<0,01, Tukey тест, ANOVA)

7. Прилог

7.2.7. Редукциони потенцијал (АЕАС тест)

Табела 7.23. Калибрациона крива аскорбинске киселине (АК)

Почетна конц. АК (mg/mL)	Радна конц. АК (µg/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{Sr}	A _{Kor}	A A _{Sr} -A _{kontrola} (700 nm)
3,5	159,09	0,873	0,915	0,837	0,875	0,043	0,832
3,0	136,36	0,699	0,790	0,735	0,741	0,050	0,691
2,5	113,64	0,564	0,649	0,645	0,619	0,040	0,579
2,0	90,91	0,476	0,514	0,529	0,506	0,045	0,461
1,5	68,18	0,393	0,441	0,590	0,475	0,057	0,418
1,0	45,45	0,382	0,311	0,294	0,329	0,051	0,278
0,5	22,73	0,185	0,187	0,178	0,183	0,043	0,140
A _{kontrola} (H ₂ O)		0,081	0,090	0,092	0,091		0,089



Графикон 7.44. Калибрациона крива за одређивање редокс потенцијала испитиваних екстраката: функција зависности апсорбације од концентрације аскорбинске киселине

Табела 7.24. Редукциони потенцијал испитиваних екстраката (АЕАС тест) (mg ек. АК/g с.м.)

Врста гљиве/ екстракционо средство	Радна конц. µg/mL	A ₁	A ₂	A ₃	A _{Sr}	A _{Kont}	A	Очитана конц. АК (µg/mL)	mg ек. АК/g с.м.				
<i>G. aprinatum</i>	EtOH	227,27	0,205	0,293	0,207	0,235	0,045	0,190	31,94	140,54	143,09±2,30 ^a		
		113,64	0,171	0,164	0,146	0,160	0,046	0,114	16,48	145,00			
		56,82	0,116	0,112	0,119	0,116	0,042	0,074	8,17	143,72			
	H ₂ O	113,64	0,078	0,089	0,084	0,084	0,039	0,045	2,24	19,71			
		56,82	0,078	0,082	0,094	0,085	0,038	0,047	2,65	46,60			
		28,41	0,072	0,075	0,097	0,081	0,035	0,046	2,58	90,81			
	<i>G. lucidum</i>	EtOH	113,64	0,091	0,082	0,095	0,089	0,037	0,052	3,81		33,49	37,65±5,88 ^b
			56,82	0,090	0,095	0,074	0,086	0,041	0,045	2,38		41,81	
			28,41	0,087	0,070	0,069	0,075	0,039	0,036	0,54		18,87	

7. Прилог

<i>G. pfeifferi</i>	H ₂ O	56,82	0,080	0,089	0,083	0,084	0,047	0,037	0,67	11,83	53,90±4,72 ^b	
		28,41	0,076	0,071	0,107	0,085	0,043	0,042	1,63	57,21		
		22,72	0,065	0,112	0,067	0,081	0,042	0,039	1,15	50,57		
	EtOH	227,27	0,266	0,154	0,166	0,195	0,057	0,138	21,38	94,08		
		113,64	0,208	0,172	0,161	0,180	0,091	0,089	11,37	100,04		
		56,82	0,204	0,162	0,161	0,176	0,089	0,087	10,82	190,49		
	H ₂ O	227,27	0,194	0,163	0,199	0,185	0,074	0,111	15,86	69,80		97,06±4,21 ^a
		113,64	0,184	0,165	0,154	0,168	0,062	0,106	14,71	129,41		
		56,82	0,210	0,168	0,192	0,190	0,058	0,132	20,09	353,55		
EtOH	227,27	0,113	0,103	0,115	0,110	0,051	0,058	5,03	22,14			
	113,64	0,106	0,108	0,116	0,110	0,069	0,059	5,17	45,48			
	28,41	0,117	0,102	0,110	0,110	0,071	0,039	1,01	35,66			
H ₂ O	227,27	0,115	0,131	0,125	0,124	0,052	0,072	7,76	34,13	34,43±11,72 ^b		
	113,64	0,119	0,101	0,106	0,109	0,041	0,068	6,94	61,07			
	56,82	0,096	0,094	0,104	0,098	0,041	0,057	4,76	83,77			
EtOH	227,27	0,113	0,103	0,115	0,110	0,051	0,058	5,03	22,14			
	113,64	0,106	0,108	0,116	0,110	0,069	0,059	5,17	45,48			
	28,41	0,117	0,102	0,110	0,110	0,071	0,039	1,01	35,66			
H ₂ O	227,27	0,115	0,131	0,125	0,124	0,052	0,072	7,76	34,13		72,42±16,05 ^b	
	113,64	0,119	0,101	0,106	0,109	0,041	0,068	6,94	61,07			
	56,82	0,096	0,094	0,104	0,098	0,041	0,057	4,76	83,77			

Резултати су изражени као средња вредност ± SD.

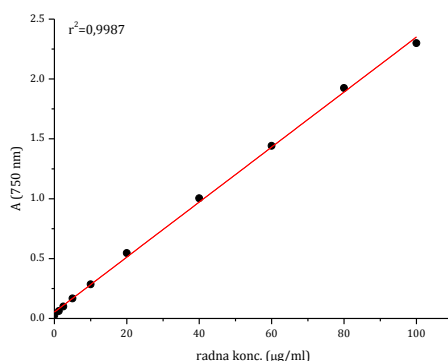
^{a,b} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт (p<0,01, Tukey тест, ANOVA)

7.2.8. Укупни феноли

Табела 7.24. Калибрациона крива галне киселине (ГК)

Почетна конц. ГК (mg/mL)	Радна конц. ГК (µg/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{Sr}	A _{Kor}	A A _{Sr} -A _{kontrola} (750 nm)
1,0	100	2,366	2,337	2,313	2,339	0,040	2,299
0,8	80	1,917	1,982	1,994	1,964	0,040	1,924
0,6	60	1,461	1,480	1,499	1,480	0,038	1,442
0,4	40	1,068	1,018	1,047	1,044	0,040	1,004
0,2	20	0,586	0,602	0,608	0,599	0,053	0,546
0,1	10	0,309	0,340	0,327	0,325	0,040	0,285
0,05	5	0,207	0,204	0,205	0,205	0,038	0,167
0,025	2,5	0,137	0,137	0,143	0,139	0,040	0,099
0,0125	1,25	0,105	0,105	0,109	0,106	0,045	0,061
0	0	0,066	0,071	0,067	0,068	0,043	0,025
A _{kontrola} (H ₂ O)		0,068	0,067	0,069	0,065		0,067

7. Прилог



Графикон 7.45. Калибрациона крива за одређивање садржаја укупних фенола испитиваних екстраката: функција зависности апсорбанције од концентрације галне киселине

Табела 7.26. Садржај укупних фенола у испитиваним екстрактима (mg ек. ГК/g с.м.)

Врста гљиве/ екстракционо средство	Радна конц. µg/mL	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{kont}	A	Очитана конц. ГК (µg/mL)	mg ек. ГК/g с.м.		
<i>G. applanatum</i>	EtOH	500	2,504	2,486	2,529	2,506	0,137	2,369	100,81	201,62	265.38±62.81 a
		250	1,663	1,674	1,666	1,668	0,079	1,589	66,84	267,34	
		125	1,082	1,022	1,057	1,054	0,061	0,993	40,90	327,19	
	H ₂ O	500	0,333	0,333	0,344	0,337	0,049	0,288	10,22	20,44	
		250	0,200	0,206	0,206	0,204	0,044	0,160	4,66	18,65	
		125	0,142	0,142	0,142	0,142	0,040	0,102	2,14	17,11	
<i>G. lucidum</i>	EtOH	250	0,540	0,536	0,553	0,543	0,046	0,497	19,33	77,32	81.95±5.53 b
		125	0,325	0,334	0,331	0,330	0,046	0,284	10,06	80,48	
		62,50	0,223	0,223	0,236	0,227	0,048	0,036	5,50	88,07	
	H ₂ O	500	0,163	0,165	0,166	0,165	0,046	0,119	2,86	5,73	
		250	0,116	0,115	0,115	0,115	0,039	0,076	1,02	4,09	
		125	0,113	0,096	0,101	0,103	0,042	0,061	0,37	2,96	
<i>G. pfeifferi</i>	EtOH	500	0,567	0,579	0,572	0,573	0,052	0,521	21,36	40,72	43.69±2.60 c
		250	0,354	0,370	0,372	0,365	0,051	0,314	11,38	45,52	
		125	0,223	0,234	0,232	0,230	0,048	0,182	5,61	44,85	

7. Прилог

G. resinaceum	H ₂ O	500	0,390	0,402	0,390	0,394	0,060	0,334	12,24	24,47	23.13±1.91 ^c		
		250	0,230	0,237	0,249	0,239	0,048	0,191	6,00	23,99			
		125	0,167	0,158	0,140	0,155	0,042	0,113	2,62	20,94			
	EtOH	250	0,376	0,359	0,364	0,366	0,056	0,310	11,21	44,82		44.01±1.24 ^c	
		125	0,243	0,230	0,232	0,235	0,054	0,181	5,58	44,62			
		62,50	0,163	0,163	0,166	0,164	0,050	0,114	2,66	42,58			
	H ₂ O	1000	0,392	0,389	0,411	0,397	0,062	0,335	12,29	12,29			11.43±2.36 ^c
		500	0,265	0,239	0,231	0,245	0,040	0,205	6,62	13,24			
		125	0,126	0,108	0,111	0,115	0,037	0,078	1,10	8,76			

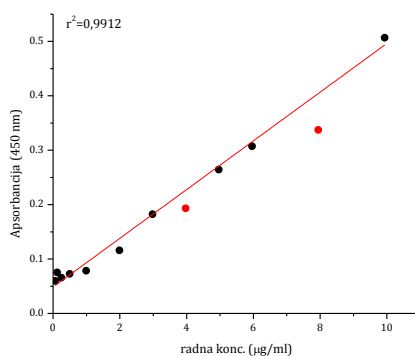
Резултати су изражени као средња вредност ± SD.

^{a, b, c} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт (p<0,01, Tukey тест, ANOVA)

7.2.9. Укупни флавоноиди

Табела 7.27. Калибрациона крива кверцетина (К)

Почетна конц. К (µg/mL)	Радна конц. К (µg/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{Sr}	A _{Kor}	A A _{Sr} -A _{kontrola} (450 nm)
2,5	0,25	0,068	0,068	0,061	0,066	0,052	0,066
5	0,50	0,073	0,072	0,073	0,073	0,059	0,073
10	0,99	0,081	0,077	0,077	0,078	0,053	0,078
20	1,99	0,114	0,121	0,113	0,116	0,064	0,116
30	2,98	0,179	0,187	0,181	0,182	0,075	0,182
40	3,97	0,190	0,196	0,193	0,193	0,099	0,193
50	4,97	0,261	0,278	0,254	0,264	0,134	0,264
60	5,96	0,304	0,310	0,308	0,307	0,134	0,307
80	7,95	0,340	0,335	0,337	0,337	0,117	0,337
100	9,93	0,501	0,495	0,524	0,507	0,172	0,507
A _{kontrola} (MeOH)		0,047	0,047	0,034	0,043		0,047



Графикон 7.46. Калибрациона крива за одређивање садржаја укупних фенола испитиваних екстраката: функција зависности апсорбације од концентрације галне киселине

7. Прилог

Табела 7.28. Садржај укупних флавоноида у испитиваним екстрактима (mg ек. К/г с.м.)

Врста гљиве/ екстракционо средство	Радна конц. µg/mL	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{kont}	A	Очитана конц. К (µg/mL)	mg ек. К/г с.м.		
<i>G. applanatum</i>	EtOH	49,67	0,093	0,097	0,072	0,087	0,058	0,029	1,89	38,05	54,02±21,23 ^b
		24,83	0,069	0,069	0,076	0,071	0,059	0,012	1,14	45,90	
		12,42	0,070	0,061	0,066	0,066	0,059	0,007	0,97	78,12	
	H ₂ O	9,93	0,076	0,072	0,074	0,074	0,061	0,013	1,22	122,81	
		4,97	0,073	0,074	0,073	0,073	0,067	0,006	1,04	209,39	
		2,48	0,070	0,055	0,056	0,060	0,049	0,011	1,08	434,88	
<i>G. lucidum</i>	EtOH	99,34	0,249	0,345	0,307	0,300	0,121	0,179	6,92	69,66	73,02±3,65 ^b
		49,67	0,149	0,144	0,135	0,143	0,058	0,085	3,82	76,91	
		24,83	0,091	0,089	0,096	0,092	0,063	0,029	1,80	72,48	
	H ₂ O	99,34	0,158	0,158	0,152	0,156	0,148	0,008	0,98	9,87	
		49,67	0,092	0,095	0,099	0,095	0,090	0,005	0,99	19,93	
		24,83	0,074	0,089	0,072	0,078	0,069	0,009	1,08	43,49	
<i>G. pfeifferi</i>	EtOH	198,68	0,323	0,346	0,319	0,329	0,178	0,151	4,81	24,21	26,29±2,74 ^b
		99,34	0,158	0,163	0,158	0,160	0,084	0,076	2,51	25,27	
		49,67	0,125	0,107	0,110	0,114	0,074	0,040	1,46	29,39	
	H ₂ O	198,68	0,116	0,129	0,101	0,123	0,076	0,047	1,55	7,80	
		99,34	0,102	0,093	0,092	0,102	0,078	0,024	0,80	8,05	
		49,67	0,072	0,071	0,058	0,072	0,050	0,022	0,72	14,50	
<i>G. resinaceum</i>	EtOH	596,03	0,493	0,622	0,632	0,627	0,223	0,404	13,20	22,15	22,99±1,15 ^c
		496,69	0,553	0,589	0,586	0,576	0,206	0,370	12,07	24,30	
		298,01	0,191	0,358	0,358	0,358	0,149	0,209	6,71	22,52	

7. Прилог

	496,69	0,932	0,876	0,889	0,899	0,834	0,065	2,09	4,22
H ₂ O	298,01	0,554	0,535	0,554	0,548	0,503	0,045	1,58	5,30
	198,68	0,481	0,377	0,368	0,429	0,409	0,020	0,72	3,62

4,38±0,85^b

Резултати су изражени као средња вредност ± SD.

^{a, b, c} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт (p<0,01, Tukey тест, ANOVA)

7.3. *In vivo* антиоксидантна активност екстраката гљива (хепатопротективни ефекат на хомогенату јетре пацова)

Одређени биохемијски параметри на хомогенату јетре:

- интензитет липидне пероксидације (LPx) (Buege и Aust, 1978)
- садржај редукованог глутатиона (GSH) (Beuthler и др., 1983; Kapetanović и Mieczal, 1979)
- активност глутатион-пероксидазе (GSHPx) (Chin и др., 1976)
- активност глутатион-редуктазе (GSHR) (Glatzle и др., 1974),
- активност пероксидазе (Px) (Simon и др., 1974),
- активност каталазе (CAT) (Beers и Sizer, 1952),
- активност ксантин-оксидазе (XOD) (Bergmeyer, 1970),
- и садржај укупних протеина Биуретским тестом.

7.3.1. Одређивање интензитета липидне пероксидације (LPx) (Buege и Aust, 1978)

Реагенси:

0,6 % тиобарбитурна киселина

1 % фосфорна киселина

2-бутанол

Поступак:

Смеша од 0,05 ml хомогената ткива са 3 ml раствора чинидле (0,375 % тиобарбитурна киселина у 15 % TCA (3,75 g TBA + 15 g CCl₃COOH + 20,72 ml 37 % HCl + 1-2 капи α-токоферола на 1 dm³ раствора) измеша се на вортексу и загрева на воденом купатилу 45 min на 90 °C. Раствор се затим центрифугира 5 min на 3000 обртаја/min и мерена је апсорбанција насталог производа реакције на 535 nm. Резултати су изражени у nmol/mg протеина (ε=1,56x10⁵ dm³/molcm).

Принцип рачунања:

$$C \text{ (mol/dm}^3\text{)} = (\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) / 156000 \times V_{rs} / V_{uz}$$

$$C \text{ (mol/mg)} = C \text{ (mol/dm}^3\text{)} / C_{\text{протеина}} \text{ (mg/dm}^3\text{)}$$

$$C \text{ (nmol/mg)} = C \text{ (mol/mg)} \times 1000000000$$

ΔAsp – средња вредност апсорбанције следе пробе

ΔAuz – средња вредност апсорбанције узорка

C_р – концентрација протеина у узорку (mg/mL)

V_{rs} – запремина реакционе смеше (ml)

V_{uz} – запремина узорка (ml)

7.3.2. Одређивање садржаја редукованог глутатиона (GSH) (Beuthler и др., 1983; Kapetanović и Mieczal, 1979)

Одређивање GSH у хомогенату: 1 ml хомогената центрифугиран је са 2 ml 4 % сулфосалицилне киселине 10 min на 3000 o/min. 0,05 ml супернатанта помешано је са 2 ml Ellman-овог реагенса и мерена је апсорбанција на 412 nm. Садржај GSH израчунат је из моларног коефицијента (ε=1,36x10⁴ dm³/molcm), а прерачунат на mg протеина преко садржаја укупних протеина.

Принцип рачунања:

$$C \text{ (mol/dm}^3\text{)} = (\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) / 13600 \times V_{rs} / V_{uz}$$

$$C \text{ (mol/mg)} = C \text{ (mol/dm}^3\text{)} / C_{\text{протеина}} \text{ (mg/dm}^3\text{)}$$

$$C \text{ (nmol/mg)} = C \text{ (mol/mg)} \times 1000000000$$

ΔAsp – средња вредност апсорбанције следе пробе

ΔAuz – средња вредност апсорбанције узорка

C_р – концентрација протеина у узорку (mg/mL)

V_{rs} – запремина реакционе смеше (ml)

V_{uz} – запремина узорка (ml)

7. Прилог

7.3.3. Одређивање активности глутатион-пероксидазе (GSHPx) (Chin и др., 1976)

Реагенси:

1 M TRIS-HCl, pH=7,6; pH=8,9
0,1 M GSH
кумолхидропероксид
20 % TCA
DTNB

Поступак:

Садржај GSHPx одређен је помоћу кумолхидропероксида као супстрата. 0,05 ml хомогената помешано је са 0,75 ml 50 mmol/dm³ TRIS HCl пуфера pH=7,6 (пуфер I) и термостатирано 10 min на 37 °C. У контролу је затим додато 0,1 ml GSH (0,006 g у 10 ml пуфера I), а у узорак 0,1 ml GSH и 0,1 ml кумолхидропероксида (0,05 ml у 10 ml MeOH) и поново термостатирано 5 min на 37 °C. Потом је у обе пробе додато по 1 ml 20 % TCA, а у контролу још 0,1 ml кумолхидропероксида. Охлађени раствор је центрифугиран на 3000 o/min у току 10 min. Од обе пробе узето је по 1 ml супернатанта и додато 2 ml 0,4 mol/L TRIS HCl пуфера pH=8,9 (пуфер II), 0,1 ml DTNB (0.02 g у 5 ml пуфера II) и мерена је апсорбанција на 412 nm. Резултати су изражени у nmol/mg протеина x min ($\epsilon=1,36 \times 10^4 \text{ dm}^3/\text{molcm}$).

Табела 7.29. Раствори припремљени за одређивање активности GSHPx

	ПРОБА	КОНТРОЛА
хомогенат	50 μ l	50 μ l
TRIS-HCl, pH 7,6	750 μ l	750 μ l
	Инкубација на 37 °C 10 min	
GSH, 0,1 M	100 μ l	100 μ l
кумолхидропероксид	100 μ l	-
	Инкубација на 37 °C 5 min	
20% TCA	2 ml	1 ml
кумолхидропероксид	-	100 μ l
	центрифугирање на 3000 o/min, 10 min	
	1 ml супернатанта	
	2 ml TRIS-HCl, pH 8,9	
хомогенат	100 μ l DTNB	50 μ l

Принцип рачунања:

$C \text{ (mol/dm}^3\text{)} = (\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) / 13600 \times V_{rs} / V_{uz}$
 $C \text{ (mol/mg)} = C \text{ (mol/dm}^3\text{)} / C_{\text{протеина}} \text{ (mg/dm}^3\text{)}$
 $C \text{ (nmol/mg)} = C \text{ (mol/mg)} \times 1000000000$
 $C \text{ (nmol/mgmin)} = C \text{ (mol/mg)} / 10 \text{ min}$

ΔA_{sp} – средња вредност апсорбанције слепе пробе
 ΔA_{uz} – средња вредност апсорбанције узорка
 C_{pr} – концентрација протеина у узорку (mg/mL)
 V_{rs} – запремина реакционе смеше (ml)
 V_{uz} – запремина узорка (ml)

7.3.4. Одређивање активности глутатион-редуктазе (GSHR) (Glatzle и др., 1974)

Реагенси:

1 M TRIS-HCl, 5 mM EDTA; pH=8
0,033 M GSSG
2 mM NADPH

Поступак:

2,00 ml 0,075 mol/dm³ фосфатног пуфера који садржи 0,15 % (w/V) BSA + 0,30 ml 1 mmol/dm³ NADPH + 0,30 ml 2 % GSSG (w/V). Реакција започиње додатком 10 μ l хомогената јетре. Апсорпција се прати у току 3 min на 340 nm.

Принцип рачунања:

Активност GSHR изражава се у специфичним јединицама активности на mg протеина. Специфична јединица активности је дефинисана као број nmol NADPH оксидованих у минути по mg протеина.

$C \text{ (mol/dm}^3\text{)} = (\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) / 62200 \times V_{rs} / V_{uz}$
 $C \text{ (mol/mg)} = C \text{ (mol/dm}^3\text{)} / C_{\text{протеина}} \text{ (mg/dm}^3\text{)}$
 $C \text{ (nmol/mg)} = C \text{ (mol/mg)} \times 1000000000$
 $C \text{ (nmol/mgmin)} = C \text{ (mol/mg)} / 10 \text{ min}$

7. Прилог

ΔAsp – средња вредност апсорбације слепе пробе
 ΔAuz – средња вредност апсорбације узорка
 C_{pr} – концентрација протеина у узорку (mg/mL)
 V_{rs} – запремина реакционе смеше (ml)
 V_{uz} – запремина узорка (ml)

7.3.5. Одређивање активности пероксидазе (Px) (Simon и др., 1974)

Реагенси:

0,1 М фосфатни пуфер pH=7,0 (13,6 g KH_2PO_4 и 10,8 g K_2HPO_4 растворено у 1L dH_2O)
 20,1 mM раствор гвајакола (249 mg гвајакола растворено у 100 ml dH_2O или пуфера)
 Разблажени раствор водоник пероксида (140 μ l 30 % H_2O_2 у 100 ml dH_2O)

Табела 7.30. Раствори припремљени за одређивање активности Px

ПРОБА	СЛЕПА ПРОБА
3 ml пуфера	3 ml пуфера
50 μ l гвајакола	50 μ l гвајакола
40 μ l H_2O_2	40 μ l H_2O_2
50 μ l хомогената	50 μ l dH_2O

Пробе су инкубирани 10 min на собној температури. Након тога реакција је стопирана у кључалом воденом купатилу (инактивација ензима), а затим је садржај центрифугиран 10 min на 3000 o/min. Из сваке пробе је 300 μ l супернатанта пренето у микроплоче и мерена је апсорбација на 436 nm (Multiscan Spectrum, Thermo Corporation).

Принцип рачунања:

Од апсорбације (A_{sr}) одузета је апсорбација слепе пробе (A_{srsp}), а концентрација продукта је израчуната помоћу екстинкционог коефицијента који износи $2,3 \times 10^4 \text{ dm}^3/\text{molcm}$. Резултати су изражени у nmol продукта по ml хомогената у min.

$$C \text{ (mol/dm}^3\text{)} = (\Delta Auz - \Delta Asp) / 23000 \times V_{rs} / V_{uz}$$

$$C \text{ (mol/mg)} = C \text{ (mol/dm}^3\text{)} / C_{протеина} \text{ (mg/dm}^3\text{)}$$

$$C \text{ (nmol/mg)} = C \text{ (mol/mg)} \times 1000000000$$

$$C \text{ (nmol/mgmin)} = C \text{ (mol/mg)} / 10 \text{ min}$$

ΔAsp – средња вредност апсорбације слепе пробе
 ΔAuz – средња вредност апсорбације узорка
 C_{pr} – концентрација протеина у узорку (mg/mL)
 V_{rs} – запремина реакционе смеше (ml)
 V_{uz} – запремина узорка (ml)

7.3.6. Одређивање активности каталазе (CAT) (Beers и Sizer, 1952)

Реагенси:

50 mM фосфатни пуфер pH=7,00 (1,325 g KH_2PO_4 и 2,655 g K_2HPO_4)
 Разблажени раствор H_2O_2 (140 μ l 30 % H_2O_2 у 50 ml dH_2O)

Табела 7.31. Раствори припремљени за одређивање активности CAT

ПРОБА	КОНТРОЛА	КОРЕКЦИЈА
3 ml пуфера	3 ml пуфера	3 ml пуфера
75 μ l H_2O_2	75 μ l H_2O_2	-
20 μ l хомогената	20 μ l dH_2O	95 μ l хомогената

Пробе су инкубирани 10 min на собној температури. Након тога реакција је стопирана у кључалом воденом купатилу (инактивација ензима), затим је садржај центрифугиран 10 min на 3000 o/min. Мерена је апсорбација на 240 nm, а резултати су изражени у nmol/mg протеина x min ($\epsilon = 4,36 \times 10^4 \text{ dm}^3/\text{molcm}$).

Принцип рачунања:

$$C \text{ (mol/dm}^3\text{)} = (\Delta Auz - \Delta Asp) / 43600 \times V_{rs} / V_{uz}$$

$$C \text{ (mol/mg)} = C \text{ (mol/dm}^3\text{)} / C_{протеина} \text{ (mg/dm}^3\text{)}$$

$$C \text{ (nmol/mg)} = C \text{ (mol/mg)} \times 1000000000$$

$$C \text{ (nmol/mgmin)} = C \text{ (mol/mg)} / 10 \text{ min}$$

7. Прилог

ΔAsp – средња вредност апсорбације слепе пробе
 ΔAuz – средња вредност апсорбације узорка
 C_{pr} – концентрација протеина у узорку (mg/mL)
 V_{rs} – запремина реакционе смеше (ml)
 V_{uz} – запремина узорка (ml)

7.3.7. Одређивање активности ксантин-оксидазе (XOD) (Bergmeyer, 1970)

Реагенси:

0,1 М фосфатни пуфер pH=7,50 (16,6 g KH_2PO_4 , 17,4 g K_2HPO_4)

Раствор хипоксантина (136,1 mg хипоксантина (или 152,11 mg ксантина) и 336 mg EDTA растворити у 1 L 0,1 М фосфатног пуфера pH=7,50

Табела 7.32. Раствори припремљени за одређивање активности XOD

ПРОБА	СЛ. ПРОБА	КОРЕКЦИЈА
3 ml пуфера pH=7,5	3 ml пуфера pH=7,5	3 ml dH ₂ O
30 μ l хомогената	30 μ l dH ₂ O	30 μ l хомогената

Раствор је центрифугиран на 3000 o/min у току 10 min. Мерена је апсорбација реакционог продукта на 293 nm, а резултати су изражени у nmol/mg протеина x min ($\epsilon=1,2 \times 10^4$ dm³/molcm).

Принцип рачуњања:

Од апсорбације пробе одузета је апсорбација корекције (за коју је као слепа проба кориштена dH₂O) и из ње је израчуната концентрација мокраћне киселине помоћу екстинкционог коефицијента ($1,2 \times 10^4$ dm³/molcm). Резултати су изражени у nmol мокраћне киселине по mg протеина хомогената у min.

$$C \text{ (mol/dm}^3\text{)} = (\Delta Auz - \Delta Asp) / 12000 \times V_{rs} / V_{uz}$$

$$C \text{ (mol/mg)} = C \text{ (mol/dm}^3\text{)} / C_{\text{протеина}} \text{ (mg/dm}^3\text{)}$$

$$C \text{ (nmol/mg)} = C \text{ (mol/mg)} \times 1000000000$$

$$C \text{ (nmol/mgmin)} = C \text{ (mol/mg)} / 10 \text{ min}$$

ΔAsp – средња вредност апсорбације слепе пробе
 ΔAuz – средња вредност апсорбације узорка
 C_{pr} – концентрација протеина у узорку (mg/mL)
 V_{rs} – запремина реакционе смеше (ml)
 V_{uz} – запремина узорка (ml)

7.3.8. Одређивање активности ксантин-оксидазе (XOD) (Bergmeyer, 1970)

Реагенси:

Биурет реагенс:

0,2 М NaOH (4,0 g NaOH растворено у 500 ml дестиловане воде)

22,5 g K, Na-гартарата, 2,5 g кристалног $CuSO_4 \times 5H_2O$ и 2,5 g KJ је растворено у 100 ml 0,2 М NaOH и допуњено до 500 ml са 0,2 М NaOH

Радни раствор Биуретског реагенса: основни раствор : dH₂O = 1:1

Стандардни раствор албумина говеђег серума растворен је у 100 ml dH₂O.

Табела 7.33. Раствори припремљени за одређивање садржаја протеина

ПРОБА	СЛЕПА ПРОБА
3 ml радног раствора биурета	3 ml радног раствора биурета
50 μ l хомогената	50 μ l dH ₂ O

Пробе су инкубиране 30 min на собној температури, а затим је из сваке пробе пренето 300 μ l и пренето у микроплоче и мерена апсорбација на 540 nm (Multiscan Spectrum, Thermo Corporation).

Принцип рачуњања:

Од апсорбације пробе одузета је апсорбација слепе пробе, и израчуната је концентрација протеина у узорцима хомогената јетре.

За израду калибрационе криве кориштен је стандардни раствор BSA (албумин говеђег серума) у пет концентрација (100, 50, 25, 12,5 и 5 mg/mL) у три понављања.

7. Прилог

Табела 7.34. *In vivo* антиоксидантна активност екстракта гљиве *G. pfeifferi* на хомогенату јетре пацова

Параметар	Контрола	Г.р. EtOH	Алоксан	Г.р. EtOH + алоксан	Г.р. H ₂ O	Г.р. H ₂ O + алоксан
LPx	10,81±0,74 ^b	10,93±0,54 ^b	9,69±0,00 ^b	7,43±0,09 ^a	8,65±0,20 ^a	6,32±0,56 ^a
GSH	124,30±9,91 ^b	284,53±37,80 ^a	99,25±0,39 ^b	103,63±6,87 ^b	231,03±7,23 ^a	132,54±17,94 ^b
GSHR	6,21±0,01 ^a	3,30±0,17 ^b	6,73±0,06 ^a	6,25±0,03 ^a	4,20±0,19 ^b	4,18±0,38 ^b
GSHPx	21,11±0,96 ^a	16,37±2,31 ^a	14,86±0,58 ^b	17,21±1,16 ^a	14,75±0,59 ^b	14,30±2,53 ^b
Px	11,70±0,13 ^a	14,66±1,03 ^a	8,11±0,78 ^b	10,14±1,05 ^a	12,96±0,14 ^a	6,58±0,05 ^b
CAT	61,06±9,98 ^b	108,18±12,24 ^a	97,12±1,86 ^a	88,69±6,92 ^a	132,54±4,25 ^a	109,00±2,72 ^a
XOD	54,58±1,88 ^b	47,47±1,08 ^a	66,38±1,80 ^c	69,30±1,40 ^c	45,17±0,40 ^a	58,73±0,44 ^b

Табела 7.35. *In vivo* антиоксидантна активност екстракта гљиве *G. resinaceum* на хомогенату јетре пацова

Параметар	Контрола	Г.р. EtOH	Алоксан	Г.р. EtOH + алоксан	Г.р. H ₂ O	Г.р. H ₂ O + алоксан
LPx	10,81±0,74 ^b	9,85±0,15 ^b	9,69±0,00 ^b	10,48±0,44 ^b	10,05±0,32 ^b	9,59±0,27 ^b
GSH	124,30±9,91 ^b	165,84±12,92 ^b	99,25±0,39 ^b	212,87±10,20 ^a	152,59±19,22 ^b	171,20±1,34 ^b
GSHR	6,21±0,01 ^a	2,29±0,28 ^b	6,73±0,06 ^a	5,25±0,59 ^a	1,24±0,07 ^c	5,04±0,04 ^b
GSHPx	21,11±0,96 ^a	14,15±0,94 ^b	14,86±0,58 ^b	13,16±0,78 ^a	14,74±1,05 ^b	15,16±0,80 ^b
Px	11,70±0,13 ^a	8,26±0,33 ^b	8,11±0,78 ^b	7,73±1,50 ^b	7,53±1,13 ^b	7,91±0,92 ^b
CAT	61,06±9,98 ^b	57,65±3,84 ^b	97,12±1,86 ^a	109,99±8,33 ^a	65,09±2,00 ^b	86,22±2,52 ^a
XOD	54,58±1,88 ^b	76,79±1,38 ^c	66,38±1,80 ^c	63,01±2,13 ^b	65,44±4,81 ^c	73,35±1,68 ^c

Садржај GSH је изражен у nmol GSH/mg протеина. Активности GSHR, GSHPx, Px, CAT и XOD су изражене у nmol/mg min протеина. Интензитет LPx је изражен у nmol малонилалдехида/mg протеина.

Резултати су изражени као средња вредност ± SD.

^{a, b, c} статистички значајни су они резултати који у истој колони не деле исти суперскрипт (p<0,01, Tukey тест, ANOVA)

7. Прилог

7.4. Одређивање антимикробне активности екстраката гљива

7.4.1. Антибактеријска активност

Табела 7.36. Антибактеријска активност H_2O екстраката гљива, метода бунара и диск-дифузиона метода

	<i>G. resinaceum</i>	<i>G. pfeifferi</i>	<i>G. lucidum</i>	<i>G. applanatum</i>	<i>G. resinaceum</i>	<i>G. pfeifferi</i>	<i>G. lucidum</i>	<i>G. applanatum</i>
	БУНАРИ				ДИСКОВИ			
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 3554					10			
<i>S. aureus</i> ATCC255923		10			11			
		13			9			
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433					10±1,41			
<i>E. aerogenes</i> ATCC13048			7		10	10		
			9					
<i>E. coli</i> ATCC11775		16	8±1,41			11		
		21	16			9		
			17					
<i>P. mirabilis</i> ATCC12453								
<i>E. coli</i> ATCC 11229						9		
<i>S. aureus</i> ATCC6538		13		15			10	
		13		16			11	
<i>B. cereus</i> ATCC11778	8	13	11	9	10	11	10	
	13	19	11	13		13	11	
	10,50	14,75	11,83	13,25	10	10,5	10,5	
	±3,54	±3,65	±3,92	±3,10	±0,63	±1,52	±0,58	

7. Прилог

Табела 7.37. Антибактеријска активност EtOH екстраката гљива, метода бунара и диск-дифузиона метода

	<i>G. resinaceum</i>	<i>G. pfeifferi</i>	<i>G. lucidum</i>	<i>G. applanatum</i>	<i>G. resinaceum</i>	<i>G. pfeifferi</i>	<i>G. lucidum</i>	<i>G. applanatum</i>
	БУНАРИ				ДИСКОВИ			
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 3554					12			
<i>S. aureus</i> ATCC255923	16				12			
	18				14			
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433					15			
<i>E. aerogenes</i> ATCC13048					13			
<i>E. coli</i> ATCC11775								
<i>P. mirabilis</i> ATCC12453								
<i>E. coli</i> ATCC 11229								
<i>S. aureus</i> ATCC6538	19							
	16				10			
<i>B. cereus</i> ATCC11778					11			
ПРОСЕК	17,25				12,43			
	±1,50				±1,72			

7. Прилог

Табела 7.38. Антибактеријска активност СНС1₃ екстраката гљива, метода бунара и диск-дифузиона метода

	ХЛОРОФОРМСКИ ЕКСТРАКТИ				РЕФЕРЕНТНА ГЉИВА		РЕФЕРЕНТНИ АНТИБИОТИК	
	<i>G. applanatum</i>		<i>G. resinaceum</i>		<i>M. giganteus</i>		Streptomycin	
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 3554	25	25	6,25	50	6,25	150	16	64
<i>E. coli</i> ATCC 11229	12,5	125	12,5	50	6,25	150	4	16
<i>S. aureus</i> ATCC6538	25	25	12,5	25	25	150	10.25	1
<i>S. enteritidis</i> ATCC13076	25	25	12,5	25	12,5	25	8	64
<i>K. pneumoniae</i> HP	25	25	25	150	25	150	2	8
<i>B. cereus</i> HP	12,5	25	25	25	3,125	25	8	32

7. Прилог

7.4.2. Антифунгална активност

Табела 7.39. Антифунгална активност EtOH екстраката *G. pfeifferi* (Pour plate метода)

	<i>Ganoderma pfeifferi</i>	5 mg/mL	2.5 mg/mL	0.5 mg/mL	контрола
	запремина	10%	5%	1%	
<i>A. niger</i>	50	19	20	25	25
<i>A. niger</i>	50	20	25	33	25
<i>A. niger</i>	50	26	23	25	25
<i>A. niger</i>	50	0	25	33	25
		16,25	23,25	29	25
<i>A. niger</i>	100	23	24	25	20
<i>A. niger</i>	100	25	26	26	20
<i>A. niger</i>	100	22	22	22	20
<i>A. niger</i>	100	24	26	23	20
		23,5	24,5	24	20
<i>A. niger</i>	200	19	22	20	20
<i>A. niger</i>	200	25	25	27	20
<i>A. niger</i>	200	16	23	20	20
<i>A. niger</i>	200	17	25	24	20
		19,25	23,75	22,75	20
<i>Saccharomyces</i>	50	5	9	15	15
<i>Saccharomyces</i>	50	7	10	17	15
<i>Saccharomyces</i>	50	8	16		15
<i>Saccharomyces</i>	50	9	20		15
		7,25	13,75	10,5	15
<i>Saccharomyces</i>	100	4	10	14	15
<i>Saccharomyces</i>	100	4	11	19	15
<i>Saccharomyces</i>	100	5	14	14	15
<i>Saccharomyces</i>	100	6	15	15	15
		4,75	12,5	15,5	15
<i>Saccharomyces</i>	200	4	11	13	15
<i>Saccharomyces</i>	200	4	12	13	15
<i>Saccharomyces</i>	200	6	12	13	15
<i>Saccharomyces</i>	200	7	13	14	15
		5,25	12	13,25	15
<i>Candida</i>	50	4	5	10	2
<i>Candida</i>	50	7	7	11	2
<i>Candida</i>	50	4	7	8	2
<i>Candida</i>	50	5	8	9	2
		5	6,75	9,5	2
<i>Candida</i>	100	6	8	7	5
<i>Candida</i>	100	6	9	10	5
<i>Candida</i>	100	5	7	7	5
<i>Candida</i>	100	7	8	9	5
		6	8	8,25	5

7. Прилог

<i>Candida</i>	200	4	6	7	5
<i>Candida</i>	200	6	6	10	5
<i>Candida</i>	200	5	6	8	5
<i>Candida</i>	200	6	7	9	5
		5,25	6,25	8,50	5,00

Табела 7.40. Антифунгална активност EtOH екстраката *G. resinaceum* (Pour plate метода)

		<i>Ganoderma resinaceum</i>	5 mg/mL	2.5 mg/mL	0.5 mg/mL	
		запремина	10%	5%	1%	контрола
<i>A. niger</i>	50		19	14	17	20
<i>A. niger</i>	50		27	21	19	20
<i>A. niger</i>	50		13	22	25	20
<i>A. niger</i>	50		15	24	26	20
			18,5	20,25	21,75	20
<i>A. niger</i>	100		16	18	23	20
<i>A. niger</i>	100		22	22	24	20
<i>A. niger</i>	100		18	20	23	20
<i>A. niger</i>	100		22	23	24	20
			19,5	20,75	23,5	20
<i>A. niger</i>	200		15	20		60
<i>A. niger</i>	200		20	20		60
<i>A. niger</i>	200		10	18	20	60
<i>A. niger</i>	200		10	20	20	60
			13,75	19,50	20	60
<i>Saccharomyces</i>	50		10	13	13	9
<i>Saccharomyces</i>	50		12	14	14	9
<i>Saccharomyces</i>	50		10	13	15	9
<i>Saccharomyces</i>	50		11	13	16	9
			10,75	13,25	14,5	9
<i>Saccharomyces</i>	100		13	14	15	10
<i>Saccharomyces</i>	100		14	15	17	10
<i>Saccharomyces</i>	100		13	14	14	10
<i>Saccharomyces</i>	100		14	14	15	10
			13,5	14,25	15,25	10
<i>Saccharomyces</i>	200		11	15	13	10
<i>Saccharomyces</i>	200		13	15	14	10
<i>Saccharomyces</i>	200		13	20	23	10
<i>Saccharomyces</i>	200		14	20	25	10
			12,75	17,50	18,75	10
<i>Candida</i>	50		3	5	7	6
<i>Candida</i>	50		4	8	8	6
<i>Candida</i>	50		4	7	9	6
<i>Candida</i>	50		6	8	10	6
			4,25	7	8,5	6

7. Прилог

<i>Candida</i>	100	5	5	6	8
<i>Candida</i>	100	5	6	7	8
<i>Candida</i>	100	5	5	10	8
<i>Candida</i>	100	6	6	10	8
		5,25	5,5	8,25	8
<i>Candida</i>	200	2	4	7	6
<i>Candida</i>	200	3	6	8	6
<i>Candida</i>	200	4	5	5	6
<i>Candida</i>	200	5	5	6	6
		3,5	5	6,5	6

7.4.3. Антивирусна активност

Табела 7.41. Инхибиција раста vB_VbrS_56.1 вируса (%) екстрактима гљива

Радна конц. (mg/mL)	број понављања			I ₁ (%)	I ₂ (%)	I ₃ (%)	I _{SR} (%)	СТ.ДЕВ.
	1	2	3					
<i>G. applanatum</i> , EtOH								
100	198	194	190	14,00	15,73	17,47	15,73	1,74
50	214	212	216	7,05	7,91	6,18	7,05	0,87
20	190	188	189	17,47	18,34	17,90	17,90	0,43
10	222	219	216	3,57	4,87	6,18	4,87	1,30
2	204	203	200	11,39	11,82	13,13	12,11	0,90
0,2	190	192	197	17,47	16,60	14,43	16,17	1,57
<i>G. lucidum</i> , EtOH								
100	153	158	161	33,54	31,37	30,07	31,66	1,76
50	166	159	134	27,90	30,94	41,79	33,54	7,31
20	172	180	169	25,29	21,81	26,59	24,56	2,47
10	174	177	176	24,42	23,12	23,55	23,70	0,66
2	142	148	144	38,32	35,71	37,45	37,16	1,33
0,2	139	134	135	39,62	41,79	41,36	40,93	1,15
<i>G. pfeifferi</i> , EtOH								
100	203	207	205	11,82	10,09	10,95	10,95	0,87
50	178	186	187	22,68	19,21	18,77	20,22	2,14
20	177	169	167	23,12	26,59	27,46	25,72	2,30
2	168	169	155	27,03	26,59	32,67	28,76	3,39
0,2	178	180	188	22,68	21,81	18,34	20,95	2,30
<i>G. resinaceum</i> , EtOH								
100	155	146	157	32,67	36,58	31,80	33,69	2,55
50	187	186	174	18,77	19,21	24,42	20,80	3,14
20	180	176	183	21,81	23,55	20,51	21,96	1,53
10	186	188	175	19,21	18,34	23,99	20,51	3,04
2	185	180	186	19,64	21,81	19,21	20,22	1,40
0,2	181	183	187	21,38	20,51	18,77	20,22	1,33
<i>G. applanatum</i> , H ₂ O								
100	219	222	213	10,61	9,39	13,06	11,02	1,87
50	222	199	179	14,29	18,78	26,94	20,00	6,41
20	245	232	230	0,00	5,31	6,12	3,81	3,32
10	251	252	248	-2,45	-2,86	-1,22	-2,18	0,85
2	190	192	192	22,45	21,63	21,63	21,90	0,47
0,2	232	236	235	5,31	3,67	4,08	4,35	0,85

7. Прилог

<i>G. lucidum</i> , H ₂ O								
100	247	239	235	-0,82	2,45	4,08	3,27	1,15
50	246	244	258	-0,41	0,41	-5,31	0,41	-
20	194	190	192	20,82	22,45	21,63	21,63	0,82
10	169	175	176	31,02	28,57	28,16	29,25	1,55
2	171	181	183	30,20	26,12	25,31	27,21	2,62
0,2	206	210	228	15,92	14,29	6,94	12,38	4,78
<i>G. pfeifferi</i> , H ₂ O								
100	192	193	187	21,68	21,22	23,67	22,18	1,31
50	214	185	198	12,65	24,49	19,18	18,78	5,93
20	195	200	198	20,41	18,37	19,18	19,32	1,03
10	232	220	223	5,31	10,20	8,98	8,16	2,55
2	243	240	239	0,82	2,04	2,45	1,77	0,85
0,2	221	220	218	9,80	10,20	11,02	10,34	0,62
<i>G. resinaceum</i> , H ₂ O								
100	182	177	183	25,71	27,76	25,31	26,26	1,31
50	185	172	170	24,49	29,80	30,61	28,30	3,32
20	204	218	219	16,73	11,02	10,61	12,79	3,42
10	163	177	179	33,47	27,76	26,94	29,39	3,56
2	185	173	187	24,49	29,39	23,67	25,85	3,09
0,2	177	178	211	27,76	27,35	13,88	22,99	7,90
<i>G. applanatum</i> , 100% DMSO								
300	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-
50	134	128	135	45,53	47,97	45,12	46,21	1,54
20	217	212	196	11,79	13,82	20,33	15,31	4,46
10	230	247	239	6,50	-0,41	2,85	2,98	3,46
2	333	372	378	-35,37	-51,22	-53,66	-46,75	9,93
<i>G. lucidum</i> , 100% DMSO								
50	-	89	106	-	63,82	56,91	60,37	4,89
20	85	84	84	65,45	65,85	65,85	65,72	0,23
10	95	108	98	61,38	56,10	60,16	59,21	2,77
1	65	74	65	73,58	69,92	73,58	72,36	2,11
<i>G. pfeifferi</i> , 100% DMSO								
200	-	50	37	-	79,67	84,96	82,32	3,74
100	81	74	77	67,07	69,92	68,70	68,56	1,43
50	41	41	36	83,33	83,33	85,37	84,01	1,17
20	82	100	81	66,67	59,35	67,07	64,36	4,35
10	195	191	194	20,73	22,36	21,14	21,41	0,85
<i>G. resinaceum</i> , 100% DMSO								
200	242	243	245	1,63	1,22	0,41	1,08	0,62
100	224	215	235	8,94	12,60	4,47	8,67	4,07
50	229	223	238	6,91	9,35	3,25	6,50	3,07
20	245	247	236	0,41	-0,41	4,07	2,24	2,59
10	242	241	239	1,63	2,03	2,85	2,17	0,62
2	235	236	244	4,47	4,07	0,81	3,12	2,01
<i>G. applanatum</i> , 5% DMSO								
300	-	-	-	-	-	-	-	-
200	-	-	-	-	-	-	-	-
100	80	86	78	66,39	63,87	67,23	65,83	1,75
50	66	74	69	72,27	68,91	71,01	70,73	1,70
20	123	125	120	48,32	47,48	49,58	48,46	1,06
10	100	110	119	57,98	53,78	50,00	53,92	3,99
2	106	101	100	55,46	57,98	57,98	57,00	1,35
<i>G. lucidum</i> , 5% DMSO								

7. Прилог

50	125	123	126	47,48	48,32	47,06	47,62	0,64
20	91	97	106	61,76	59,24	55,46	58,82	3,17
10	115	100	104	51,68	57,98	56,30	55,32	3,26
2	99	94	114	58,40	60,50	52,10	57,00	4,37
0,2	61	62	67	74,37	73,95	71,85	73,39	1,35
<i>G. pfeifferi</i> , 5% DMSO								
200	66	68	80	72,27	71,43	66,39	70,03	3,18
100	118	112	119	50,42	52,94	50,00	51,12	1,59
50	105	112	90	55,88	52,94	62,18	57,00	4,72
20	208	190	192	12,61	20,17	19,33	17,37	4,15
10	143	135	139	39,92	43,28	41,60	41,60	1,68
2	142	138	134	40,34	42,02	43,70	42,02	1,68
<i>G. resinaceum</i> , 5% DMSO								
200	443	453	430	-86,13	-90,34	-80,67	-85,71	4,85
100	464	382	429	-94,96	-60,50	-80,25	-78,57	17,29
50	474	444	470	-99,16	-86,55	-97,48	-94,40	6,84
20	446	352	458	-87,39	-47,90	-92,44	-75,91	24,39
10	440	392	372	-84,87	-64,71	-56,30	-68,63	14,68
2	362	192	379	-52,10	19,33	-59,24	-30,67	43,45

7.5. Одређивање антиинфламаторне активности екстраката гљива

Табела 7.42. Потенцијал инхибиције продукције 12-NHT (*G. applanatum*/CHCl₃, *G. applanatum*/EtOH, *G. lucidum*/CHCl₃, *G. lucidum*/EtOH, *G. pfeifferi*/CHCl₃, *G. pfeifferi*/EtOH, *G. resinaceum*/CHCl₃, *G. resinaceum*/EtOH)

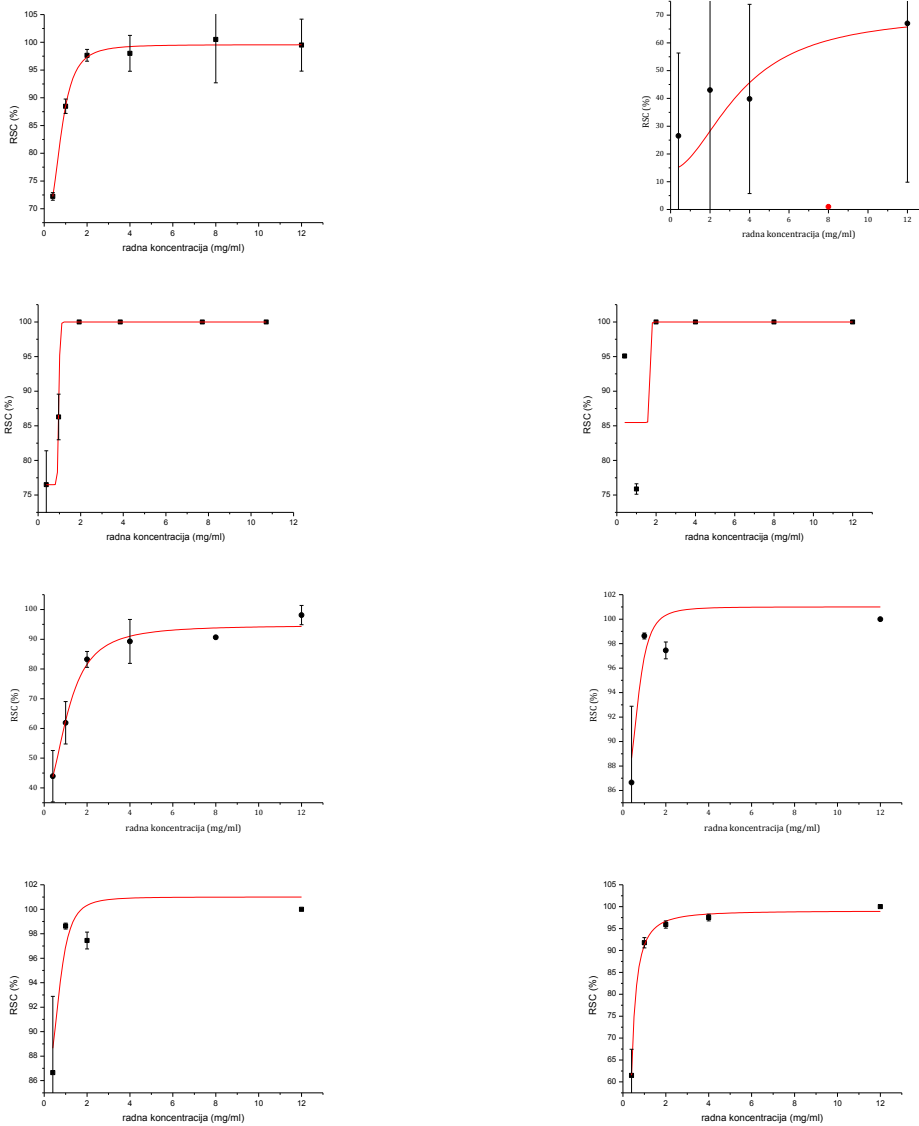
Радна конц. (mg/mL)	P ₁	P ₂	P ₃	P _{ког}	I ₁ (%)	I ₂ (%)	I ₃ (%)	Средња вредност (%)
<i>G. applanatum</i> , CHCl ₃								
0,4	0,216	0,211	0,208	0,044	71,50	72,34	72,85	72,23
1	0,102	0,109	0,093	0,032	88,43	87,21	89,80	88,48
2	0,075	0,088	0,084	0,068	98,82	96,75	97,42	97,66
4	0,149	0,187	0,159	0,153	100,69	94,43	98,94	98,02
8	0,443	0,249	0,315	0,285	73,86	106,03	94,99	91,63
12	0,410	0,396	0,355	0,384	95,73	98,00	104,75	99,50
IC ₅₀ (mg/mL)					<0,40	<0,40	<0,40	<0,40
<i>G. applanatum</i> , EtOH								
0,4	0,069	0,030	0,021	0	-155,74	32,39	52,98	-23,46
1	0,038	0,044	0,046	0	12,59	-0,81	-4,25	2,51
2	0,031	0,000	0,030	0	30,07	100,00	31,13	53,73
4	0,000	0,015	0,020	0	100,00	82,43	76,81	86,41
8	0,000	0,070	0,139	0	100,00	-58,56	-215,66	-58,07
12	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
IC ₅₀ (mg/mL)					4,93	7,54	7,47	7,51± 0,05
<i>G. lucidum</i> , CHCl ₃								
0,39	0,047	0,036	0,055	0	75,87	81,68	71,94	76,50
0,96	0,023	0,034	0,024	0	88,47	82,50	87,88	86,28
1,93	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
3,86	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
7,71	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
10,71	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
IC ₅₀ (mg/mL)					<0,39	<0,39	<0,39	<0,39
<i>G. lucidum</i> , EtOH								

7. Прилог

0,4	0,141	0,153	0,154	0	95,35	94,97	94,93	95,08
1	0,749	0,706	0,740	0	75,30	76,72	75,60	75,87
2	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
4	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
8	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
12	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
IC ₅₀ (mg/mL)					<0,40	<0,40	<0,40	<0,40
<i>G. pfeifferi</i> , CHCl ₃								
0,4	1,018	0,749	0,863	0	34,88	52,09	44,82	43,93
1	0,724	0,545	0,519	0	53,70	65,15	66,81	61,89
2	0,215	0,295	0,277	0	86,23	81,15	82,28	83,22
4	0,039	0,204	0,261	0	97,53	86,96	83,32	89,27
8	0,142	0,151	0,145	0	90,93	90,32	90,69	90,65
12	0,088	0,000	0,000	0	94,38	100,00	100,00	98,13
IC ₅₀ (mg/mL)					0,93	-	0,48	0,70± 0,32
<i>G. pfeifferi</i> , EtOH								
0,4	0,833	0,469	0,561	0,216	79,67	91,68	88,61	86,65
1	0,219	0,217	0,205	0,172	98,45	98,53	98,91	98,63
2	0,055	0,082	0,096	0	98,19	97,31	96,83	97,44
4	0,153	0,217	0,266	0	94,96	92,85	91,23	93,01
8	0,297	0,299	0,306	0	90,21	90,13	89,93	90,09
12	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
IC ₅₀ (mg/mL)					<0,40	<0,40	<0,40	<0,40
<i>G. resinaceum</i> , CHCl ₃								
0,39	0,046	0,080	0,059	0	76,33	59,13	69,58	68,35
0,96	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
1,93	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
3,86	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
7,71	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
10,71	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
IC ₅₀ (mg/mL)					<0,39	<0,39	<0,39	<0,39
<i>G. resinaceum</i> , EtOH								
0,4	0,191	0,248	0,257	0	68,32	58,79	57,30	61,47
1	0,057	0,048	0,044	0	90,48	92,07	92,76	91,77
2	0,022	0,031	0,030	0,003	96,88	95,39	95,52	95,93
4	0,010	0,015	0,019	0	98,32	97,44	96,80	97,52
8	0,183	0,231	0,229	0	69,65	61,75	62,03	64,48
12	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
IC ₅₀ (µg/mL)					<0,40	<0,40	<0,40	<0,40

7. Прилог

Графикон 7.47. – 7.54. Зависност инхибиције продукције 12-ННТ (%) – радна концентрација екстракта гљива (*G. applanatum*/CHCl₃; *G. applanatum*/EtOH; *G. lucidum*/CHCl₃; *G. lucidum*/EtOH; *G. pfeifferi*/CHCl₃; *G. pfeifferi*/EtOH; *G. resinaceum*/CHCl₃; *G. resinaceum*/EtOH)



7. Прилог

Табела 7.43. Потенцијал инхибиције продукције TXB₂ (*G. applanatum*/CHCl₃, *G. applanatum*/EtOH, *G. lucidum*/CHCl₃, *G. lucidum*/EtOH, *G. pfeifferi*/CHCl₃, *G. pfeifferi*/EtOH, *G. resinaceum*/CHCl₃, *G. resinaceum*/EtOH)

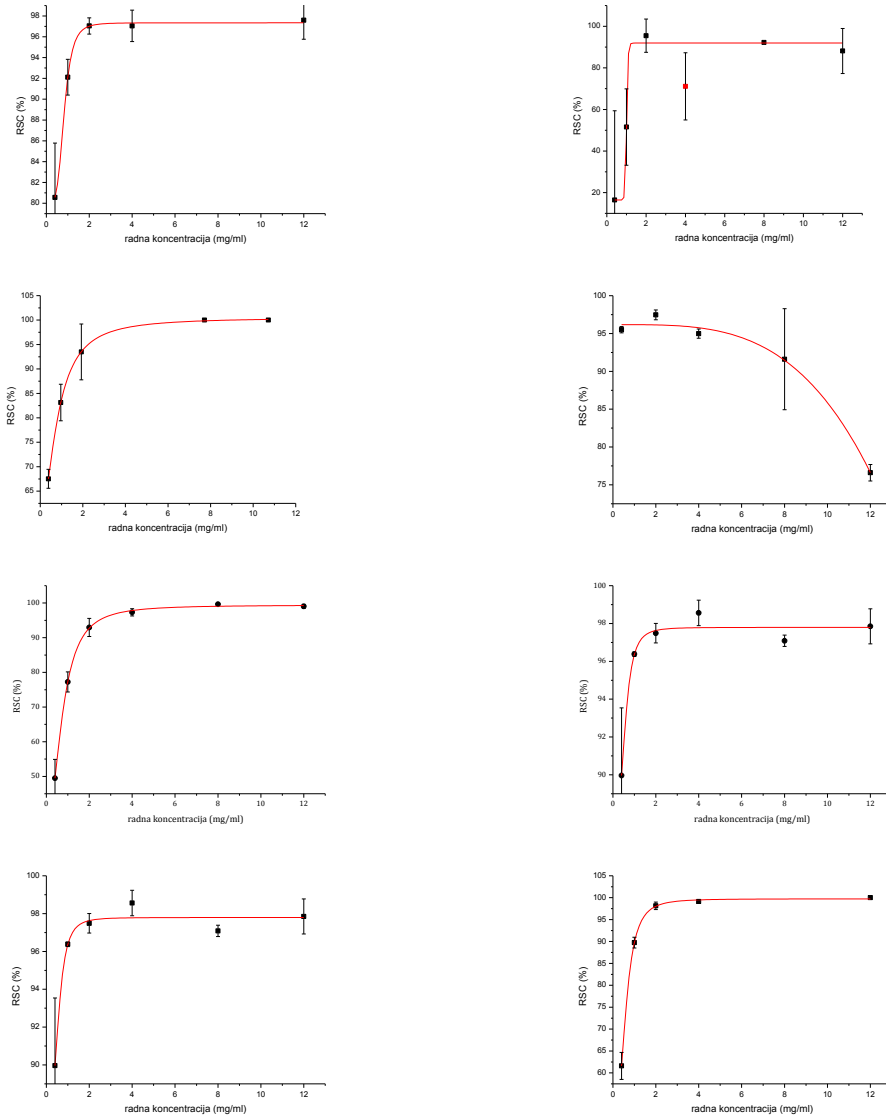
Радна конц. (mg/mL)	P ₁	P ₂	P ₃	P _{ког}	I ₁ (%)	I ₂ (%)	I ₃ (%)	Средња вредност (%)
<i>G. applanatum</i> , CHCl ₃								
0,4	0,371	0,265	0,278	0,089	74,58	84,18	82,93	80,57
1	0,107	0,130	0,092	0,022	92,37	90,29	93,69	92,12
2	0,041	0,024	0,033	0	96,27	97,82	97,04	97,04
4	0,052	0,027	0,019	0	95,36	97,53	98,26	97,05
8	0,157	0,070	0,063	0	85,82	93,67	94,37	91,29
12	0,111	0,152	0,132	0,105	99,45	95,78	97,56	97,60
IC ₅₀ (mg/mL)					<0,40	<0,40	<0,40	<0,40
<i>G. applanatum</i> , EtOH								
0,4	0,500	0,208	0,234	0	-32,98	44,62	37,64	16,43
1	0,219	0,190	0,321	0,061	58,00	65,82	30,83	51,55
2	0,174	0,116	0,133	0,124	86,60	102,13	97,71	95,48
4	0,039	0,139	0,148	0	89,74	62,99	60,65	71,12
8	0,029	0,605	0,444	0,126	92,25	-27,18	15,42	26,83
12	0,092	0,174	0,128	0,087	98,44	76,86	89,08	88,13
IC ₅₀ (mg/mL)					0,89	0,93	1,40	1,07± 0,29
<i>G. lucidum</i> , CHCl ₃								
0,39	0,141	0,135	0,128	0,024	65,67	67,38	69,52	67,52
0,96	0,046	0,055	0,071	0	86,47	83,84	79,10	83,14
1,93	0,067	0,105	0,083	0	98,83	87,48	94,16	93,49
3,86	0,162	0,100	0,100	0	52,61	70,76	70,55	64,64
7,71	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
10,71	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
IC ₅₀ (mg/mL)					<0,39	<0,39	<0,39	<0,39
<i>G. lucidum</i> , EtOH								
0,4	0,298	0,328	0,359	0	95,93	95,51	95,08	95,51
1	1,631	1,469	1,784	0	77,66	79,88	75,57	77,70
2	0,132	0,224	0,197	0	98,19	96,93	97,30	97,47
4	0,322	0,411	0,365	0	95,59	94,37	95,00	94,99
8	0,758	1,605	0,763	0,429	95,49	83,89	95,42	91,60
12	1,652	1,050	1,765	0	77,37	85,62	75,83	79,61
IC ₅₀ (mg/mL)					<0,40	<0,40	<0,40	<0,40
<i>G. pfeifferi</i> , CHCl ₃								
0,4	2,759	2,244	2,601	0,071	44,88	55,44	48,11	49,48
1	1,294	1,027	1,083	0,025	73,97	79,46	78,30	77,25
2	0,239	0,451	0,468	0,042	95,96	91,61	91,26	92,95
4	0,072	0,166	0,154	0	98,56	96,60	96,83	97,33
8	0,064	0,075	0,088	0,059	99,89	99,67	99,40	99,66
12	0,015	0,070	0,056	0	99,69	98,57	98,85	99,04
IC ₅₀ (mg/mL)					0,56	-	0,42	0,49± 0,10
<i>G. pfeifferi</i> , EtOH								
0,4	1,598	1,106	1,201	0,569	85,91	92,64	91,35	89,97
1	0,424	0,685	0,672	0,414	99,87	96,29	96,46	97,54
2	0,151	0,174	0,225	0	97,93	97,61	96,92	97,49
4	0,268	0,324	0,365	0,214	99,26	98,49	97,93	98,56

7. Прилог

8	0,402	0,360	0,392	0,172	96,85	97,43	96,98	97,09
12	0,217	0,170	0,083	0	97,03	97,67	98,86	97,85
IC₅₀ (mg/mL)					<0,40	<0,40	<0,40	<0,40
<i>G. resinaceum</i> , CHCl ₃								
0,39	0,107	0,148	0,132	0	76,73	64,81	69,33	70,29
0,96	0,032	0,030	0,039	0	95,90	96,42	93,90	95,41
1,93	0,029	0,029	0,025	0	91,53	91,48	92,59	91,87
3,86	0,030	0,017	0,025	0	91,19	94,92	92,68	92,93
7,71	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
10,71	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
IC₅₀ (mg/mL)					<0,39	<0,39	<0,39	<0,39
<i>G. resinaceum</i> , EtOH								
0,4	0,434	0,497	0,489	0,047	65,14	59,46	60,22	61,61
1	0,143	0,120	0,120	0,014	88,34	90,44	90,47	89,75
2	0,034	0,053	0,044	0,023	99,02	97,30	98,13	98,15
4	0,022	0,030	0,031	0,018	99,59	98,93	98,84	99,12
8	0,138	0,195	0,222	0,030	90,29	85,11	82,72	86,04
12	0,000	0,000	0,000	0	100,00	100,00	100,00	100,00
IC₅₀ (µg/mL)					<0,40	<0,40	<0,40	<0,40

7. Прилог

Графикон 7.55. – 7.62. Зависност инхибиције продукције TXB_2 (%) – радна концентрација екстракта гљива (*G. applanatum*/CHCl₃; *G. applanatum*/EtOH; *G. lucidum*/CHCl₃; *G. lucidum*/EtOH; *G. pfeifferi*/CHCl₃; *G. pfeifferi*/EtOH; *G. resinaceum*/CHCl₃; *G. resinaceum*/EtOH)



7. Прилог

Табела 7.44. Потенцијал инхибиције продукције PGE₂ (*G. applanatum*/CHCl₃, *G. applanatum*/EtOH, *G. lucidum*/CHCl₃, *G. lucidum*/EtOH, *G. pfeifferi*/CHCl₃, *G. pfeifferi*/EtOH, *G. resinaceum*/CHCl₃, *G. resinaceum*/EtOH)

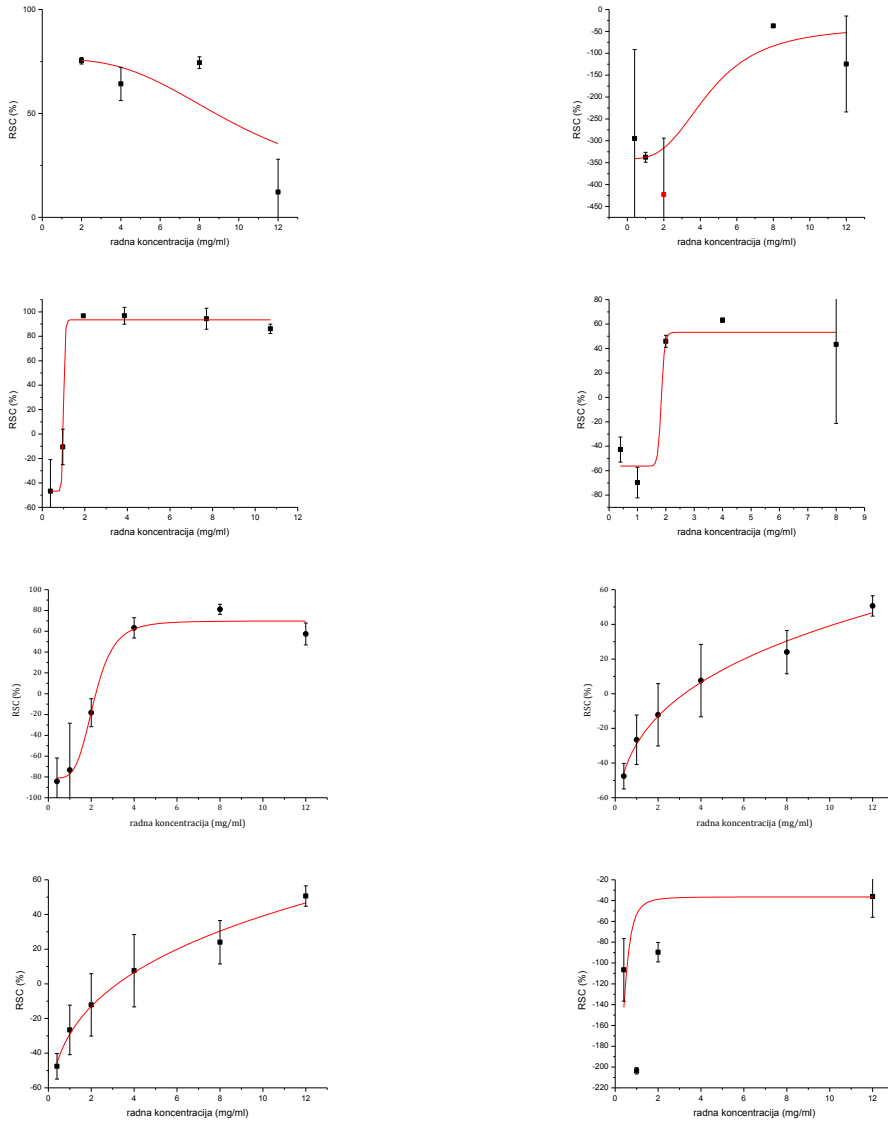
Радна конц. (mg/mL)	P ₁	P ₂	P ₃	P _{ког}	I ₁ (%)	I ₂ (%)	I ₃ (%)	Средња вредност (%)
<i>G. applanatum</i> , CHCl ₃								
0,4	0,421	0,377	0,348	0,033	-155,14	-126,30	-107,40	-129,61
1	0,235	0,296	0,273	0,019	-41,79	-82,54	-67,35	-63,89
2	0,039	0,035	0,039	0	74,43	77,14	74,47	75,35
4	0,065	0,057	0,041	0	57,31	62,36	72,98	64,22
8	0,210	0,111	0,117	0,075	11,29	76,44	72,47	53,40
12	0,115	0,125	0,160	0	24,62	17,49	-5,51	12,20
IC ₅₀ (mg/mL)					4,55	9,48	7,65	7,23 ±2,49
<i>G. applanatum</i> , EtOH								
0,4	0,717	0,332	0,301	0	-529,16	-191,06	-164,17	-294,79
1	0,615	0,593	0,615	0,109	-344,41	-324,55	-343,79	-337,59
2	0,985	0,768	0,705	0,223	-567,96	-378,05	-322,29	-422,76
4	0,688	0,804	0,776	0,134	-385,77	-487,54	-462,44	-445,25
8	0,398	0,791	0,910	0,241	-37,44	-381,86	-486,27	-301,85
12	0,410	0,660	0,548	0,283	-11,35	-230,05	-131,94	-124,45
IC ₅₀ (mg/mL)					n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<i>G. lucidum</i> , CHCl ₃								
0,39	0,157	0,212	0,204	0,021	-17,24	-65,02	-57,85	-46,71
0,96	0,156	0,165	0,189	0,156	1,43	-6,31	-26,74	-10,54
1,93	0,047	0,045	0,045	0,047	94,90	96,69	96,93	96,17
3,86	0,044	0,031	0,045	0,036	93,31	104,78	92,40	96,83
7,71	0,054	0,074	0,062	0,057	102,49	85,35	95,30	94,38
10,71	0,083	0,075	0,080	0	82,56	90,13	85,77	86,16
IC ₅₀ (mg/mL)					1,14	1,03	1,15	1,10 ±0,06
<i>G. lucidum</i> , EtOH								
0,4	1,573	1,670	1,766	0,324	-32,42	-42,73	-52,91	-42,69
1	1,716	1,641	1,872	0,143	-66,79	-58,88	-83,38	-69,68
2	0,465	0,506	0,559	0	50,65	46,30	40,70	45,88
4	0,333	0,342	0,365	0	64,65	63,68	61,25	63,20
8	1,210	2,053	0,868	0,843	61,12	-28,27	97,30	43,38
12	3,870	2,700	2,235	0	-310,35	-186,32	-137,04	-211,24
IC ₅₀ (mg/mL)					2,00	-	2,03	2,01 ±0,02
<i>G. pfeifferi</i> , CHCl ₃								
0,4	1,080	0,854	0,973	0,042	-106,46	-61,40	-85,13	-84,33
1	1,133	0,768	0,717	0	-125,17	-52,66	-42,48	-73,43
2	0,589	0,685	0,791	0,042	-8,73	-27,81	-48,84	-28,46
4	0,444	0,391	0,347	0,209	53,27	63,90	72,68	63,28
8	0,225	0,270	0,264	0,158	86,71	77,78	78,93	81,14
12	0,164	0,270	0,209	0	-31,63	46,41	58,48	24,42
IC ₅₀ (mg/mL)					2,17	2,29	1,24	1,90± 0,32
<i>G. pfeifferi</i> , EtOH								
0,4	1,656	1,591	1,516	0,196	-54,77	-47,88	-40,02	-47,56
1	1,533	1,749	1,781	0,494	-10,20	-33,06	-36,44	-26,57
2	0,874	1,091	1,208	0	7,30	-15,68	-28,15	-12,18
4	1,098	1,165	1,468	0,372	22,97	15,95	-16,22	7,57

7. Прилог

8	1,035	1,155	0,920	0,320	24,19	11,42	36,36	23,99
12	0,483	0,404	0,510	0	48,81	57,20	45,94	50,65
IC₅₀ (mg/mL)					4,40	7,07	6,73	6,07± 1,45
<i>G. resinaceum</i> , CHCl ₃								
0,39	0,192	0,220	0,233	0,013	-54,80	-78,69	-90,16	-74,55
0,96	0,083	0,116	0,094	0,029	53,82	24,85	43,91	40,86
1,93	0,059	0,052	0,054	0	49,17	55,12	53,32	52,54
3,86	0,029	0,032	0,019	0	75,33	72,41	83,26	77,00
7,71	0,086	0,046	0,057	0	26,16	60,29	50,64	45,70
10,71	0,092	0,088	0,092	0	79,55	82,72	79,35	80,54
IC₅₀ (mg/mL)					1,06	1,60	1,19	1,28 ±0,28
<i>G. resinaceum</i> , EtOH								
0,4	0,367	0,283	0,293	0	-141,17	-86,07	-92,61	-106,62
1	0,472	0,477	0,468	0,011	-203,30	-206,71	-200,71	-203,58
2	0,306	0,330	0,330	0,034	-78,73	-95,04	-95,01	-89,59
4	0,157	0,266	0,270	0,044	25,34	-46,32	-48,52	-23,17
8	0,343	0,345	0,331	0,059	-87,10	-88,24	-78,91	-84,75
12	0,241	0,184	0,195	0	-58,73	-21,14	-28,42	-36,09
IC₅₀ (µg/mL)					n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

7. Прилог

Графикон 7.63. – 7.70. Зависност инхибиције продукције PGE₂ (%) – радна концентрација екстракта гљива (*G. applanatum*/CHCl₃; *G. applanatum*/EtOH; *G. lucidum*/CHCl₃; *G. lucidum*/EtOH; *G. pfeifferi*/CHCl₃; *G. pfeifferi*/EtOH; *G. resinaceum*/CHCl₃; *G. resinaceum*/EtOH)



7. Прилог

Табела 7.45. Потенцијал инхибиције продукције 12-НЕТЕ (*G. applanatum*/CHCl₃, *G. applanatum*/EtOH, *G. lucidum*/CHCl₃, *G. lucidum*/EtOH, *G. pfeifferi*/CHCl₃, *G. pfeifferi*/EtOH, *G. resinaceum*/CHCl₃, *G. resinaceum*/EtOH)

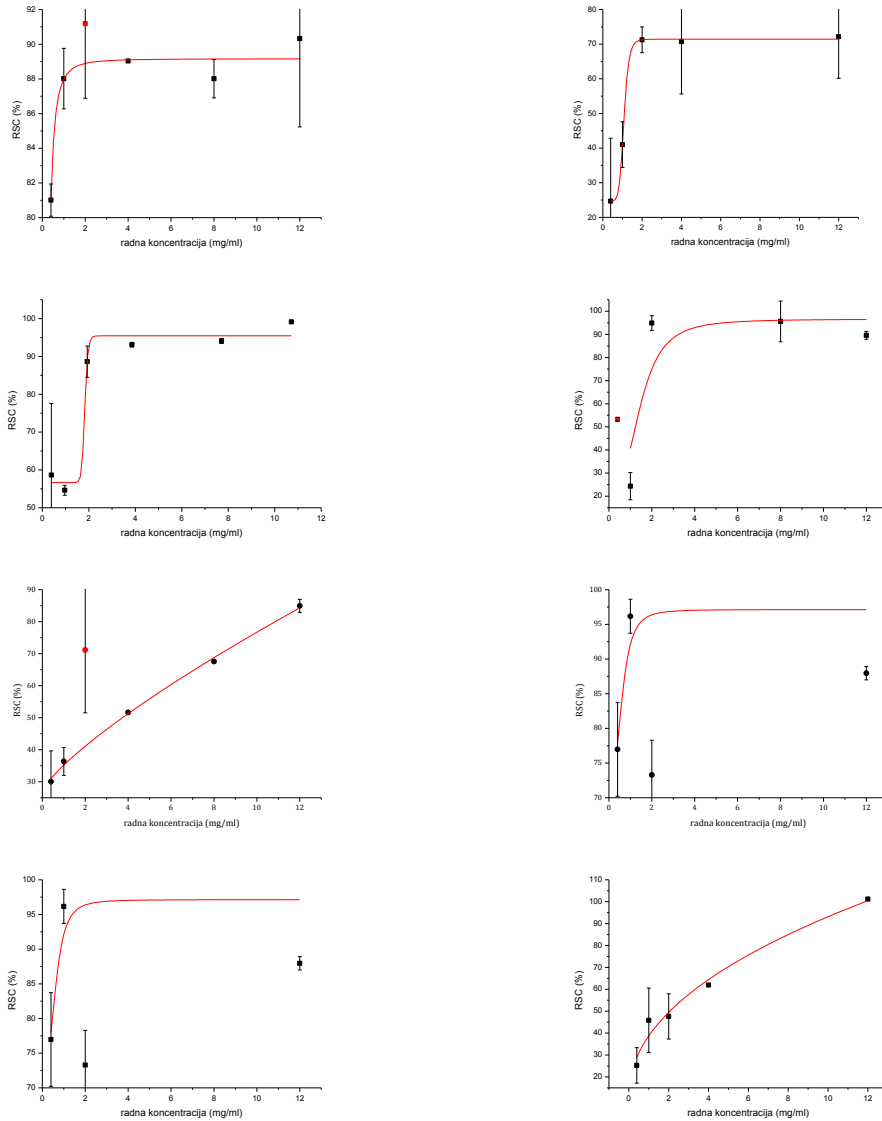
Радна конц. (mg/mL)	P ₁	P ₂	P ₃	P _{ког}	I ₁ (%)	I ₂ (%)	I ₃ (%)	Средња вредност (%)
<i>G. applanatum</i> , CHCl ₃								
0,4	1,520	1,405	1,430	0,044	79,96	81,73	81,35	81,01
1	0,821	1,031	1,003	0,032	90,02	86,80	87,23	88,02
2	0,482	0,997	0,934	0,068	96,12	88,24	89,20	91,18
4	1,092	0,677	0,618	0,153	89,03	95,38	96,28	93,57
8	2,105	1,170	1,068	0,285	72,93	87,23	88,79	82,98
12	0,580	1,109	1,195	0,384	96,17	88,07	86,76	90,33
IC ₅₀ (mg/mL)					<0,40	<0,40	<0,40	<0,40
<i>G. applanatum</i> , EtOH								
0,4	3,379	5,453	5,177	0	45,50	12,06	16,51	24,69
1	4,953	4,250	4,963	1,064	37,29	48,62	37,12	41,01
2	3,641	3,877	4,102	2,091	75,00	71,20	67,57	71,26
4	2,354	3,907	4,041	1,619	88,15	63,10	60,94	70,73
8	2,257	3,922	3,618	0	63,60	36,74	41,65	47,33
12	4,410	5,306	3,824	2,787	73,82	59,38	83,27	72,16
IC ₅₀ (mg/mL)					0,89	0,93	1,40	1,41± 0,41
<i>G. lucidum</i> , CHCl ₃								
0,39	5,157	3,413	3,030	1,389	37,13	66,22	72,62	58,66
0,96	4,251	4,409	4,335	1,613	55,96	53,34	54,57	54,63
1,93	0,965	0,568	0,512	0	83,89	90,51	91,46	88,62
3,86	0,370	0,431	0,436	0	93,82	92,80	92,73	93,12
7,71	0,399	0,326	0,339	0	93,33	94,56	94,35	94,08
10,71	0,301	0,279	0,274	0	98,86	99,24	99,32	99,14
IC ₅₀ (mg/mL)					0,82	<0,39	<0,39	<0,39
<i>G. lucidum</i> , EtOH								
0,4	17,224	16,916	16,676	0	52,45	53,30	53,96	53,23
1	26,889	25,584	29,740	0	25,76	29,37	17,89	24,34
2	12,019	10,731	9,717	8,974	91,59	95,15	97,95	94,90
4	5,578	7,247	4,885	0	84,60	79,99	86,51	83,70
8	3,452	9,500	4,750	4,314	102,38	85,68	98,80	95,62
12	4,174	3,050	4,088	0	88,48	91,58	88,71	89,59
IC ₅₀ (mg/mL)					1,75	1,78	1,34	1,62 ±0,25
<i>G. pfeifferi</i> , CHCl ₃								
0,4	8,098	6,549	7,472	1,699	21,09	40,20	28,82	30,04
1	6,512	6,850	6,150	1,342	36,24	32,08	40,71	36,34
2	6,622	3,764	3,968	2,447	48,53	83,76	81,25	71,18
4	3,923	6,922	7,486	0	51,63	14,65	7,69	24,66
8	6,161	5,870	6,363	3,529	67,55	71,14	65,06	67,92
12	3,595	3,813	3,490	2,413	85,41	82,73	86,71	84,95
IC ₅₀ (mg/mL)					2,92	1,21	1,17	1,19± 0,03
<i>G. pfeifferi</i> , EtOH								
0,4	20,402	15,547	17,160	0,216	69,61	82,87	78,46	76,98
1	11,121	12,658	11,085	0,172	97,53	93,34	97,63	96,17
2	8,101	9,505	11,731	0	77,87	74,04	67,96	73,29
4	13,475	14,828	19,298	0	85,50	81,80	69,59	78,96

7. Прилог

8	17,288	16,170	15,413	0	63,79	66,84	68,91	66,51
12	4,576	4,004	4,647	0	87,50	89,06	87,31	87,96
IC₅₀ (mg/mL)					<0,40	<0,40	<0,40	<0,40
<i>G. resinaceum</i> , CHCl ₃								
0,39	3,272	4,666	4,782	1	60,04	36,78	34,84	43,89
0,96	2,161	2,455	2,478	1	79,43	74,54	74,16	76,04
1,93	0,972	0,975	0,791	0,748	96,25	96,22	99,29	97,25
3,86	0,408	0,359	0,379	0	93,20	94,01	93,68	93,63
7,71	0,567	0,382	0,433	0	90,53	93,63	92,77	92,31
10,71	0,645	0,528	0,438	0	97,44	99,39	100,88	99,24
IC₅₀ (mg/mL)					<0,39	0,49	0,50	0,50 ±0,01
<i>G. resinaceum</i> , EtOH								
0,4	6,060	5,224	5,079	0,569	15,97	28,76	30,98	25,24
1	5,323	3,963	3,504	1,103	35,43	56,23	63,26	51,64
2	3,821	4,686	5,150	1,130	58,82	45,59	38,48	47,63
4	3,326	3,399	3,353	0,872	62,45	61,34	62,04	61,94
8	8,972	7,497	7,832	0,794	-25,14	-2,57	-7,69	-11,80
12	0,273	0,292	0,264	0,354	101,24	100,95	101,37	101,19
IC₅₀ (µg/mL)					1,84	1,89	3,46	1,87 ±0,04

7. Прилог

Графикон 7.71. – 7.78. Зависност инхибиције продукције 12-НЕТЕ (%) – радна концентрација екстракта гљива (*G. applanatum*/CHCl₃; *G. applanatum*/EtOH; *G. lucidum*/CHCl₃; *G. lucidum*/EtOH; *G. pfeifferi*/CHCl₃; *G. pfeifferi*/EtOH; *G. resinaceum*/CHCl₃; *G. resinaceum*/EtOH)



7. Прилог

7.6. Одређивање антипролиферативне активности екстраката гљива

Табела 7.46. Антипролиферативна активност екстраката гљива и стандарда мерена МТТ тестом при инкубацији од 24 h (*G. applanatum*/EtOH, *G. applanatum*/H₂O, *G. lucidum*/EtOH, *G. lucidum*/H₂O, *G. pfeifferi*/EtOH, *G. pfeifferi*/H₂O, *G. resinaceum*/EtOH, *G. resinaceum*/H₂O, DMSO, елагна киселина)

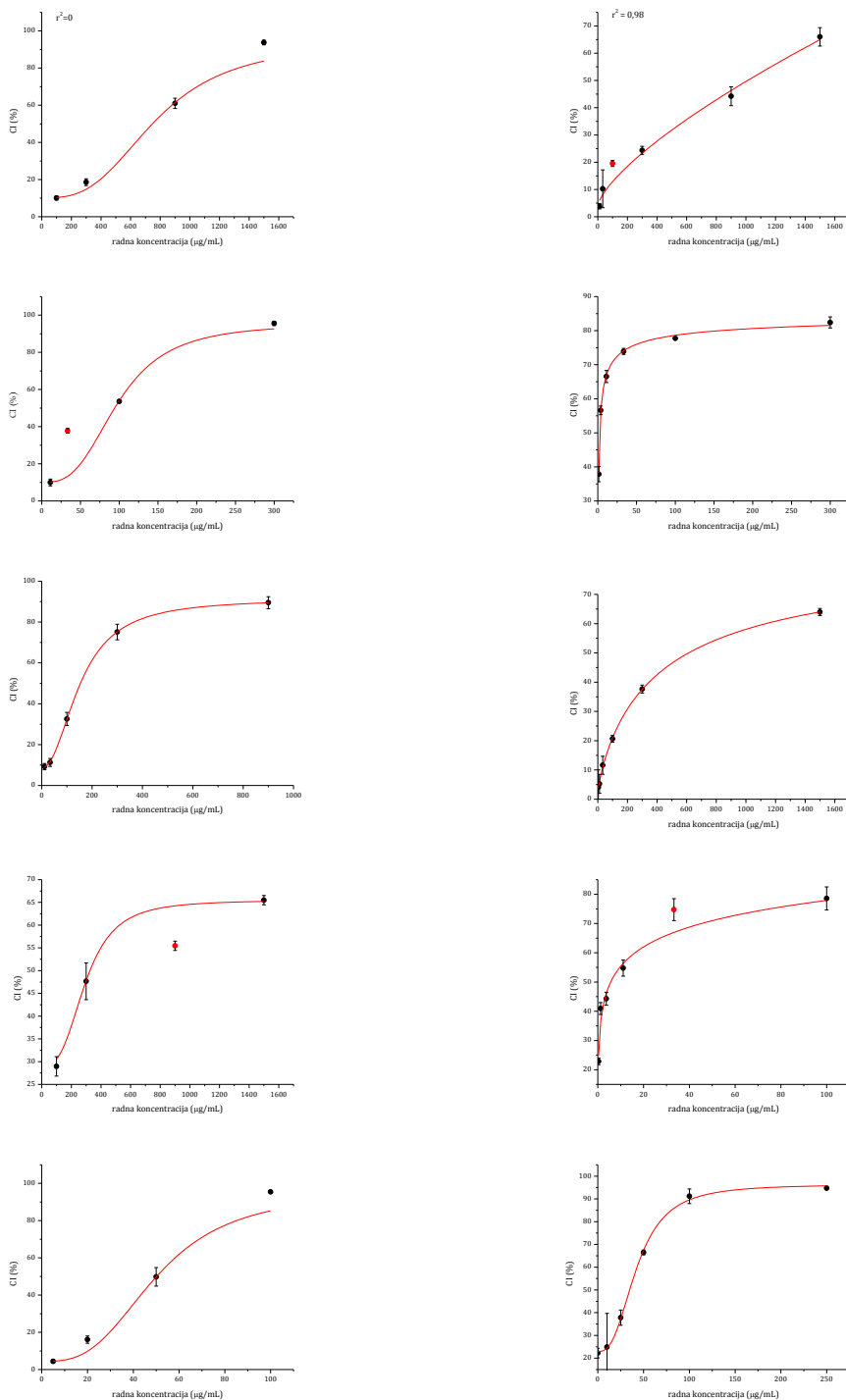
Радна конц. (µg/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	CI ₁ (%)	CI ₂ (%)	CI ₃ (%)	Средња вредност (%)	
<i>G. applanatum</i> , EtOH								
1500	0,014	0,017	0,021	94,96	93,88	92,45	93,76	
900	0,100	0,110	0,115	64,03	60,43	58,63	61,03	
300	0,232	0,225	0,222	16,55	19,06	20,14	18,59	
100	0,253	0,247	0,250	8,99	11,15	10,07	10,07	
IC ₅₀ (µg/mL)					724,59	753,23	768,56	748,79±22,32 ^c
<i>G. applanatum</i> , H ₂ O								
1500	0,035	0,039	0,032	66,35	62,50	69,23	66,03	
900	0,061	0,054	0,059	41,35	48,08	43,27	44,23	
300	0,079	0,080	0,077	24,04	23,08	25,96	24,36	
100	0,083	0,085	0,083	20,19	18,27	20,19	19,55	
33,3	0,085	0,097	0,098	18,27	6,73	5,77	10,26	
11,1	0,100	0,101	0,099	3,85	2,88	4,81	3,85	
IC ₅₀ (µg/mL)					1045,14	990,47	946,05	968,30±31,40 ^d
<i>G. lucidum</i> , EtOH								
300	0,009	0,015	0,013	96,76	94,60	95,32	95,56	
100	0,127	0,129	0,131	54,32	53,60	52,88	53,60	
33,3	0,175	0,169	0,175	37,05	39,21	37,05	37,77	
11,1	0,246	0,256	0,249	11,51	7,91	10,43	9,95	
IC ₅₀ (µg/mL)					94,00	88,33	96,53	92,95±4,20 ^a
<i>G. lucidum</i> , H ₂ O								
300	0,037	0,044	0,043	84,26	81,28	81,70	82,41	
100	0,052	0,053	0,052	77,87	77,45	77,87	77,73	
33,3	0,059	0,063	0,062	74,89	73,19	73,62	73,90	
11,1	0,074	0,080	0,082	68,51	65,96	65,11	66,52	
3,7	0,099	0,105	0,102	57,87	55,32	56,60	56,60	
1,23	0,150	0,140	0,148	36,17	40,43	37,02	37,87	
IC ₅₀ (µg/mL)					2,40	2,37	2,55	2,44±0,10 ^a
<i>G. pfeifferi</i> , EtOH								
900	0,012	0,011	0,018	90,77	91,54	86,15	89,49	
300	0,029	0,030	0,038	77,69	76,92	70,77	75,13	
100	0,083	0,091	0,089	36,15	30,00	31,54	32,56	
33,3	0,113	0,118	0,115	13,08	9,23	11,54	11,28	
11,1	0,118	0,120	0,116	9,23	7,69	10,77	9,23	
IC ₅₀ (µg/mL)					140,05	156,61	165,50	154,05±12,92 ^a
<i>G. pfeifferi</i> , H ₂ O								
1500	0,116	0,110	0,109	62,58	64,52	64,84	63,98	
900	0,161	0,150	0,153	48,06	51,61	50,65	-	
300	0,192	0,190	0,198	38,06	38,71	36,13	37,63	
100	0,243	0,245	0,250	21,61	20,97	19,35	20,65	
33,3	0,265	0,273	0,284	14,52	11,94	8,39	11,61	
11,1	0,286	0,290	0,305	7,74	6,45	1,61	5,27	

7. Прилог

3,7	0,291	0,283	0,318	6,13	8,71	-2,58	4,09	
IC₅₀ (µg/mL)					646,14	540,78	660,55	653,35±10,19^c
<i>G. resinaceum</i> , EtOH								
1500	0,052	0,050	0,053	65,26	66,59	64,59	65,48	
900	0,068	0,065	0,067	54,57	56,57	55,23	55,46	
300	0,079	0,072	0,084	47,22	51,89	43,88	47,66	
100	0,105	0,104	0,110	29,85	30,51	26,50	28,95	
33,3	0,120	0,115	0,118	19,82	23,16	21,16	21,38	
IC₅₀ (µg/mL)					362,69	279,85	453,36	365,30±86,78^b
<i>G. resinaceum</i> , H ₂ O								
100	0,310	0,030	0,029	77,86	78,57	79,29	78,57	
33,3	0,033	0,038	0,035	76,43	72,86	75,00	74,76	
11,1	0,062	0,066	0,062	55,71	52,86	55,71	54,76	
3,7	0,079	0,076	0,079	43,57	45,71	43,57	44,29	
1,23	0,083	0,085	0,080	40,71	39,29	42,86	40,95	
0,33	0,109	0,105	0,110	22,14	25,00	21,43	22,86	
IC₅₀ (µg/mL)					4,79	5,42	4,43	4,88±0,50^a
DMSO								
100	0,016	0,013	0,017	95,24	96,13	94,94	95,44	
50	0,154	0,165	0,187	54,17	50,89	44,35	49,80	
20	0,283	0,288	0,275	15,77	14,29	18,15	16,07	
5	0,320	0,319	0,325	4,76	5,06	3,27	4,37	
IC₅₀ (µg/mL)					46,73	49,31	55,41	50,48±4,46^a
ЕЛАГНА КИСЕЛИНА								
250	0,018	0,017	0,018	94,64	94,94	94,64	94,74	
100	0,025	0,022	0,042	92,56	93,45	87,50	91,17	
50	0,109	0,113	0,116	67,56	66,37	65,48	66,47	
25	0,215	0,216	0,196	36,01	35,71	41,67	37,80	
10	0,231	0,309	0,217	31,25	8,04	35,42	24,90	
0	0,255	0,260	0,269	24,11	22,62	19,94	22,22	
IC₅₀ (µg/mL)					36,22	35,91	29,68	33,94±3,69^a

7. Прилог

Графикон 7.79. – 7.88. Криве зависности цитотоксичног потенцијала (CI) (%) од радне концентрације екстракта зљива (*G. applanatum*/EtOH; *G. applanatum*/H₂O; *G. lucidum*/EtOH; *G. lucidum*/H₂O; *G. pfeifferi*/EtOH; *G. pfeifferi*/H₂O; *G. resinaceum*/EtOH; *G. resinaceum*/H₂O) и стандарда (DMSO, елазна киселина) при инкубацији од 24h



7. Прилог

Табела 7.47. Антипролиферативна активност екстраката гљива и стандарда мерена МТТ тестом при инкубацији од 72 h (*G. applanatum*/EtOH, *G. applanatum*/H₂O, *G. lucidum*/EtOH, *G. lucidum*/H₂O, *G. pfeifferi*/EtOH, *G. pfeifferi*/H₂O, *G. resinaceum*/EtOH, *G. resinaceum*/H₂O, DMSO, елагна киселина)

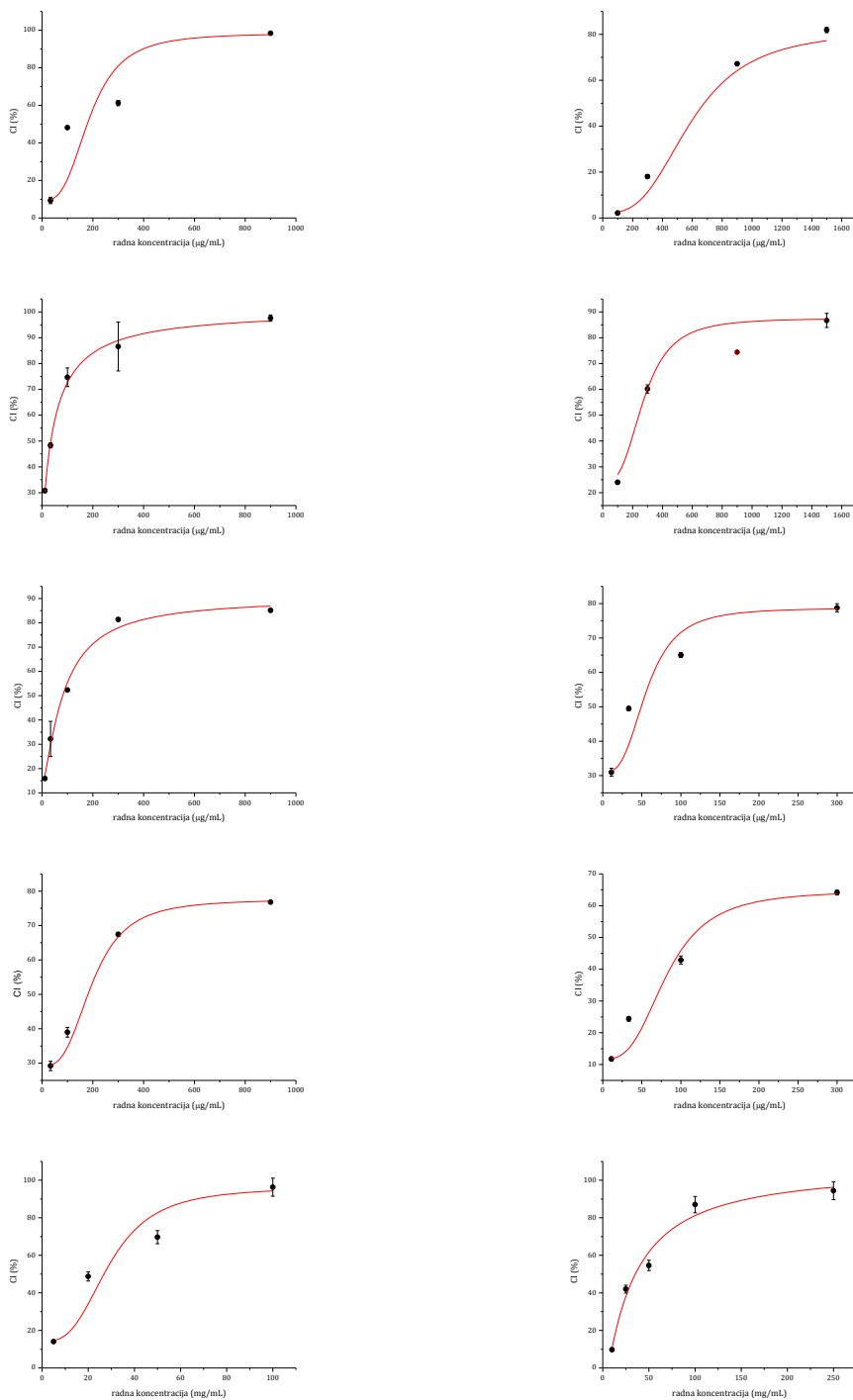
Радна конц. (µg/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	CI ₁ (%)	CI ₂ (%)	CI ₃ (%)	Средња вредност (%)	
<i>G. applanatum</i> , EtOH								
900	0,006	0,014	0,013	99,14	98,00	98,14	93,76	
300	0,268	0,264	0,283	61,71	62,29	59,57	61,03	
100	0,364	0,366	0,360	48,00	47,71	48,57	18,59	
33,3	0,621	0,644	0,639	11,29	8,00	8,71	10,07	
IC ₅₀ (µg/mL)					188,27	165,11	177,46	177,46±11,66 ^d
<i>G. applanatum</i> , H ₂ O								
1500	0,115	0,105	0,119	81,60	83,20	80,96	81,92	
900	0,209	0,200	0,206	66,56	67,94	67,04	67,18	
300	0,509	0,510	0,518	18,56	18,40	17,12	18,03	
100	0,606	0,613	0,615	3,04	1,92	1,60	2,19	
IC ₅₀ (µg/mL)					681,13	670,41	685,12	678,89±7,61 ^f
<i>G. lucidum</i> , EtOH								
900	0,008	0,011	0,021	98,56	98,03	96,23	97,61	
300	0,014	0,100	0,110	97,49	82,05	80,25	86,59	
100	0,122	0,162	0,139	78,10	70,92	75,04	74,69	
33,3	0,290	0,292	0,282	47,94	47,58	49,37	48,29	
11,1	0,385	0,390	0,382	30,88	29,98	31,42	30,76	
IC ₅₀ (µg/mL)					36,78	34,68	29,92	33,79±3,51 ^a
<i>G. lucidum</i> , H ₂ O								
1500	0,065	0,085	0,099	89,60	86,40	84,16	86,72	
900	0,160	0,158	0,162	74,40	74,72	74,08	74,40	
300	0,249	0,239	0,259	60,16	61,76	58,56	60,16	
100	0,475	0,480	0,470	24,00	23,20	24,80	24,00	
IC ₅₀ (µg/mL)					247,04	236,44	247,22	243,57±6,17 ^c
<i>G. pfeifferi</i> , EtOH								
900	0,085	0,082	0,081	84,71	85,25	85,43	85,13	
300	0,106	0,100	0,105	80,94	82,01	81,12	81,35	
100	0,262	0,265	0,268	52,88	52,34	51,80	52,34	
33,3	0,340	0,420	0,371	38,85	24,46	33,27	32,19	
11,1	0,465	0,470	0,468	16,37	15,47	15,83	15,89	
IC ₅₀ (µg/mL)					67,25	91,41	80,40	76,69±12,10 ^b
<i>G. pfeifferi</i> , H ₂ O								
300	0,115	0,128	0,118	79,68	77,39	79,15	78,74	
100	0,194	0,198	0,202	65,72	65,02	64,31	65,02	
33,3	0,290	0,285	0,283	48,76	49,65	50,00	49,47	
11,1	0,398	0,389	0,385	29,68	31,27	31,98	30,98	
IC ₅₀ (µg/mL)					49,25	47,30	50,54	49,25±1,72 ^a
<i>G. resinaceum</i> , EtOH								
900	0,080	0,080	0,082	77,01	77,01	76,44	76,82	
300	0,115	0,114	0,111	66,95	67,24	68,10	67,43	
100	0,218	0,209	0,210	37,36	39,94	39,66	38,98	
33,3	0,241	0,250	0,248	30,75	28,16	28,74	29,21	

7. Прилог

IC₅₀ (µg/mL)				187,30	177,78	177,67		180,92±5,53^d
<i>G. resinaceum</i> , H ₂ O								
300	0,143	0,138	0,143	63,71	64,97	63,71	64,13	
100	0,220	0,225	0,230	44,16	42,89	41,62	42,89	
33,3	0,295	0,301	0,298	25,13	23,60	24,37	24,37	
11,1	0,348	0,350	0,345	11,68	11,17	12,44	11,76	
IC₅₀ (µg/mL)				107,30	112,87	121,93		114,03±7,38^c
DMSO								
100	0,008	0,009	0,007	96,30	95,83	96,76	96,30	
50	0,081	0,061	0,070	62,50	71,76	67,59	69,68	
20	0,100	0,117	0,115	53,70	45,83	46,76	48,77	
5	0,180	0,185	0,192	16,67	14,35	11,11	14,04	
IC₅₀ (µg/mL)					22,83	28,21	28,50	26,51±3,19^a
ЕЛАГНА КИСЕЛИНА								
250	0,009	0,015	0,012	95,83	93,06	94,44	94,44	
100	0,010	0,011	0,028	95,37	94,91	87,04	87,04	
50	0,099	0,102	0,093	54,17	52,78	56,94	54,63	
25	0,115	0,123	0,138	46,76	43,06	36,11	41,98	
10	0,195	0,197	0,193	9,72	8,80	10,65	9,72	
IC₅₀ (µg/mL)					43,10	44,26	38,12	41,83±3,26^a

7. Прилог

График 7.89. – 7.98. Криве зависности цитотоксичног потенцијала (CI) (%) од радне концентрације екстракта гљива (*G. applanatum*/EtOH; *G. applanatum*/H₂O; *G. lucidum*/EtOH; *G. lucidum*/H₂O; *G. pfeifferi*/EtOH; *G. pfeifferi*/H₂O; *G. resinaceum*/EtOH; *G. resinaceum*/H₂O) и стандарда (DMSO, елазна киселина) при инкубацији од 72h



7. Прилог

7.7. Одређивање антидијабетогене активности екстраката гљива

Табела 7.48. Подела животиња по групама, 1. Експериментална група (група физиолошког раствора)

Параметар Број експ. животиње	Ознака животиње	Телесна маса пре (g)	Телесна маса после (g)	Разлика телесне масе (g)
Физиолошки раствор				
31	G	220	239	19
32	L	225	240	15
33	R	232	248	16
34	BEO	221	241	20
		224,50±5,45	242,00±4,08	17,50±2,38
<i>G. pfeifferi</i> , EtOH				
25	G	204	220	16
26	L	228	243	15
27	R	211	230	19
28	GL	229	252	23
29	LR	220	228	8
30	BEO	220	230	10
		218,67±9,71	233,83±11,57	15,17±5,56
<i>G. pfeifferi</i> , H ₂ O				
7	G	342	359	17
8	L	309	318	9
9	R	322	316	-6
10	GL	330	340	10
11	LR	322	306	-16
12	BEO	306	299	-7
		321,83±13,33	323,00±20,51	12,00±4,36
<i>G. resinceum</i> , EtOH				
41	G	211	220	9
42	L	224	236	12
43	R	215	228	13
56	GL	248	262	14
57	LR	253	269	16
58	BEO	260	272	12
		235,17±21,05	247,83±22,54	12,67±2,34
<i>G. resinceum</i> , H ₂ O				
44	G	215	230	15
45	L	228	246	18
46	R	212	231	19
53	GL	251	264	13
54	LR	249	264	15
55	BEO	266	281	15
		236,83±21,78	252,67±20,43	15,83±2,23

Табела 7.49. Подела животиња по групама, 2. Експериментална група (алоксанска група)

Параметар Број експ. животиње	Ознака животиње	Телесна маса пре (g)	Телесна маса после (g)	Разлика телесне масе (g)
Алоксан				
19	G	361	350	11
20	L	368	352	16
21	R	351	335	16
22	GL	338	327	11
23	LR	317	298	19
24	BEO	302	300	2
		339,50±25,77	327,00±23,61	12,50±6,02
<i>G. pfeifferi</i> , EtOH + АЛОКСАН				
1	G	339	325	14
2	L	301	292	9
3	R	314	300	14
16	GL	241	240	1
17	LR	227	229	-2
18	BEO	216	212	4

7. Прилог

		273,00±51,40	266,33±45,33	8,40±5,86
<i>G. pfeifferi</i> , H ₂ O + АЛОКСАН				
4	G	312	292	20
5	L	337	326	11
6	R	322	312	10
13	GL	243	238	5
14	LR	223	216	7
15	BEO	247	239	8
		280,67±48,46	270,50±45,35	10,17±5,27
<i>G. resinaceum</i> , EtOH + АЛОКСАН				
35	G	268	254	14
36	L	239	230	9
37	R	245	231	14
50	GL	308	294	14
51	LR	299	285	14
52	BEO	280	268	12
		273,17±27,98	260,33±24,57	12,83±2,04
<i>G. resinaceum</i> , H ₂ O + АЛОКСАН				
47	G	312	300	12
48	L	309	303	6
49	R	277	267	10
38	GL	251	234	17
39	LR	244	226	18
40	BEO	239	230	9
		272,00±32,58	260,00±35,30	12,00±4,28

7. Прилог

Табела 7.50. Липидни статус, параметри параметри бубрежне и јетрене функције

Експ.група		ЛИПИДНИ СТАТУС				БУБРЕЖНА ФУНКЦИЈА		ЈЕТРЕНА ФУНКЦИЈА	
		Ук Хол.	Ук ТГС	HDL	LDL	Уреа	Kreatinin	AST	ALT
<i>G. pfeifferi</i> , EtOH + алоксан	G	1,96	1,37	1,10	0,24	79,10	448,00	348,00	75,00
	L	1,67	1,04	0,96	0,24	75,90	261,00	268,00	32,00
	R	1,64	3,49	0,80	0,01	65,20	368,00	348,00	47,00
	GL	1,90	1,19	1,10	0,26	86,40	456,00	356,00	44,00
	LR	1,42	1,01	0,86	0,10	20,80	81,00	210,00	53,00
	BEO	2,10	0,84	1,22	0,50	76,60	362,00	284,00	50,00
	CP. BP. STDEV		1,78 0,25	1,09 0,20	1,01 0,16	0,27 0,14	76.64 7.63	379,00 79,09	320,80 41,41
<i>G. pfeifferi</i> , H2O + алоксан	G	1,90	5,29	0,57	0,01	25,10	89,00	243,00	46,00
	L	2,13	1,76	1,16	0,17	66,90	537,00	359,00	67,00
	R	1,52	1,45	0,81	0,05	66,60	434,00	358,00	61,00
	GL	1,74	1,51	1,00	0,05	83,50	358,00	289,00	31,00
	LR	1,86	1,83	1,05	0,01	65,80	275,00	344,00	55,00
	BEO	2,23	1,99	1,25	0,08	88,80	373,00	256,00	51,00
	CP. BP. STDEV		1,90 0,26	1,71 0,23	0,97 0,25	0,06 0,06	74,32 10,97	395,40 97,39	308,17 52,32
<i>G. pfeifferi</i> , EtOH	G	1,45	0,67	0,85	0,30	7,40	47,00	285,00	91,00
	L	1,53	1,15	0,91	0,10	9,50	55,00	406,00	100,00
	R	1,40	0,97	0,80	0,16	8,10	49,00	325,00	99,00
	GL	2,06	0,97	1,21	0,41	10,20	54,00	285,00	67,00
	LR	1,80	0,95	1,01	0,36	9,20	51,00	226,00	61,00
	BEO	1,09	0,65	0,59	0,20	6,60	50,00	207,00	26,00
	CP. BP. STDEV		1,56 0,34	0,89 0,19	0,90 0,21	0,25 0,12	8,50 1,37	51,00 3,03	305,40 66,41

7. Прилог

<i>G. pfeifferi</i> , H ₂ O	G	1,63	1,79	0,85	0,01	7,30	46,00	345,00	78,00	
	L	1,62	1,14	0,93	0,17	7,70	49,00	305,00	99,00	
	R	1,51	0,87	0,90	0,21	8,30	45,00	247,00	82,00	
	GL	1,77	0,68	1,06	0,40	9,40	51,00	242,00	61,00	
	LR	2,07	0,82	1,24	0,46	9,10	50,00	262,00	72,00	
	BEO	1,68	1,25	0,88	0,23	10,60	50,00	332,00	101,00	
	CP. BP. STDEV	1,71	1,09	0,98	0,30	8,73	48,50	288,83	82,17	
Алоксан	G	2,16	5,11	0,84	1,00	43,90	209,00	315,00	62,00	
	L	1,87	2,93	0,99	0,01	43,00	188,00	295,00	56,00	
	R	1,60	3,53	0,72	0,01	51,30	245,00	279,00	44,00	
	GL	1,66	4,94	0,54	1,13	55,30	341,00	310,00	62,00	
	LR	1,61	1,00	0,59	1,01	41,40	183,00	291,00	64,00	
	BEO	1,49	1,00	0,79	0,25	72,50	362,00	373,00	73,00	
	CP. BP. STDEV	1,73	4,13	0,75	0,85	46,98	289,25	310,50	60,17	
Контрола	G	1,86	0,86	1,14	0,33	11,40	65,00	317,00	90,00	
	L	1,39	0,97	0,78	0,17	7,90	47,00	294,00	113,00	
	R	1,59	2,02	0,88	0,10	6,80	47,00	237,00	91,00	
	BEO	1,32	0,69	0,78	0,23	7,50	50,00	224,00	68,00	
	CP. BP. STDEV	1,54	1,14	0,90	0,21	7,40	52,25	268,00	98,00	
	<i>G. resinascens</i> , ЕЮН + алоксан	G	1,69	1,32	0,92	0,20	6,20	52,00	169,00	17,00
		L	1,56	1,20	0,85	0,20	7,50	54,00	217,00	26,00
R		1,92	1,28	1,02	0,30	6,60	52,00	198,00	23,00	
GL		1,42	0,84	0,65	0,40	5,90	43,00	362,00	23,00	
LR		1,39	0,56	0,68	0,50	5,50	46,00	221,00	27,00	
BEO		1,31	0,87	0,60	0,30	5,70	44,00	181,00	8,00	

7. Прилог

CP. BP.		1,55	1,01	0,79	0,32	6,23	48,50	224,67	23,20
STDEV		0,23	0,30	0,17	0,12	0,73	4,72	70,21	3,90
<i>G. resinaceum</i> , H ₂ O + алоксан	G	1,46	0,68	0,81	0,30	7,00	57,00	205,00	17,00
	L	1,82	0,96	1,05	0,30	6,50	53,00	171,00	21,00
	R	1,31	1,05	0,69	0,10	6,90	56,00	189,00	22,00
	GL	1,39	0,51	0,66	0,50	5,60	43,00	201,00	13,00
	LR	1,45	0,70	0,68	0,50	5,50	42,00	283,00	17,00
	BEO	1,52	0,58	0,75	0,50	6,10	49,00	196,00	17,00
CP. BP.		1,49	0,75	0,77	0,37	6,27	50,00	207,50	17,83
STDEV		0,18	0,21	0,15	0,16	0,64	6,45	38,87	3,25
<i>G. resinaceum</i> , EtOH	G	1,46	0,99	0,80	0,20	9,70	64,00	262,00	53,00
	L	1,68	2,06	0,85	0	9,60	55,00	312,00	29,00
	R	2,26	3,44	0,93	0	19,60	101,00	268,00	13,00
	GL	1,47	0,81	0,69	0,40	6,80	45,00	294,00	26,00
	LR	1,48	0,77	0,73	0,40	6,90	42,00	281,00	35,00
	BEO	1,44	0,73	0,67	0,40	7,10	46,00	291,00	30,00
CP. BP.		1,63	1,47	0,78	0,35	8,02	50,40	284,67	34,60
STDEV		0,32	1,09	0,10	0,10	1,49	9,02	18,33	10,78
<i>G. resinaceum</i> , H ₂ O	G	1,46	0,82	0,64	0,40	6,90	48,00	335,00	14,00
	L	1,57	1,30	0,80	0,20	8,90	64,00	328,00	35,00
	R	1,88	1,95	0,85	0,10	8,90	61,00	309,00	26,00
	GL	1,55	1,35	0,82	0,10	8,40	55,00	353,00	29,00
	LR	1,61	0,98	0,79	0,40	7,50	44,00	608,00	17,00
	BEO	1,22	0,49	0,56	0,40	7,40	45,00	516,00	4,00
CP. BP.		1,55	1,15	0,74	0,27	8,00	52,83	558,17	24,20
STDEV		0,21	0,51	0,12	0,15	0,85	8,47	58,51	8,64

БИОГРАФИЈА

Милена Рашета је рођена 21. фебруара 1984. у Бихаћу. До 1995. године је живела у Доњем Лапцу (Република Хрватска), где је завршила прва четири разреда основне школе. Основну школу „Жарко Зрењанин“ завршила је у Апатину, а средњу медицинску школу „Др Ружица Рип“ у Сомбору као носилац Вукове дипломе.



Природно-математички факултет у Новом Саду је уписала 2003. године, а дипломирала 2008. године и стекла звање Дипломирани хемичар - биохемија. Исте године уписала је Докторске академске студије, смер Доктор биохемијских наука, а 2010. године изабрана је у звање истраживача приправника за ужу научну област Биохемија.

Почев од 2010. године, континуирано је била ангажована на Катедри за биохемију и хемију природних производа, Департмана за хемију, биохемију и заштиту животне средине ПМФ-а у Новом Саду у извођењу практичне наставе за студенте хемије из следећих курсева: Биохемија, Основи биохемије и Структура и функција протеина.

Научно-истраживачка активност Милене Рашете се у највећој мери одвијала кроз рад на пројектима фундаменталних истраживања из области биохемије, финансираним од стране Министарства науке, просвете и технолошког развоја. Од јула до децембра 2010. године била је ангажована у раду у оквиру пројекта „Структура и функција редокс и хидролитичких ензима: Истраживање њиховог механизма дејства и неких аспеката њихове примене у биотехнологији и медицини“ (2006-2010), Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије, затим на пројекту „Биолошки активни природни производи као потенцијални извор нових лекова и дијететских суплемената“ (2011-данас), Министарства просвете, науке и технолошког развоја.

Коаутор је четири рада објављена у међународним часописима, и преко 20 саопштења на међународним и скуповима националног значаја.

Члан је Српског хемијског друштва.

Нови Сад, јун 2016.године

Милена Рашета

**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број:
РБР

Идентификациони
број:
ИБР

Тип документације: Монографска документација
ТД

Тип записа: Текстуални штампани материјал
ТЗ

Врста рада (дипл., маг., Докторска дисертација
докт.):
ВР

Име и презиме аутора: Милена Ј. Рашета
АУ

Ментори (титула, име, др Мира Поповић, професор у пензију Природно-
презиме, звање): математичког факултета, Универзитета у Новом
МН Саду

др Маја Караман, ванредни професор Природно-
математичког факултета, Универзитета у Новом
Саду

Наслов рада: Детекција биоактивних супстанци одабраних врста
НР гљива рода *Ganoderma* (Basidiomycota) и њихова
биолошка активност

Језик публикације: Српски (ћирилица)
ЈП

Језик извода: Српски / Енглески
ЈИ

Земља публиковања: Република Србија
ЗП

Уже географско Војводина
подручје:

УГП

Година: 2016.
ГО

Издавач: Ауторски репринт
ИЗ

Место и адреса: Нови Сад; Трг Доситеја Обрадовића 3, 21000 Нови
МА Сад, Република Србија

Физички опис рада:
ФО Број поглавља: 7; Страница: 387 (70 у Додатном материјалу на ЦД-у); Слика: 34; Табела: 89 (50 у додатном материјалу на ЦД-у); Референци: 576; Графикона: 98 (98 у додатном материјалу на ЦД-у); Хистограма: 25; Прилога: 1 (приложен на ЦД-у као Додатни материјал)

Научна област:
НО Хемија

Научна дисциплина:
НД Биохемија / Микологија

Предметна одредница,
кључне речи:
ПО *Ganoderma*, Basidiomycota, макрогљиве, медицинске гљиве, слободни радикали, секундарни метаболити, биолошка активност, антиоксидантна активност *in vitro* и *in vivo*, антимикуробна активност, антиинфламаторна активност, 1-COX, 12-LOX, антипролиферативна активност, MCF-7, антидијабетогена активност, алоксан, AAS, макро- и микроелементи, LC-MS-MS, фенолна једињења, Bradford-ов тест, PSA тест

УДК

Чува се:
ЧУ Библиотека Департамента за хемију, биохемију и заштиту животне средине, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, Трг Доситеја Обрадовића 3, 21000 Нови Сад, Република Србија

Важна напомена:
ВН -

Извод:
ИЗ У оквиру ове докторске дисертације испитан је хемијски састав и биолошке активности EtOH, H₂O и CHCl₃ екстракта четири врсте гљива рода *Ganoderma* (Basidiomycota): *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. pfeifferi*, *G. resinaceum* са територије Војводине. Хемијски састав анализираних врста је одређен применом: AAS методе (састав макро- и микроелемената у сувим остацима гљива) и LC-MS/MS технике (квантитативни састав фенолних једињења и флавоноида) при чему је детектовано 12 једињења. Спектрофотометријским методама је одређен садржај протеина, шећера, укупних фенола и флавоноида, код којих је највећи садржај протеина утврђен за EtOH екстракте *G. applanatum* и *G. pfeifferi*. Испитивања биолошких активности екстракта обухватила су: одређивање *in vitro* и *in vivo* антиоксидантне, антимикуробне, антиинфламаторне, антипролиферативне и антидијабетогене активности.

Антиоксидантна активност (способност неутрализације слободних радикала и редукциони потенцијал) је одређена спектрофотометријским методама, при којој су најбољу активност остварили H₂O екстракти *G. applanatum*. Антимикробна активност анализираних екстраката одређена је испитивањем антибактеријског, антифунгалног и антивиралног потенцијала где се издвојила *G. pfeifferi* врста. Антиинфламаторни потенцијал EtOH и CHCl₃ екстраката одређен је *ex vivo* методом мерењем способности инхибиције продукције медијатора инфламације (продукти метаболизма арахидонске киселине) при којој су бољу активност испољили CHCl₃ екстракти.

Ефекат EtOH и H₂O екстраката врста рода *Ganoderma* на раст MCF ћелијске линије испитан је МТТ тестом, а посебно су се издвојили EtOH екстракти врста после 72h.

Остварена антидијабетогена активност EtOH и H₂O екстраката врста *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* код алоксан-индукованог *D. mellitus*-а на експерименталним животињама праћена је регенерацијом β-ћелија Лангерхансових острваца панкреаса. Као потенцијални нефро- и хепатопротективни агенси се издвајају екстракти *G. resinaceum*.

Сумарно, укупни биопотенцијал анализираних врста рода *Ganoderma* на основу спроведених анализа хемијске карактеризације и биолошке активности упућује на могућност њихове потенцијалне примене као нутрацеутика и додатака исхрани, у будућности уз неопходност додатних микохемијских истраживања ових врста, посебно терпеноида и полисахарида, као и других биолошких активности као што је неуропротективна.

Датум прихватања
теме од стране Сената:
ДП
Датум одбране:
ДО

23.12.2013.

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

Председник: др Неда Мимица-Дукић, редовни професор
Природно-математичког факултета, Универзитета у
Новом Саду

Ментор: др Мира Поповић, професор у пензији Природно-
математичког факултета, Универзитета у Новом
Саду

Ментор: др Маја Караман, ванредни професор Природно-
математичког факултета, Универзитета у Новом
Саду

Члан: др Биљана Кауриновић, ванредни професор,
Природно-математичког факултета, Универзитета у
Новом Саду

Члан: др Борис Поповић, ванредни професор
Пољопривредног факултета, Универзитета у Новом
Саду

**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: PhD Thesis
CC
Author: Milena J. Rašeta
AU
Mentors: Retired professor Mira Popović, PhD, Faculty of Sciences,
MN University of Novi Sad

Associate professor Maja Karaman, PhD, Faculty of
Sciences, University of Novi Sad
Title: Detection of bioactive substances selected fungal species
TI of the genus Ganoderma (Basidiomycota) and their
biological activity
Language of text: Serbian (Circ)
LT
Language of abstract: Serbian(Cirilic) / English
LA
Country of
publication: Republic of Serbia
CP
Locality of
publication: Vojvodina
LP
Publication year: 2016.
PY
Publisher: Author's reprint
PU
Publication place: Novi Sad; Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad,
PP Republic of Serbia

Physical description: Chapters: 7 (7. Supplementary data on CD); Pages: 398
 PD (73 on Supplementary data on CD); References: 576;
 Pictures: 34; Tables: 89 (50 on Supplementary data on
 CD); Figures: 98 (98 on Supplementary data on CD);
 Charts: 25

Scientific field Chemistry
 SF

Scientific discipline Biochemistry / Micology
 SD

Subject, Key words *Ganoderma*, Basidiomycota, macrofungi, medicinal
 SKW mushrooms, free radical species, secondary metabolites,
 biological activity, antioxidant activity *in vitro* and *in vivo*,
 antimicrobial activity, antiinflammatory activity, 1-COX,
 12-LOX, antiproliferative activity, MCF-7, antidiabetic
 activity, alloxan, AAS, macro- and microelements, LC-MS-
 MS, phenolic compounds, Bradford assay, PSA assay

UC

Holding data: Library of Department of Chemistry, Biochemistry and
 HD Environmental Protection, Faculty of Sciences, University
 of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad,
 Republic of Serbia

Note: -
 N

Abstract: Whitin this doctoral thesis the chemical
 AB composition and biological activity of EtOH, H₂O and CHCl₃
 extracts of four fungal species which belong to genus
Ganoderma (phylum Basidiomycota): *G. applanatum*, *G.*
lucidum, *G. pfeifferi*, *G. resinaceum* were determined. The
 samples were collected from different localities in
 Vojvodina. Chemical characterization included: AAS
 methods (compositon of macro- and microelements in d.w.
 of fungi) and LC-MS/MS technique (quantitative analysis
 of phenolic compounds and flavonoids) wherein the 12
 selected phenolic compounds were detected. The total
 proteins, sugars, phenolics and flavonoids content were
 determined using spectrophotometric methods. The
 highest protein content was determined in EtOH extracts
 of *G. applanatum* and *G. pfeifferi* species. In order to assess
 the biological potential, the *in vitro* and *in vivo* antioxidant,
 antimicrobial, anti-inflammatory, antiproliferative and
 antidiabetic activities of the extracts were investigated.

The antioxidant activity (the ability of neutralizing
 free radicals and reduction potential) estimated by

spectrophotometric methods. The highest antioxidant potential was noticed in H₂O extracts of *G. applanatum*. Evaluation of antimicrobial activity included the estimation of antibacterial, antifungal and antiviral activity, whereby the species *G. pfeifferi* showed the highest potential. The anti-inflammatory activity of EtOH and CHCl₃ extracts was determined by *ex vivo* method measuring the ability of production inhibition of inflammation mediators (products of arachidonic acid metabolism), where the CHCl₃ extracts were exhibited better activity.

The effect of EtOH and H₂O extracts of *Ganoderma* species on the growth of the cell line MCF-7, has been examined using MTT assay (stand out ethanolic extracts of analyzed species after 72h incubation period).

Achieved antidiabetic activity of EtOH and H₂O extracts of *G. pfeifferi* and *G. resinaceum* at alloxan-induced *D. mellitus* in experimental animals was followed by regeneration of β -cells of Langerhans pancreatic islets. Extracts of *G. resinaceum* were allocated as a potential nephro- and hepatoprotective agents.

In summary, the overall biological potential of the analyzed species of the genus *Ganoderma* based on results for chemical and biological characterization indicate that they could be used as nutraceuticals and food supplements in the future, with further the necessity of additional mycochemical investigation (especially terpenoids and polysaccharides) and other biological activity such as neuroprotective.

Accepted on Senate 23.12.2013.

on:

AS

Defended:

DE

Thesis Defend

Board:

DB

President: Professor Neda Mimica-Dukić, PhD, Faculty of Sciences,
University of Novi Sad

Mentor: Retired professor Mira Popović, PhD, Faculty of Sciences,
University of Novi Sad

Mentor: Associate Professor Maja Karaman, PhD, Faculty of
Sciences, University of Novi Sad

Member: Associate Professor Biljana Kaurinović, PhD, Faculty of
Sciences, University of Novi Sad

Member: Associate Professor Boris Popović, PhD, Faculty of
Agriculture, University of Novi Sad