



**Univerzitet u Novom Sadu
Prirodno-matematički fakultet
Departman za biologiju i ekologiju**



Ljiljana Janjušević, MSc

**Biološka aktivnost i hemijski sastav
ekstrakata odabranih autohtonih makrogljiva**

- Doktorska disertacija -

Novi Sad, 2017.

Koristim ovu priliku da se zahvalim svima koji su omogućili izradu ove doktorske disertacije. Posebnu zahvalnost dugujem:

Mentorki dr **Maji Karaman**, vanrednoj profesorki Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, na velikom razumevanju i podršci tokom svih godina zajedničkog rada i nesebičnom zalaganju prilikom dizajniranja i pisanja ove disertacije, i mentoru dr **Borisu Pejnu**, naučnom saradniku Odseka za nauke o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja (IMSI) Univerziteta u Beogradu, na svesrdnoj pomoći i brojnim savetima tokom pisanja i dizajniranja doktorske disertacije.

Članovima komisije prof. dr **Petru Kneževiću**, vanrednom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, (predsedniku Komisije), na dragocenim savetima i iskrenoj podršci tokom pisanja disertacije, naučnoj savetnici dr **Stanislavi Gorjanović** (članu Komisije), vanrednoj profesorki dr **Sonji Kaišarević** (članu Komisije) i naučnoj saradnici, dr **Aleksandri Novaković** (članu Komisije), na dobronamernim savetima i podršci tokom eksperimentalnog rada i pisanja disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem redovnoj profesorki dr **Nedi Mimici Dukić**, rukovodiocu projekta OI 172058 „Biološki aktivni prirodni proizvodi kao potencijalni izvori novih lekova i dijetetskih suplemenata“ u okviru kojeg je urađen značajan broj eksperimenata ove doktorske disertacije.

Od izuzetnog značaja za rad je bila i saradnja sa naučnim timom Instituta za biomolekularnu hemiju (CNR - ICB) u Pocuoliju (Napulj), Republika Italija. Posebno se zahvaljujem **Giuseppini Tommonaro i Carmine Iodice** na pomoći pri dobijanju eksperimentalnih podataka za anti-acetilholinesteraznu aktivnost.

Od posebnog značaja za izradu ovog rada bila mi je saradnja sa članovima Elektrohemijske laboratorije Instituta za opštu i fizičku hemiju u Beogradu, naučnom savetnicom u penziji dr **Desankom Sužnjević** i naučnim saradnikom dr **Ferencom Pastorom**, na čemu im se toplo zahvaljujem.

Posebnu zahvalnost dugujem naučnoj savetnici dr **Dragici Jakovljević**, na pomoći pri karakterizaciji polisaharidnih ekstrakata metodom FTIR, kolegi **Filipu Šibulu**, istraživaču saradniku na pomoći oko detekcije fenolnih jedinjenja i dr **Marku Kebertu**, naučnom saradniku Instituta za nizijsko šumarstvo na pomoći pri identifikaciji biogenih elemenat.

Veliko hvala docentkinji dr **Mileni Rašeti** na nesebičnoj pomoći tokom izvođenja spektrofotometrijskih analiza antioksidativne aktivnosti ekstrakata gljiva. Hvala dragoj kolegici **Milani Rakić**, asistentkinji i dr **Dragiši Saviću** na pomoći prilikom prikupljanja i determinisanja gljiva.

Takođe, veliku zahvalnost dugujem prof. **Biljani Kukavica** i njenom saradniku **Dinu Hasanagiću**, sa Prirodno-matematičkog fakulteta, pri pomoći u eksperimentalnom delu ovog rada.

Koristim ovu priliku da se zahvalim profesorima sa Katedre za mikrobiologiju Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sad, redovnom profesoru dr **Draganu Radnoviću** i vanrednoj profesorki **Jelici Simeunović**, kao i svim kolegama iz sobe br. 24/IV - **Dajani, Eleonori, Kristini, Verici, Milivoju, Dragani, Aleksandri i Oliveri** i hvala **Sandi**, laborantu na pozitivnoj radnoj atmosferi, kolegijalnosti i pomoći.

Zahvalnost dugujem i master studentima **Neveni Novaković, Jeleni Jovanović i Nemanji Spremo** na pomoći u eksperimentalnom radu u koji su bili uključeni tokom izrade svojih master radova.

Hvala mojoj kumi **Ivani Koleška** na podršci i razumevanju koje mi pruža, i hvala dragoj **Bilji Kiproviski**, na pomoći prilikom pisanja i izrade teze.

Mojoj porodici beskrajno hvala na ljubavi, razumevanju i podršci koju mi pružaju tokom svih ovih godina.

Ljiljana Janjušević

SADRŽAJ:

1. UVOD	10
2. OPŠTI DEO	11
2.1. Medicinski značaj gljiva	11
2.2. Hemijski sastav gljiva	12
2.3. Ekologija gljiva	14
2.3.1. Lignikolne gljive	14
2.3.2. Terikolne gljive	15
2.4. Antioksidativni stres i sistemi antioksidativne zaštite	16
2.5. Antimikrobna aktivnost gljiva	19
2.5.1. Antibakterijska aktivnost gljiva	19
2.5.2. Antifungalna aktivnost gljiva	20
2.5.3. Antivirusna aktivnost gljiva	21
2.6. Inhibicija enzima acetilholinesteraze i Alchajmerova bolest	24
2.7. Antitumorska aktivnost gljiva	26
2.8. Analizirane vrste gljiva	28
2.8.1. <i>Bjerkandera adusta</i> (Willd.) P. Karst 1879	28
2.8.2. <i>Pleurocybella porrigens</i> (Pers.) Singer 1947	29
2.8.3. <i>Stereum hirsutum</i> (Willd.) Pers. 1800	30
2.8.4. <i>Stereum subtomentosum</i> Pouzar 1964	31
2.8.5. <i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd 1921	32
2.8.6. <i>Amanita strobiliformis</i> (Paulet ex Vittad.) Bertill. 1866.....	33
2.8.7. <i>Hydnum repandum</i> L. 1753	34
3. CILJ RADA	35
4. EKSPERIMENTALNI DEO	37
4.1. Biološki materijal	37
4.2. Priprema ekstrakata	38
4.2.1. Vodeni, etanolni i metanolni ekstrakti	38
4.2.2. Polisaharidni ekstrakti	39
4.3. Određivanje antiradikalske aktivnosti	40
4.3.1. Anti-OH radikalska aktivnosti	40
4.3.2. Anti-O ₂ ⁻ radikalska aktivnosti	40
4.3.3. Anti-NO radikalska aktivnosti	41
4.3.4. Anti-Asc radikalska aktivnosti	41
4.3.5. Anti-DPPH radikalska aktivnosti	41
4.3.6. Anti-ABTS radikalska aktivnosti	41
4.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti	41
4.4.1. Redukciona sposobnost određena FRAP testom	42
4.4.2. Redukciona sposobnost određena polarografskom HPMC metodom	42
4.5. Određivanje antimikrobne aktivnosti	44
4.5.1. Analizirani sojevi mikroorganizama	44
4.5.2. Priprema suspenzije mikroorganizama i standardizacija inokuluma	45
4.5.3. Procena vrednosti MIC i MBC/MFC	46

4.5.4.	Antifungalna aktivnost	47
4.5.5.	Antivirusna aktivnost	47
4.6.	Određivanje anti-acetilholinesterazne aktivnosti	48
4.6.1.	<i>In solid</i> (TLC ploča)	48
4.6.2.	<i>In liquid</i>	49
4.7.	Određivanje citotoksične aktivnosti	49
4.8.	Hemijska karakterizacija odabranih gljiva	51
4.8.1.	Polisaharidi	51
4.8.2.	Ukupan sadržaj proteina	51
4.8.3.	Ukupan sadržaj fenola i flavonoida	52
4.8.4.	Fenolni profil (HPLC-MS/MS)	52
4.8.5.	Organske kiseline (HPLC)	52
4.8.6.	Masne kiseline (GC)	53
4.8.7.	Biogeni elementi (AAS)	53
4.9.	Statistička analiza	54
5.	REZULTATI	55
5.1.	Biološka aktivnost analiziranih gljiva	55
5.1.1.	Antiradikalna aktivnost	55
5.1.1.1.	Anti-OH radikalska aktivnost	55
5.1.1.2.	Anti-O ₂ ⁻ radikalska aktivnost	56
5.1.1.3.	Anti-NO radikalska aktivnost	57
5.1.1.4.	Anti-Asc radikalska aktivnost	58
5.1.1.5.	Anti-DPPH radikalska aktivnost	59
5.1.1.6.	Anti-ABTS radikalska aktivnost	59
5.1.2.	Antioksidativna aktivnost	61
5.1.2.1.	FRAP metoda	61
5.1.2.2.	HPMC metoda	62
5.1.3.	Klaster analiza dobijenih antiradikalnih i antioksidativnih vrednosti	64
5.1.4.	Antimikrobna aktivnost	65
5.1.4.1.	Antibakterijska aktivnost	65
5.1.4.2.	Antibiotska rezistencija	69
5.1.4.3.	Antifungalna aktivnost	70
5.1.4.4.	Antivirusna aktivnost	74
5.1.5.	Anti-acetilholinesterazna aktivnost	74
5.1.5.1.	Inhibicija AChE <i>in solid</i>	74
5.1.5.2.	Inhibicija AChE <i>in liquid</i>	75
5.1.6.	Citotoksična aktivnost	76
5.2.	Hemijska karakterizacija odabranih gljiva	79
5.2.1.	Polisaharidi	79
5.2.1.1.	Planarna hromatografija	79
5.2.1.2.	Elementalna organska mikroanaliza (EOMA)	79
5.2.1.3.	FTIR spektroskopija	81
5.2.2.	Ukupni proteini	86
5.2.3.	Ukupni fenoli i flavonoidi	86
5.2.4.	HPLC-MS/MS analiza odabranih fenolnih jedinjenja	89

5.2.5.	Korelacije sadržaja UF i Ufl sa antiradikalnim i antioksidacionim testovima	95
5.2.6.	Organske kiseline	96
5.2.7.	Masne kiseline	97
5.2.8.	Biogeni elementi	100
6.	DISKUSIJA	110
6.1.	Biološka aktivnost	102
6.2.	Hemijski sastav	114
7.	ZAKLJUČAK	120
8.	LITERATURA	124

LISTA TABELA U TEKSTU

Tabela 1. Pregled ispitivanih vrsta gljiva, lokaliteta i vaučer vrsta	37
Tabela 2. Ispitivani sojevi mikroorganizama	44
Tabela 3. Protokol za određivanje vrednosti MIC	46
Tabela 4. Vrednosti MIC i MBC analiziranih MeOH i EtOH ekstrakata gljiva na odabrane bakterijske sojeve (mg/mL)	67
Tabela 5. Vrednosti MIC testiranih antibiotika (mg/mL)	70
Tabela 6. Vrednosti MIC i MFC analiziranih ekstrakata gljiva na analizirane fitopatogene gljive (mg/mL)	73
Tabela 7. Anti-acetilholinesterazna aktivnost	76
Tabela 8. Citotoksična aktivnost ekstrakata (nakon 24 h i 72 h inkubacije)	78
Tabela 9. Elementalna organska mikroanaliza PSH ekstrakata	80
Tabela 10. Sadržaj proteina u PSH ekstraktima	80
Tabela 11. Ukupan sadržaj proteina u ispitivanim vrstama gljiva	86
Tabela 12. Detektovana fenolna jedinjenja u ekstraktima vrste <i>B. adusta</i>	91
Tabela 13. Detektovana fenolna jedinjenja u ekstraktima vrste <i>P. porrigens</i>	91
Tabela 14. Detektovana fenolna jedinjenja u ekstraktima vrste <i>S. hirsutum</i>	92
Tabela 15. Detektovana fenolna jedinjenja u ekstraktima vrste <i>S. subtomentosum</i>	92
Tabela 16. Detektovana fenolna jedinjenja u ekstraktima vrste <i>T. versicolor</i>	93
Tabela 17. Detektovana fenolna jedinjenja u ekstraktima vrste <i>A. strobiliformis</i>	94
Tabela 18. Detektovana fenolna jedinjenja u ekstraktima vrste <i>H. repandum</i>	94
Tabela 19. Koeficijenti korelacije između OH [•] , O ₂ ^{•-} , NO [•] , ABTS ^{•+} , DPPH [•] , FRAP, HPMC, UF i Ufl	95
Tabela 20. Sadržaj organskih kiselina u analiziranim vrstama gljiva (mg/g s.m.)	96
Tabela 21. Rezultati GC analize metil-estara masnih kiselina (%)	98
Tabela 22. Sadržaj makroelemenata u plodnim telima ispitivanih gljiva	100
Tabela 23. Sadržaj mikroelemenata u plodnim telima ispitivanih gljiva	101

LISTA SLIKA U TEKSTU

Slika 1 Građa ćelijskog zida gljiva	12
Slika 2. Izgled konzolastog plodnog tela gljive	14
Slika 3. Izgled pečurkastog plodnog tela gljiva.....	15
Slika 4. Endogeno i egzogeno generisanje slobodnih radikala	17
Slika 5. Antioksidativni sistemi zaštite	18
Slika 6. Mehanizmi delovanja antivirusnih agenasa	22
Slika 7. Enzim acetilholinesteraza	24
Slika 8. Efekat AChE inhibitora	25
Slika 9. Antitumorska jedinjenja izolovana iz gljiva	27
Slika 10. <i>Bjerkandera adusta</i> (Willd.) P. Krast	28
Slika 11. Mapa rasprostranjenja vrste <i>B. adusta</i>	28
Slika 12. <i>Pleurocybella porrigens</i> (Pers.) Singer 1947	29
Slika 13. Mapa rasprostranjenja vrste <i>P. porrigens</i>	29
Slika 14. <i>Stereum hirsutum</i> (Willd.) Pers. (1800)	30
Slika 15. Mapa rasprostranjenja vrste <i>S. hirsutum</i>	30
Slika 16. <i>Stereum subtomentosum</i> Pouzar 1964	31
Slika 17. Mapa rasprostranjenja vrste <i>S. subtomentosum</i>	31
Slika 18. <i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd 1921	32
Slika 19. Mapa rasprostranjenja vrste <i>T. versicolor</i>	32
Slika 20. <i>Amanita strobiliformis</i> (Paulet ex Vittad.) Bertill. 1866	33
Slika 21. Mapa rasprostranjenja vrste <i>A. strobiliformis</i>	33
Slika 22. <i>Hydnum repandum</i> L. 1753	34
Slika 23. Mapa rasprostranjenja vrste <i>H. repandum</i>	34
Slika 24. Ekstrakcija polisaharida iz gljiva	39
Slika 25. Šema polarografskog uređaja	42
Slika 26. Uporedni prikaz vrednosti IC ₅₀ za anti-OH radikalsku aktivnost	55
Slika 27. Uporedni prikaz vrednosti IC ₅₀ za anti-O ₂ ⁻ radikalsku aktivnost	56
Slika 28. Uporedni prikaz vrednosti IC ₅₀ za anti-NO radikalsku aktivnost	57
Slika 29. Uporedni prikaz anti-Asc radikalske aktivnosti	58
Slika 30. Uporedni prikaz vrednosti IC ₅₀ za anti-DPPH radikalsku aktivnost	59
Slika 31. Uporedni prikaz vrednosti za anti-ABTS radikalsku aktivnost	60
Slika 32. Uporedni prikaz redukcione sposobnosti određene FRAP testom	61
Slika 33. Antioksidativna aktivnost određena polarografskom HPMC metodom	63
Slika 34. Dendogram sa grupama ekstrakata gljiva prema antioksidativnoj aktivnosti, dobijen na osnovu klaster analize podataka svih primenjenih metoda	65
Slika 35. Pozicije centriola ekstrakata ispitivanih gljiva na osnovu dobijenih vrednosti MIC i MBC protiv bakterijskih sojeva	69
Slika 36. Pozicije centriola ekstrakata ispitivanih gljiva na osnovu dobijenih vrednosti MIC i MFC protiv fitopatogenih gljiva	72
Slika 37. Antivirusna aktivnost a) MeOH ekstrakata; b) EtOH ekstrakata	74
Slika 38. <i>In solid</i> aktivnost inhibicije AChE odabranih ekstrakata analiziranih vrsta gljiva	75
Slika 39. Uporedni prikaz antiproliferativne aktivnosti ekstrakata	77
Slika 40. FTIR spektar polisaharidnog ekstrakta vrste <i>B. adusta</i>	82
Slika 41. FTIR spektar polisaharidnog ekstrakta vrste <i>S. hirsutum</i>	82
Slika 42. FTIR spektar polisaharidnog ekstrakta vrste <i>S. subtomentosum</i>	82
Slika 43. FTIR spektar polisaharidnog ekstrakta vrste <i>T. versicolor</i>	83
Slika 44. FTIR spektar polisaharidnog ekstrakta <i>P. porrigens</i>	83
Slika 45. FTIR spektar polisaharidnog ekstrakta vrste <i>A. strobiliformis</i>	83
Slika 46. FTIR spektar polisaharidnog ekstrakta vrste <i>H. repandum</i> I	84
Slika 47. FTIR spektar polisaharidnog ekstrakta vrste <i>H. repandum</i> II	84
Slika 48. Uporedni prikaz sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima ispitivanih gljiva	87
Slika 49. Uporedni prikaz sadržaja ukupnih flavonoida u ekstraktima ispitivanih vrsta	87
Slika 50. Uporedni prikaz sadržaja zasićenih (SFA), mononezasićenih (MUFA) i polinezasićenih (PUFA) i ukupnih nezasićenih (UFA) masnih kiselina	99

LISTA SKRAĆENICA U TEKSTU

ABTS^{•+} – ABTS radikal
ACh – acetilholin
AChE – enzim acetilholinesteraza
AChEi – inhibitori enzima acetilholinesteraze
AK – askorbinska kiselina
DMSO – dimetil sulfoksid
DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidazil
DPPH[•] – DPPH radikal
EOMA – elementalna organska mikroanaliza
EtOH ekstrakt – etanolni ekstrakt
FC – Folin-Ciocalteu reagens
FTIR – Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GD-FID – gasna hromatografija sa plamenim jonizujućim detektorom (*engl.* Gas Chromatography - Flame Ionization Detector)
H₂O ekstrakt – vodeni ekstrakt
HPLC-MS/MS – tečna hromatografija visokih performansi sa masenim detektorom (*engl.* High Performance Liquid Chromatography -Mass Spectrometry)
HPMC-hidroksoperhidroksoživa(II) kompleks (*engl.* HydroxoPerhydroxoMercury(II) Complex)
IC₅₀ – koncentracija uzorka koji inhibiše/neutrališe 50 % slobodnih radikala
KV – kvercetin
MBC – minimalna baktericidna koncentracija
MEM – Minimum Essential Medium
MeOH ekstrakt – metanolni ekstrakt
MFC – minimalna fungicidna koncentracija
MIC – minimalna inhibitorna koncentracija
MUFA – mononezasićene masne kiseline
NO[•] – azot monoksid radikal
O₂^{•-} – superoksid anjon radikal
OH[•] – hidroksil radikal
PG – pirogalol
PSH ekstrakt – polisaharidni ekstrakt
PUFA – polinezasićene masne kiseline
ROS – reaktivne kiseonične vrste (*engl.* Reactive Oxygen Species)
UF – ukupni fenoli
UFA – nezasićene kiseline
UFI – ukupni flavonoidi
s.m. – suve mase
BA – *Bjerkandera adusta*
PP – *Pleurocybella porrigens*
SH – *Stereum hirsutum*
SS – *Stereum subtomentosum*
TV – *Trametes versicolor*
AS – *Amanita strobiliformis*
HR I – *Hydnum repandum* (lokalitet Tara)
HR II – *Hydnum repandum* II (lokalitet Vršečki breg)

1. UVOD

Ova doktorska disertacija urađena je u laboratorijama Departmana za biologiju i ekologiju (Katedra za mikrobiologiju i Katedra za fiziologiju životinja) i Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine (Tačna hromatografija) Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu; Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju (IHTM) Univerziteta u Beogradu; Centra za hemiju, Instituta za multidisciplinarna istraživanja (IMSI) - Odsek za nauke o živim sistemima Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu; Instituta za opštu i fizičku hemiju (IOFH) u Beogradu; Fakulteta za fizičku hemiju (EPR laboratorija) Univerziteta u Beogradu; Institutu za biomolekularnu hemiju (CNR - ICB) u Pocuoliju (Napulj) Republika Italija; Instituta za prehrambene tehnologije (FINS) i Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu; Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu; Prirodno-matematičkog i Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci; kao i u laboratorijama Instituta za nizijsko šumarstvo Univerziteta u Novom Sadu.

Ista je realizovana u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod nazivom „Biološki aktivni prirodni proizvodi kao potencijalni izvori novih lekova i dijetetskih suplemenata“, pod rukovodstvom prof. dr Nede Mimice-Dukić (OI 172058).

Cilj istraživanja bio je da se odredi biološka aktivnost i hemijski sastav autohtonih makrogljiva, preciznije pet lignikolnih i dve terikolne vrste gljiva.

Opšti deo rada ukratko opisuje organizme gljiva, daje uvid u njihovu hemijsku strukturu i do sada opisanu biološku aktivnost.

Eksperimentalni deo rada obuhvata podatke o sakupljenom biološkom materijalu, pripremi ekstrakata plodnih tela gljiva, kao i metode i protokole za određivanje biološke aktivnosti i hemijskog sastava.

Rezultati i diskusija sadrže opis i interpretaciju eksperimentalno dobijenih podataka i njihovo značenje.

Zaključak rada ističe značaj moguće upotrebe ispitivanih gljiva ili njihovih biološki aktivnih jedinjenja kao medicinski značajne, odnosno funkcionalne hrane.

2. OPŠTI DEO

2.1. Medicinski značaj gljiva

Lekovita svojstva makrogljiva, predstavnika razdela Basidiomycota, poznata su i koriste se od davnina. Istorija korišćenja mnogih ekstrakata različitih vrsta gljiva u narodnoj medicini koji pokazuju imunostimulatornu, antiinflamatornu i antikancerogenu aktivnost datira iz drevnog Japana, Kine i drugih zemalja Dalekog Istoka (Hobbs, 1995; Wasser i Weis, 1999). Sa druge strane, u mnogim razvijenim zemljama (SAD, Izrael) naučna dostignuća iz ove oblasti koriste se u njihovoj implementaciji u terapijske svrhe (Wasser, 2002). Među najpoznatijim supstancama, prisutnim u gljivama, koje pokazuju farmakološka svojstva (posebno imunomodulatorna i antikancerogena), jesu polisaharidi (Ooi i Liu, 2000; Wasser, 2002; Moradali i sar., 2007; Zhang i sar., 2007). Naime, polisaharidi i polisaharidno-proteinski kompleksi privukli su pažnju istraživača jer se smatra da mogu da inhibiraju rast tumora poboljšavajući sopstvenu sposobnost organizma da se brani. Generalno, smatraju se odbrambenim mehanizmima domaćina koji su sposobni da modifikuju biološki odgovor i nazivaju se biološki imunomodulatori (Leung i sar., 2006; Moradali i sar., 2007).

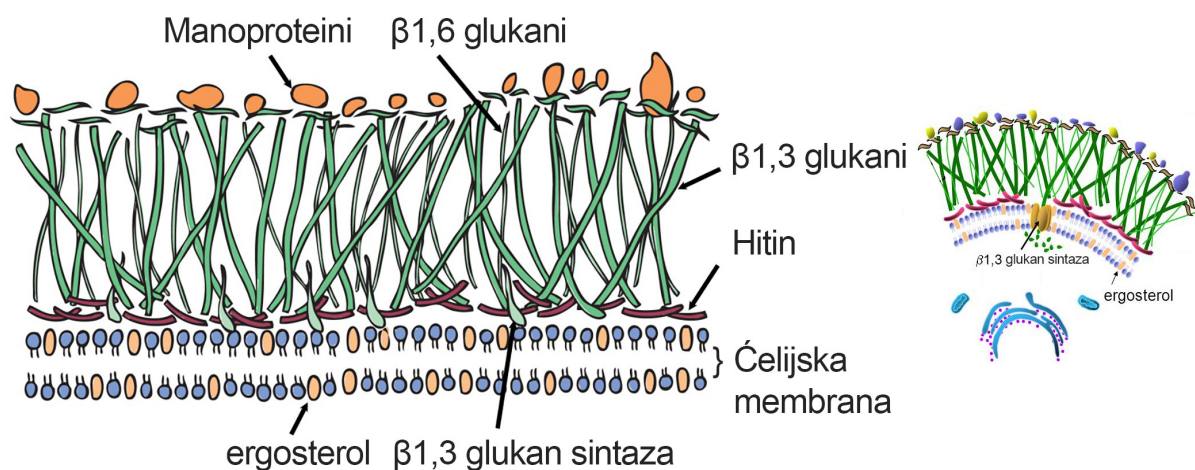
Poslednjih decenija, istraživanja prirodnih proizvoda kao izvora bioaktivnih jedinjenja, sve su prisutnija u oblasti medicine, obezbeđujući nove lekove i vodeće supstance (*engl.* lead compounds) sa terapijskim potencijalom (De Silva i sar., 2013; Pejin i sar., 2014; Pejin i Karaman, 2017). Identifikacija mnogih biološki aktivnih jedinjenja upravo je rezultat istraživanja lekovitih gljiva ali i drugih organizama, pretežno morskih.

Gljive predstavljaju najrazličitiju grupu organizama sa 3 do 5 miliona vrsta (Dai, 2010; Blackwell, 2011). Međutim, do sada je opisan samo mali deo (oko 100 000) svih vrsta gljiva, a još manje ih je istraživano u smislu iznalaženja farmakološki aktivnih metablita od medicinskog značaja. Naime, na tržištu postoje lekovi i fungicidi koji se uspešno koriste, a razvijeni su iz sekundarnih metabolita gljiva (De Silva i sar., 2013). Čak i neki snažni mikotoksini, kakvi su ergot alkaloidi, koriste se u lečenju neuroloških poremećaja (migrene i mentalni poremećaji kod starijih osoba) (Hyde, 2001; Liu, 2002; Mulac i sar., 2012; Young, 2013). Zajedničko za sve medicinski značajne gljive je njihovo imunostimulativno dejstvo, a većina gljiva deluje povoljno i na kardiovaskularni sistem (regulacija nivoa šećera, holesterola i krvnog pritiska).

Pored farmakološke, gljive imaju i visoku nutritivnu vrednost jer sadrže sve esencijalne aminokiseline, visok procenat minerala, vitamina, ugljenih hidrata i masnih kiselina.

2.2. Hemijski sastav gljiva

Gljive sadrže oko 90 % vode i 10 % suve materije (Sánchez, 2010) i nutritivno su veoma vredne (Dundar, 2008). Čelijski zid gljiva je izgrađen od β -D glukana, proteina i hitina (**Slika 1**). Pored toga, sadrže vitamine (tiamin, riboflavin, askorbinsku kiselinu, ergosterol i niacin) kao i obilje esencijalnih aminokiselina među kojima dominira lizin (Sánchez, 2017). Takođe, sadrže i proteine, masti, pepeo i glikozide, tokoferole, fenolna jedinjenja, flavonoide, karotenoide, folate, organske kiseline (Sánchez, 2004; Patel i Goyal, 2012). Ukupna energetska vrednost plodnog tela gljiva iznosi između 250 i 350 cal/kg svežih gljiva (Sánchez, 2010). Gljive se smatraju funkcionalnom hranom koje pored hranjive poseduju i zdravstvene vrednosti (Rathee i sar., 2012).



Slika 1. Građa ćelijskog zida gljiva
(<http://www.nammex.com/redefining-medicinal-mushrooms/>)

Ugljeni hidrati predstavljaju dominantnu komponentu plodnog tela gljiva. Glavni predstavnici monosaharida, oligosaharida i njihovih derivata su glukoza, manitol i α -trehaloza, navedenim redosledom. **Polisaharidi** su produkti primarnog metabolizma gljiva i predstavljaju osnovne komponente ćelijskog zida. Većina bioaktivnih polisaharida su β (1 \rightarrow 3) i (1 \rightarrow 6) glukani, ali je opisan širok spektar biološki aktivnih polisaharida drugačije strukture (Kozarski i sar., 2012). Razgranati lanci polisaharida sa okosnicom sastavljenom od α i/ili β vezanih glukozidnih jedinica mogu imati različite bočne lance (Kozarski i sar., 2012). Shodno tome, mogu biti heteropolisaharidi (Wasser i Weis, 1999), a ukoliko su za njih vezani proteini ili peptidi formiraju proteoglikane. Aktivnost polisaharida određena je njihovom konformacijom, sastavom i veličinom (Bohn i BeMiller, 1995). Rezervni polisaharid gljiva je glikogen (5 - 10 % s.m.) (Kalač, 2009).

Gljive produkuju različite **proteine**, ribonukleaze, ubikvitinu slični proteini, hemolizini, kao pektine i peptide koji ispoljavaju različite biološke aktivnosti uključujući antifungalnu, antiparazitsku, antiproliferativnu, antitumorsku, imunomodulatornu i ribozom-inaktivirajuću aktivnost (Xu, 2011; Erjavec i sar., 2012).

Fenoli su aromatična, hidroksilovana jedinjenja, koja imaju jedan ili više aromatičnih prstenova sa jednom ili više hidroksilnih grupa (Ferreira i sar., 2009). Ukupna efikasnost prirodnog fenolnog antioksidansa zavisi od njegove reaktivnosti u odnosu na različite ROS vrste. Konkretno, zavisi od učešća vodonikovih atoma koji uklanjaju slobodne radikale, stabilnosti prirodnog antioksidansa, kao i formiranih radikala tokom radikalnih reakcija (Ferreira i sar., 2009). Fenolna jedinjenja gljiva akumuliraju se kao krajnji produkti metaboličkog puta šikiminske kiseline i acetatnog puta i mogu da variraju od veoma jednostavnih molekula (fenolne kiseline, fenilpropanoidi, flavonoidi) do visoko polimerizovanih jedinjenja (melanin, tanini) (Ferreira i sar., 2009). Fenolna jedinjenja koja su detektovana u gljivama su uglavnom fenolne kiseline i flavonoidi. Međutim, ne može se sa sigurnošću tvrditi šta je od prisutnih fenolnih jedinjenja produkt metabolizma samih gljiva, a šta su usvojile iz supstrata kao produkte biljaka sa kojima su u zajednici (de Silva i sar., 2013; Gil-Ramírez i sar., 2016).

Gljive su izvor **organskih kiselina** (Valentão i sar., 2005; Ribeiro i sar., 2006) koje su produkti njihovog primarnog metabolizma. Priroda i koncentracija ovih jedinjenja su takođe važni faktori koji gljivama daju ukus (Valentão i sar., 2005; Ribeiro i sar., 2006). Kiseline imaju manju osetljivost na promenu tokom obrade i skladištenja od drugih komponenti kao što su pigmenti i jedinjenja ukusa (Cámara i sar., 1994). Najvažnije, organske kiseline (vinska, maleinska, limunska i ćilibarna kiselina) mogu imati zaštitnu ulogu protiv različitih bolesti usled njihove antioksidativne aktivnosti, helirajući metale ili delokalizujući elektronsko punjenje koje dolazi od slobodnih radikala (López-Bucio i sar., 2000; Seabra i sar., 2006).

Lipidi su važni sastojci Basidiomycota sa posebnom ulogom u rastu i razvoju organizma. Masne kiseline su osnovna komponenta lipidnog kompleksa (Olennikov i sar., 2014). Prethodne studije su pokazale da faktori sredine mogu uticati na sadržaj lipida i masnih kiselina u gljivama. Ekstremni uslovi rasta rezultiraju značajnim promenama u metabolizmu esencijalnih nutritivnih i rezervnih supstanci (Lösel, 1988; Olennikov i sar., 2014). Gljive sadrže sve glavne klase lipidnih jedinjenja uključujući slobodne masne kiseline, mono-, di- i trigliceride, sterole, sterol estre i fosfolipide (Mallavadhani i sar., 2006). Veći udeo masnih kiselina kod gljiva čine nezasićene masne kiseline, u čemu se ogleda njihov značaj kao zdrave hrane.

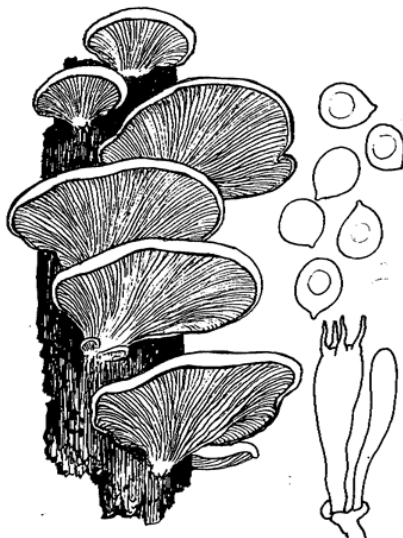
Zbog specifičnosti u fiziologiji, divlje rastuće saprobne i simbiotske gljive, mogu u značajnoj meri da akumuliraju metale i metaloide u svojim plodnim telima (Kalač, 2012).

Vrsta *Amanita strobiliformis* hiperakumulator je srebra (Ag) (Borovička i sar., 2006), što znači da ima sposobnost da akumulira jone ovog elementa u količinama čiji je bioakumulatorni koeficijent i do deset puta veći u odnosu na druge, slične vrste (Falandysz i sar., 2011). Gljive, jestive i nejestive, su relativno bogate mineralnim sastojcima i mogu preko lanaca ishrane da dospeju u organizam čoveka (Falandysz i Borovička, 2013). Biogeni elementi imaju značajnu ulogu u metabolizmu gljiva, čineći kofaktore i aktivatore enzima, kao i katalizatore različitih reakcija.

2.3. Ekologija gljiva

Prema ekološkom stanovištu gljive mogu biti saprotrofne, parazitske i mikorizne. Većina gljiva su saprotrofi pri čemu saprotrofi dobijaju hranljive sastojke iz mrtvog organskog materijala, a paraziti dobijaju hranu od živih životinja i biljaka, nanoseći štetu domaćinu. Mikorizne gljive su u simbiozi sa biljkama, uglavnom drvećem sa kojim imaju obostrano koristan odnos.

2.3.1. Lignikolne gljive



Lignikolnim gljivama pripadaju pojedini predstavnici razdela Ascomycota i Basidiomycota koji razgrađuju drvenu masu zbog materija koje su im neophodne za rast i razvoj (Radnović i sar., 2008). Naime, iz drvene mase crpe esencijalne elemente (ugljenik, azot, fosfor, kalijum, magnezijum, gvožđe, bakar i cink) za sopstveni metabolizam. U prirodi nastanjuju mrtvo ili živo drveće izazivajući pri tome njegovo truljenje, različita oboljenja i promenu mehaničkih karakteristika supstrata.

21. 贝形圆孢侧耳 *Pleurocybella porrigens*

Slika 2. Izgled konzolastog plodnog tela gljiva

(http://db.39kf.com/jjzj/Show_21.shtml)

Ukoliko su na živom drveću ponašaju se kao paraziti, dok na mrtvom drveću predstavljaju saprotrofe (Radnović i sar., 2008). Spora klija u početnu (inicijalnu) hifu, a energija potrebna za ovaj proces nalazi se u hranljivim materijama koje su smeštene u samoj spori. Ta inicijalna hifa se potom grana i nastale sekundarne hife rastu kroz parenhimatične ćelije biljnih tkiva koje su im glavni izvori skroba. U ovom stadijumu gljiva se hrani lako dostupnim skrobom i

ostalim materijama rastvorenim u biljnom soku: mineralima, vitaminima, belančevinama, prostim šećerima, organskim i neorganskim kiselinama (Radnović i sar., 2008). Osim sporama na veće udaljenosti rasprostiru se i specifičnim strukturama rizomorfama, posebnim zadebljanim končastim tvorevinama. Takođe, preko rizomorfa transportuju hranljive materije iz supstrata (zemljišta i drveta) do plodnog tela gljive. Na taj način dolaze u direktan kontakt sa zemljištem i korenjem biljaka.

Gljive koje razlažu lignin su prema tipu razgradnje supstrata podeljene u tri grupe: *Gljive bele truleži* - pripadaju razdelu Basidiomycota; najefikasniji su razlagači lignina sposobni da potpuno mineralizuju kako lignin tako i druge ugljenohidratne komponente drveta; u datom procesu drvo dobija svetliju boju od normalne: naime, usled oksidacije lignina, postaje porozno, vlažnije, mekše i belje.

Gljive mrke truleži - ove gljive razgrađuju celulozu i hemicelulozu, ali ne i lignin; time dovodi do nakupljanja lignina, delimične oksidacije i polimerizacije; ovako nastali lignin daje karakterističnu boju i konzistenciju (Schwarze, 2007; Karaman, 2009).

Gljive meke truleži - pripadaju razdelima Ascomycota i Deuteromycota; dovode do gubitka mehaničke otpornosti, čime drvo postaje spongiozno i vlažno; razlažu hemicelulozu i celulozu, dok neke vrste delimično razlažu i lignin, te su hemijski sličnije mrkim truležnicama (Schwarze, 2007; Karaman, 2009).

2.3.2. Terikolne gljive

Pod pojmom terikolne gljive podrazumevaju se sve one gljive koje rastu na zemljištu. Prema načinu ishrane mogu se podeliti na:

Terikolne saprotrofe - gljive koje razgrađuju mrtvu organsku materiju (uglavnom biljaka, ali i životinja i gljiva) omogućavajući na taj način kruženju materije i energije.

Terikolne simbiote - gljive koje obrazuju mutualističke zajednice sa korenjem viših biljaka, poznate kao mikorize.



Slika 3. Izgled pečurkastog plodnog tela gljiva

(https://etc.usf.edu/clipart/82200/82226/82226_hydnum_repan.htm)

Ova grupa gljiva obuhvata dve podgrupe: ektomikorizne i endomikorizne gljive. *Ektomikorizne gljive* se odlikuju formiranjem hifalnog omotača i tzv. Haritigove mreže (isključivo na površini korenja, većinom drvenastih biljaka). Ovu grupu čine uglavnom

predstavnicima razreda Basidiomycota i sreću se kao pečurke koje se mogu naći u šumskoj stelji (*Amanita*, *Boletus*, *Cortinarius*, *Hebeloma*) (Radnović i sar., 2008). *Endomikorizne gljive* obrazuju hife unutar korenovog sistema različitih zeljastih i drvenastih biljaka. Varijabilnije su u odnosu na ektomikorizne gljive, a u zavisnosti od načina na koji prodiru u biljne ćelije dele se na arbuskularne, erikoidne, arbutiodne, monotropoidne, ektendomikorizne i orhidne mikorize. Endomikorizne gljive obuhvataju predstavnike Basidomycota, Ascomycota, Zygomycota i Glomeromycota (Peterson i sar., 2004).

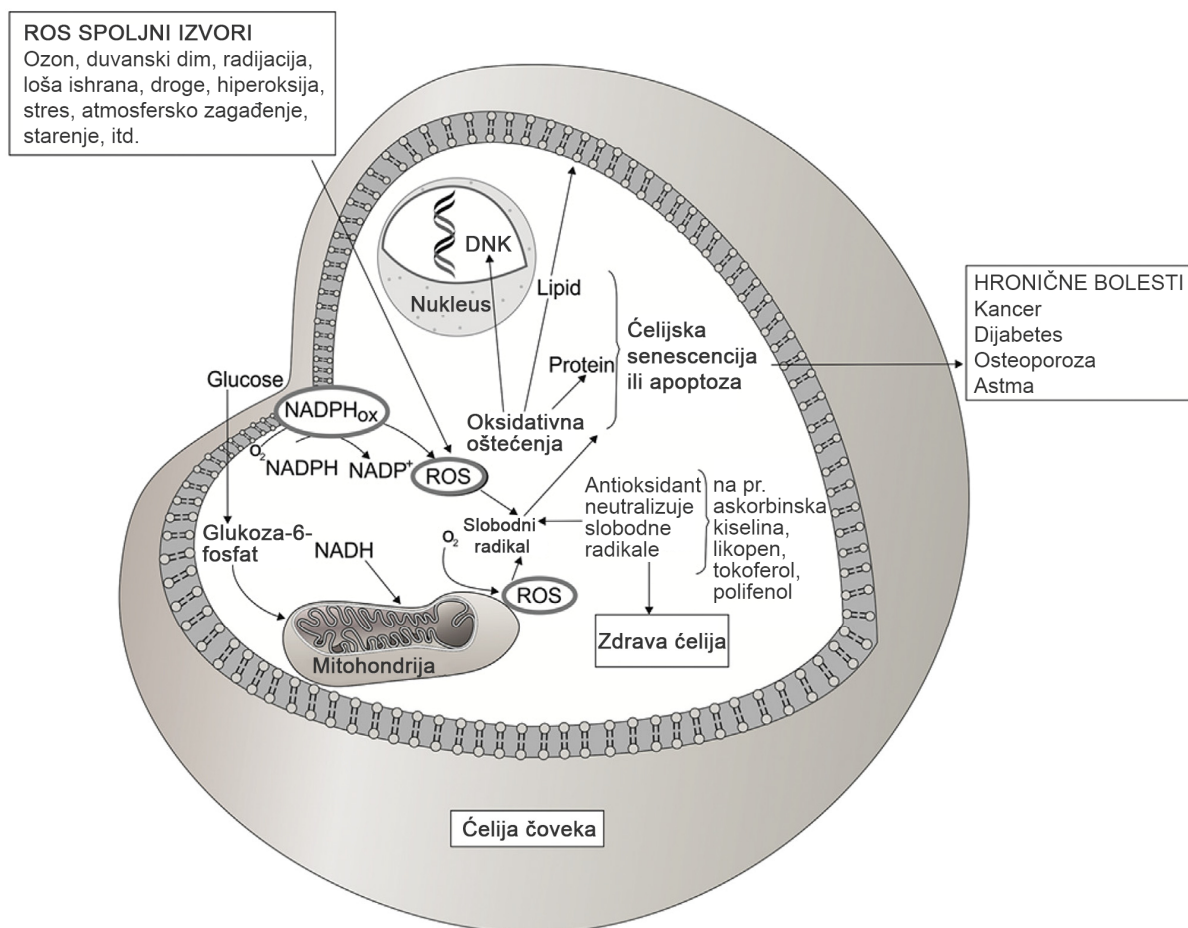
Terikolne gljive imaju višestruku ulogu u kopnenim ekosistemima s obzirom da uzrokuju promenu mobilnosti i dostupnosti esencijalnih i neesencijalnih elemenata kao što su azot, fosfor, sumpor, gvožđe, hrom, bakar i drugi. Time zapravo utiču na biogeohemijske i mikrobiološke aktivnosti u zemljištu, dok mikorizne vrste konkretno utiču na promenu biljne produktivnosti i mikrostaništa u korenskoj regiji biljaka, kao i na prenos vode (Gadd, 2007).

2.4. Antioksidativni stres i sistemi antioksidativne zaštite

Oštećenje ćelije uzrokovano slobodnim radikalima je glavni uzrok starenja i progresije bolesti kao što su Alchajmerova i Parkinsonova bolest, kao i drugih neurodegenerativnih bolesti (Chen i sar., 2012). Slobodni radikali su atomi ili molekuli koji sadrži jedan ili više nesoparenih elektrona u atomskoj ili molekulskoj orbitali (Halliwell, 1994). Molekul kiseonika je slobodni radikal (ima dva nesparena elektrona), koji dovodi do stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (Reactive Oxygen Species - ROS) koje mogu dovesti do oštećenja ćelija. Reaktivni molekuli poput superoksid anjona ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikala (OH^{\bullet}), hidroperoksil (HO_2^{\bullet}), azot oksida (NO^{\bullet}) i vodonik peroksida (H_2O_2) su slobodni radikali i neradikalni molekularni oblici. Oksidacija je proces koji telo koristi za normalnu proizvodnju energije i funkcionisanje imunog sistema. Ovo je deo procesa koji telu omogućava da transformiše hranjive sastojke kao što su ugljeni hidrati, masti i proteini u energiju. Tokom oksidacije, ROS se proizvode u normalnim uslovima u maloj količini, koja je neophodna za normalno funkcionisanje ćelije. Tada endogeni antioksidativni odbrambeni sistemi tela imaju kapacitet da spreče štetne posledice.

Međutim, ROS su veoma štetne po organizam pri visokim koncentracijama. Kada ROS prevazilaze odbrambene mehanizme ćelije, oni mogu da dovedu do oštećenja nukleinskih kiselina, oksidacije proteina i lipidne peroksidacije (**Slika 4**). ROS mogu nastati pod uticajem spoljašnjih negativnih faktora ili kao nus proizvodi tokom mitohondrijalnog transporta elektrona tokom aerobnog disanja ili oksidacije enzima kao i katalizovane oksidacije metala (Cederbaum i sar., 2009). S obzirom da su reaktivni, radikali "traže način" da upare svoj elektron, i stoga često „napadaju” hemijska jedinjenja u blizini. Ova hemijska jedinjenja mogu biti uključena u važne enzimske reakcije, mogu biti komponente ćelijskog zida ili deo

DNK molekula. Ako se njihova hemijska struktura promeni, njihova funkcija u ćeliji se gubi, a rezultat toga može biti starenje ili apoptoza ćelije (Cederbaum i sar., 2009). Oštećenje ćelija prouzrokovano slobodnim radikalima predstavlja uzrok starenja i degenerativnih bolesti, kao što su tumori, kardiovaskularne bolesti, katarakta, pad imunog sistema, oboljenja jetre, dijabetes - *diabetes mellitus*, neurodegenerativnih bolesti (Alchajmerova bolest i Miastenia gravis) i drugih (**Slika 4**) (Halliwell, 1994; Kozarski i sar., 2015).

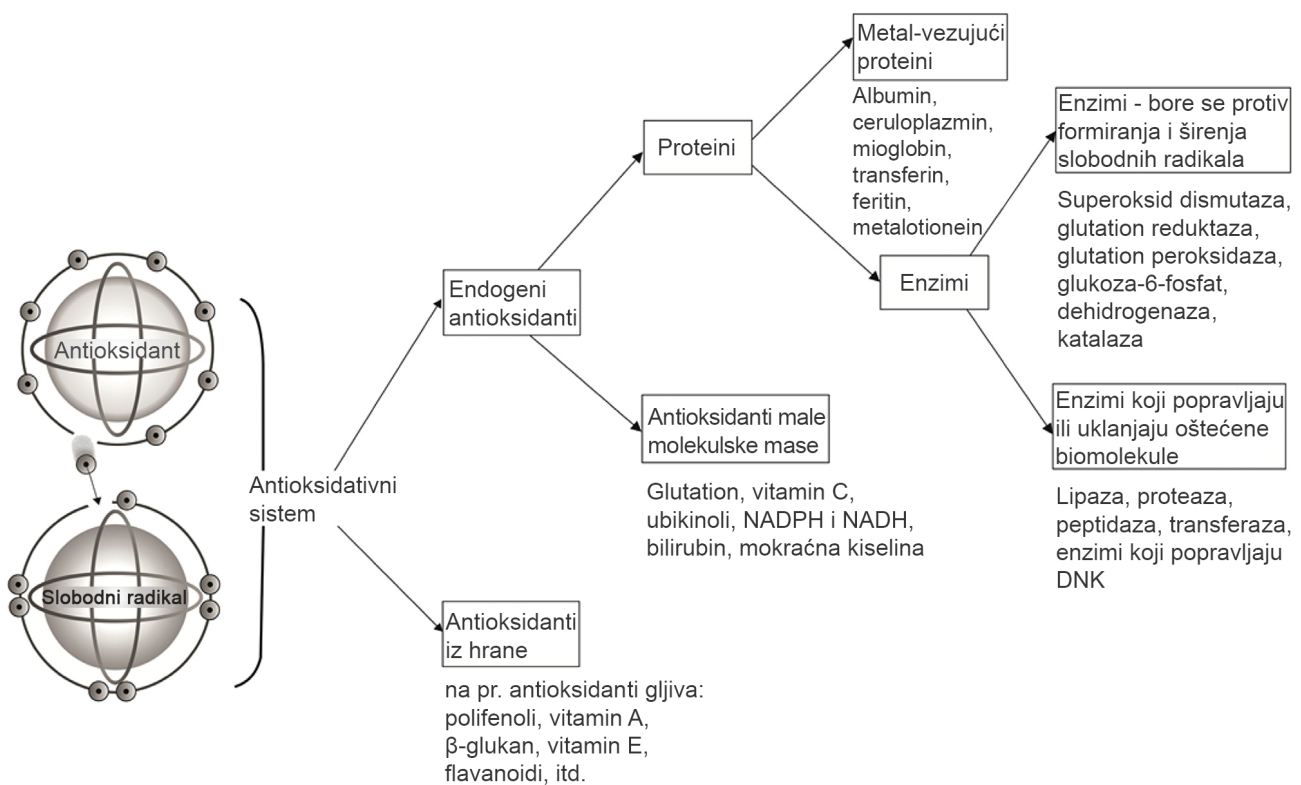


Slika 4. Endogeno i egzogeno generisanje slobodnih radikala
(modifikovano prema Sánchez, 2017)

Neutralizacija slobodnih radikala antioksidansima je značajna zaštita ćelija protiv uzroka oksidativnog stresa. Naime, antioksidansi su hemijska jedinjenja koja preveniraju, uklanjaju ili neutrališu slobodne radikale (Ferreira i sar., 2009). Ova jedinjenja mogu biti antioksidansi endogenog porekla, poput polifenola, vitamina A (karotenoidi), vitamina E (α -tokoferol), β -glukana i dr. Proteini i antioksidansi male molekulske mase, kao što je askorbinska kiselina (vitamin C) i glutation su endogeni antioksidansi (**Slika 5**).

Preventivna medicina kao i prehrambena industrija pokazuju sve veći interes za istraživanja prirodnih izvora antioksidanasa, jer najčešće korišćeni sintetički antioksidansi (BHA, BHT, PG) imaju ograničenu primenu u ishrani (Ferreira i sar., 2009). Ovo objašnjava brojna istraživanja antioksidativnih svojstava prirodnih proizvoda. Poslednjih decenija posebno su atraktivne gljive, kao izvor jedinjenja sa antioksidativnom aktivnošću.

Jedinjenja sa antioksidantnim aktivnostima se kod gljiva nalaze u plodnim telima, miceliji i tečnoj kulturi, a uključuju polisaharide, tokoferole, fenole, karotenoide, ergosterol i askorbinsku kiselinu (Ferreira i sar., 2009). Antioksidativna jedinjenja mogu biti izolovana iz gljiva kao funkcionalni aditivi ili putem konzumiranja gljiva uključeni u ishranu. Na taj način mogu predstavljati alternativni izvor hrane koji sprečava oštećenja prouzrokovana oksidacijom. Antioksidativna svojstva divlje rastućih gljiva intenzivno su proučavana (Ferreira i sar., 2009; Karaman i sar., 2010; Heleno i sar., 2010; Glumac i sar., 2016) i uglavnom su povezane sa sadržajem fenola.



Slika 5. Antioksidativni sistemi zaštite (modifikovano prema Sánchez, 2017)

2.5. Antimikrobna aktivnost gljiva

Već hiljadama godina sama priroda predstavlja najbolji izvor biološki aktivnih jedinjenja koja se zbog svoje primene u preventivnoj medicini mogu nazivati medicinskim jedinjenjima.

Poslednjih decenija postoji sve veći problem rezistencije bakterija na postojeće antibiotike. Odbrambeni mehanizmi bakterijskih i gljivičnih patogena prema antimikrobnim agensima su evoluirali, te danas postoji sve veća potreba da se otkriju novi i snažniji agensi kao zamena postojećoj uobičajenoj antibiotskoj terapiji (Alves i sar., 2012; Karaman i sar., 2014).

Makrogljive su bogati izvori biološki aktivnih jedinjenja sa veoma raznovrsnim hemijskim strukturama. Stoga, su gljive veoma korisne kao potencijalni izvori novih snažnih antimikrobnih agensa (Alves i sar., 2012). Postoje brojne studije o antimikrobnoj aktivnosti različitih tipova ekstrakata gljiva širom sveta (Sheena i sar., 2003; Hleba i sar., 2014), kao i kod nas (Karaman i sar., 2009a; Karaman i sar., 2012a; Karaman i sar., 2014; Novaković, 2015; Rašeta, 2016).

2.5.1. Antibakterijska aktivnost

Antibiotici su jedinjenja nastala kao proizvod metabolizma različitih mikroorganizama (uglavnom gljiva, ređe bakterija), koja sprečavaju rast drugih mikroorganizama ili ih potpuno uništavaju (Karaman, 2009). Antimikrobni lekovi se odlikuju selektivnom toksičnošću - deluju na mikroorganizam ali ne i na makroorganizam. Mehanizmi delovanja antibiotika uključuju: inhibiciju sinteze ćelijskog zida bakterija, inhibiciju funkcije citoplazmatske membrane, inhibiciju sinteze proteina, inhibiciju sinteze nukleinskih kiselina i inhibiciju metabolizma folata (Petrović i sar., 2007). Razvoj antibiotika predstavlja jedno od najznačajnijih naučnih dostignuća u poslednjih 70 godina. Ovi agensi deluju na nekoliko načina, uključuju se u metaboličke procese ili u strukturu samih mikroorganizama.

Istraživanje novih antimikrobnih supstanci efikasnih protiv patogenih mikroorganizama otpornih na postojeće lekove je od krucijalnog značaja za čovečanstvo. Smatra se da mnoge divlje rastuće gljive poseduju antimikrobno delovanje, te se sve više koriste kao predmet istraživanja antimikrobnog delovanja (Shen i sar., 2017). Različite vrste gljiva mogu pokazati različitu antibakterijsku aktivnost. Čak i vrste u okviru istog roda, pokazuju različitu aktivnost. Pored toga, ekstrakti gljiva dobijeni tokom ekstrakcije sa različitim rastvaračima, odnosno ekstrakcionim sredstvima takođe su ispoljili različitu antimikrobnu aktivnost (Shen i sar., 2017). Naime, gljive mogu biti izvor prirodnih antibiotika koji uključuju jedinjenja male i velike molekulske mase. Jedinjenja male molekulske mase

uglavnom čine sekundarni metaboliti kao što su seskviterpeni, terpenoidi, steroidi, antrahinonske i benzoeve kiseline, ali i primarni metaboliti kao što je oksalna kiselina. Jedinjenja velike molekulske mase čine proteini i peptidi (Alves i sar., 2013). Podaci iz literature ukazuju da izolovane komponente iz ekstrakata gljiva pokazuju bolju antimikrobnu aktivnost prema Gram-pozitivnim nego prema Gram-negativnim bakterijama. Potvrđeno je i da neki ekstrakti gljiva ispoljavaju antibakterijsku aktivnost, naprimer: MeOH ekstrakt vrste *Hydnum repandum* (Ozen i sar., 2011). U radu Zjawiony (2004) pokazano je da 75 % ispitivanih polipornih gljiva pokazuje snažnu antibakterijsku aktivnost.

2.5.2. Antifungalna aktivnost

Biološki aktivna jedinjenja su normalno prisutna u biljkama, gljivama i drugim prirodnim izvorima. Gljivama je neophodno prisustvo antibakterijskih i antifungalnih agenasa da bi opstale na svom prirodnom staništu. Stoga, antifungalna jedinjenja sa više ili manje snažnim efektom, mogu biti izolovana iz mnogih gljiva i korisna za ljude (Yamaç i Bilgili, 2006).

Patogene gljive izazivaju oboljenja kod ljudi, životinja, useva i drugih organizama. Gljivične infekcije mogu ozbiljno da ugroze zdravlje ljudi ili dovedu do ogromnih ekonomskih gubitaka kada su u pitanju usevi. Organizam ima urođenu sposobnost da se brani od patogena, proizvodnjom antifungalnih supstanci. Međutim, kod imunokompromitovanih osoba, ova sposobnost je smanjena, te su i gljivične infekcije agresivnije. Osim toga, gljivična oboljenja predstavljaju veliki problem u poljoprivredi, dovodeći do ozbiljnog smanjenja kvaliteta i prinosa useva što izaziva ogromne ekonomske posledice. Većina gljiva su saprotrofni organizmi što znači da se hrane mrtvim ili raspadajućim biljnim tkivom, a neke su razvile sposobnost da savladaju odbrambene mehanizme biljaka i hrane se živim biljnim tkivom. U organskoj poljoprivredi gljivična oboljenja predstavljaju veliki problem, jer određene gljive imaju zaštićene uspravane spore koje mogu da ostanu u zemlji i do 40 godina, te je njihovo suzbijanje otežano.

Istraživanja o antifungalnim jedinjenjima mogu obezbediti načine za rešavanje ovih problema (npr. uvođenjem gena koji kodiraju produkciju proteina koji bi pojačali njihovu rezistentnost na gljivične patogene) (Chu i sar., 2005; Wong i sar., 2010).

Do sada izolovana i opisana antifungalna jedinjenja poreklom iz gljiva uključuju jedinjenja velike (peptidi i proteini) i male (seskviterpeni, terpeni, steroidi, organske kiseline, hinolini) molekulske mase (Alves i sar., 2013).

U preglednom radu Alves i sar. (2013) dat je spisak od 52 vrste gljiva, lignikolnih i terikolnih (uglavnom jestivih) i njihovih antifungalnih supstanci. Dvadeset jedna vrsta su isključivo saprotrofi (razlažu uginulu organsku materiju), 16 vrsta su mikorizne (u simbiozi sa

korenom biljaka i drveća), 10 paraziti i 5 vrsta su saprotrofi ali mikorizne vrste.

Većina studija o antifungalnoj aktivnosti gljiva opisuje dejstvo njihovih ekstrakata bez identifikovanja jedinjenja odgovornih za datu aktivnost. U radu Öztürk i sar. (2011) opisana je aktivnost metanolnih ekstrakata tri vrste roda *Agaricus* prema patogenim sojevima *Candida albicans* i *Candida tropicalis*. Zatim, utvrđena je aktivnost metanolnog ekstrakta vrste *Ganoderma lucidum* prema *Trichoderma viride* (Heleno i sar., 2013).

Međutim, opisana su neka jedinjenja male i velike molekulske mase sa antifungalnom aktivnošću (Alves i sar., 2013). Triterpenska jedinjenja (npr. grifolin) se smatraju jedinjenjima sa najjačom antifungalnom aktivnošću (Rosa i sar., 2003). Tu su i druga jedinjenja male molekulske mase koja su ispoljila određenu antifungalnu aktivnost, kao što je seskviterpen refuslakton koji deluje protiv nekih fitopatogenih gljiva uključujući *Alternaria alternata*, *A. brassicae*, *Botritis cinerea* i *Fusarium graminearum*. Procenat inhibicije rasta *Alternaria alternata* koju je izazvalo ovo jedinjenje bio je veći od pozitivne kontrole (karbendazim). Drugi seskviterpeni, *enokipodini*, izolovani iz micelije vrste *Flammulina velutipes* ispoljili su nešto nizu aktivnost prema patogenoj vrsti *Aspergillus fumigatus* (Wang i sar., 2012). Fenolne kiseline, kao što su *p*-hidroksibenzoeva i cimetna kiselina, pokazale su aktivnost protiv različitih gljiva. Najveći broj vrsta čija je antifungalna aktivnosti ispitivana poreklom je iz Kine i Turske.

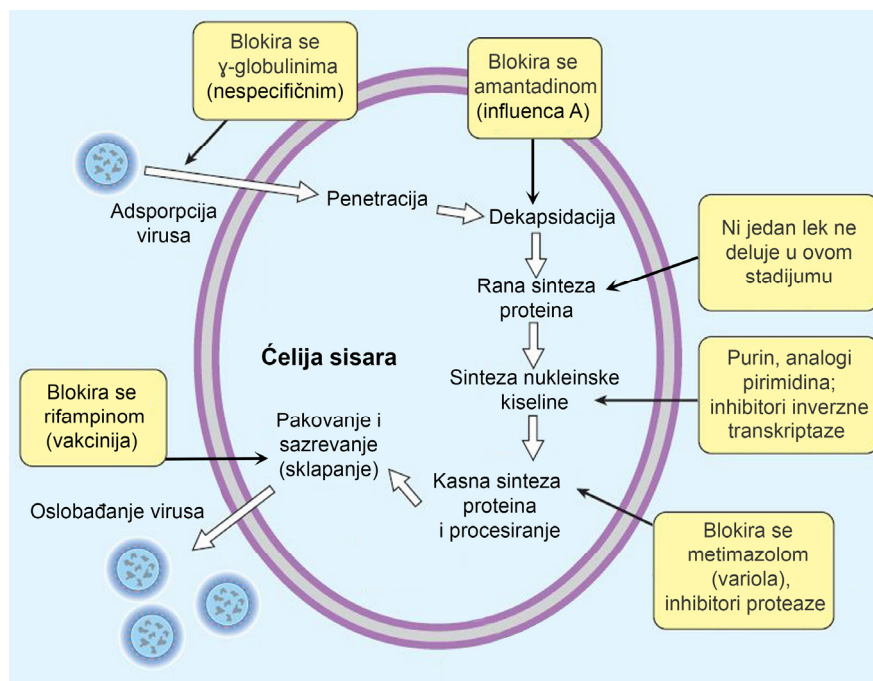
Stoga je stav naših istraživača mikologa koji se bave proučavanjem antimikrobnog delovanja gljiva da je neophodno započeti detaljna istraživanja autohtonih gljiva u cilju procene njihovog antifungalnog delovanja i pronalaženja novih prirodnih agenasa sa antifungalnim delovanjem.

2.5.3. Antivirusna aktivnost

Uprkos napretku moderne medicine, virusne infekcije i dalje dovode do smrti miliona ljudi širom sveta (Merican i sar., 2000; Kuiken i sar., 2003; Shepard i sar., 2005). Najveći problem u dizajniranju bezbednih i efikasnih antivirusnih lekova jeste činjenica da virusi koriste ćelije domaćina da se repliciraju kao i to da podtipovi virusa pokazuju značajnu varijabilnost i imaju izuzetno visoku stopu mutacije (Jones, 1998; De Clercq i Field, 2006). Naime, ovo otežava pronalaženje meta za lek koji bi ometao virus bez ugrožavanja ćelije organizma domaćina. Virusni imaju sposobnost da napadaju sve žive organizme uključujući biljke, životinje i čoveka.

Antivirusni lekovi su grupa lekova koji se koriste specifično za lečenje virusnih infekcija. Danas, oko 40 sintetičkih i semisintetičkih lekova (izvedeni od biljnih i bakterijskih metabolita) su klinički odobreni za lečenje virusnih infekcija (De Clercq i Field, 2006; DeChristopher i sar., 2012). Aktivni principi deluju neposredno inhibirajući virusne enzime,

sintezu virusnih nukleinskih kiselina ili samu adsorpciju virusa za ćeliju sisara (**Slika 6**) (De Silva i sar., 2013).



Slika 6. Mehanizmi delovanja antiviralnih agenasa

(<https://www.studyblue.com/notes/note/n/pharma-antifungal-and-antiviral-drugs/deck/14098182>)

Ovi direktni antivirusni efekti posebno su izloženi manjim molekulima. Indirektno antivirusni efekti su rezultat imunostimulativnih aktivnosti polisaharida ili drugih složenih molekula (Brandt i Piraino, 2000).

Međutim, u poslednjih nekoliko decenija mnogi prirodni proizvodi su priznati od strane farmaceutske industrije zbog velike strukturne raznolikosti, kao i različitih farmakoloških aktivnosti (Jones, 1998; De Clercq i Field, 2006). Iznad svega, metaboliti gljiva, posebno Basidiomyceta, su podstakli interesovanja istraživača. Istraživači širom sveta u potrazi su za novim antivirusnim agensima, uključujući derivate piridina. Mnoga antivirusna sredstva pokazuju strukturu koja je veoma slična nukleotidima uracilu, timinu i citozinu (Baumann i Baxendale, 2013) koji predstavljaju sintetski dobijene antiviralne agense.

Antivirusna aktivnost ekstrakata i jedinjenja izolovanih iz gljiva je opisana od strane mnogih autora (Sorimachi i sar., 2001; Lindequist i sar., 2005; Faccin i sar., 2007).

Triterpenoidi - *ganodermediol*, *lucidadiol* i *aplanoksidačna kiselina G* izolovani iz vrste *Ganoderma pfeifferi*, kao i drugih *Ganoderma* vrsta, poseduju *in vitro* antivirusnu aktivnost prema virusu influence tipa A. *Ganodermediol* je aktivan protiv herpes simplex virusa tip 1 (Mothana i sar., 2003). Novi *bis-seskviterpen - agrocibon* izolovan iz vrste *Agrocybe salicicola* je ispoljio antiviralnu aktivnost prema respiratornom sincicijalnom virusu (Zhu i sar., 2010).

Pored vrsta roda *Ganoderma*, kao potencijalni producenti antivirusnih agenasa prema virusu influence tipa A (kod ptica i ljudi) navode se vodeni ekstrakti micelije vrste *Daedaleopsis confragosa*, *Datronia mollis*, *Ischnoderma benzoinum*, *Laricifomes officinalis*, *Lenzites betulina*, *Trametes gibbosa* i *T. versicolor* (Kabanov i sar., 2011; Teplyakova i sar., 2012). Ekstrakt micelije vrste *T. versicolor* ispoljava jako antivirusno dejstvo protiv virusa influence tipa A (H1N1) i herpes simplex virusa (visok terapijski indeks 324,67) (Krupodorava i sar., 2014). Vodeni i etanolni ekstrakti, kao i polisaharidne frakcije vrste *Lentinula edodes* pokazali su antivirusnu aktivnost inhibirajući replikaciju poliovirusa (PV-1) i goveđeg herpes virusa (BoHV-1) (Rincão i sar., 2012). Nedavni napredak u istraživanjima je načinjen i u oblasti pronalaženja lekova prirodnog porekla protiv HIV virusa (Ng i sar., 1997; Ngai i Ng, 2003; Cassels i Asenico, 2011; DeCristopher i sar., 2012).

Iako lek za AIDS ne postoji, sa otkrićem novih lekova dolazi se do novih terapija kao i kombinovanih terapija koje su ohrabrujuće. Bioaktivna jedinjenja izolovana iz gljiva deluju kao inhibitori reverzne transkriptaze (virusna DNK polimeraza, enzim koji je neophodan retrovirusu da bi se reprodukovao) i na taj način sprečavaju umnožavanje HIV virusa (Ravichandran i sar., 2008). Ekstrakt vrste *Russula paludosa* je pokazao antivirusnu aktivnost inhibirajući HIV-1 RT (97,6 %). Peptid izolovan iz ekstrakta pomenute vrste, ispoljio je jaku inhibitornu aktivnost prema HIV-1 RT (Wang i sar., 2007). Umerenu aktivnost inhibicije HIV-1 proteaze su pokazala tri jedinjenja izolovana iz plodnog tela vrste *Cordyceps militaris* - *adenozin*, *dimeti-guanozin* i *izosinensetin* (Jiang i sar., 2011). Ngai i Ng (2003) su opisali aktivnost *lentinana* izolovanog iz vrste *Lentinula edodes*, protiv HIV virusa. Glikoprotein izolovan iz plodnog tela vrste *Pleurotus ostreatus* (bukovača) takođe pokazuje anti HIV aktivnost (Wang i Ng, 2000).

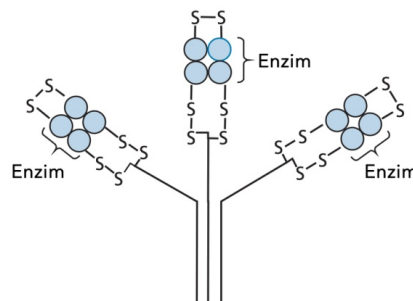
Ekstrakt vrste *Agaricus brasiliensis* blokira citopatogeni efekat koji se javlja usled infekcije Western Equine Encephalitis virusom (WEE). Fenolna jedinjenja izolovana iz plodnog tela vrste *Inontus hispidus* inhibiraju replikaciju virusa influence tipa A i B (Awadh i sar., 2003). Kiseli protein vezani, polisaharidno-proteinski kompleks (PLS), izolovan iz *Ganoderma lucidum* je pokazao antivirusnu aktivnost protiv Herpes simplex virus tip 1 i 2 u Vero ćelijama (Eo i sar., 2000). Antivirusna dejstva PLS iz pečuraka se mogu pripisati inhibiciji virusne replikacije ili indirektno od strane njihovih imunostimulativnih aktivnost (Liu i sar., 2004; Lindekuist i sar., 2005). Sve navedene bioaktivnosti su određene u *in vitro* uslovima, te su neophodna dalja istraživanja da bi se razvio lek iz ovih gljiva. Najnovija istraživanja ukazuju na derivate piridina kao veoma potentne antivirusne agense.

2.6. Inhibicija enzima acetilholinesteraze i Alchajmerova bolest

Alchajmerova bolest (AB) predstavlja vodeći uzrok demencije na svetu. To je progresivno neurodegenerativno oboljenje koje dovodi do poremećaja pamćenja i ponašanja kod starije populacije (Ingkaninan i sar., 2003; Karmakar i sar., 2014).

Etiologija AB slabo je poznata. Najstarija hipoteza povezuje njen uzrok sa smanjenom sintezom neurotransmitera acetilholina (ACh), noradrenalina i serotonina u mozgu (Bryne, 1998). Smanjen nivo ACh u mozgu je najznačajnija biohemijska promena kod pacijenata sa AB (Syad, 2012). Glavne patološke promene kod obolelih od AB čine senilni plakovi. To su ovalne mikroskopske lezije u vanćelijskom prostoru mozga sa centralnim proteinskim jezgrom koga čini β -amiloidni protein ($A\beta$), koji dovodi do direktnog oštećenja neurona (Jovanović, 2012). Ovaj peptid nastaje cepanjem amiloidnog prekursorskog proteina (APP) enzimima β -sekretaza i γ -sekretaza. Inhibitori β i γ sekretaza mogli bi imati značajnu ulogu u lečenju AB. Ranije je bilo prisutno mišljenje da $A\beta$ ne nastaje u normalnim ćelijama, međutim novija istraživanja pokazala su da je on proizvod metabolizma, ali da se razgrađuje i otklanja iz ćelija. Poremećaj ravnoteže između sinteze i uklanjanja $A\beta$ je u osnovi neurodegeneracije kod AB (Jovanović, 2012). Pored toga, dokazano je da kod AB postoji poremećaj regulacije metala, a posebno redoks-aktivnih, prelaznih metala. Naime, u mozgu obolelih povećane su koncentracije cinka, gvožđa i bakra (Connor i sar., 2001; Bonda i sar., 2011). Smatra se da je važan uslov za agregaciju $A\beta$ i prisustvo prelaznih metala (Smaili i sar., 2009).

Nedostatak ACh koji se razlaže u neaktivne metabolite holin i acetat, direktno je povezan sa enzimima acetilholinesterazne (AChE) aktivnosti. U normalnim fiziološkim uslovima AChE pretvara ACh u neaktivne metabolite, holin i acetat. Ukoliko bi se dati neurotransmiter akumulirao (delovanjem nekih toksičnih supstanci, kao što su nervni agensi na bazi organofosfata) došlo bi do kontinuirane stimulacije mišića, žlezda i centralnog nervnog sistema (CNS).

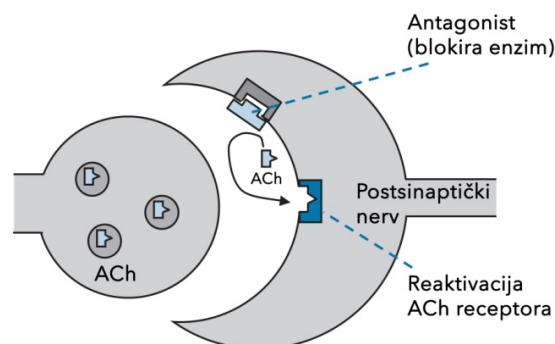


Slika 7. Enzim acetilholinesteraza (modifikovano iz Patric, 2005)

Enzim AChE ima neobičnu formu (**Slika 7**) (Patric, 2005). Zapravo, to je membranski proteinski kompleks izgrađen od četiri subjedinice, od kojih svaka ima svoje aktivno mesto.

Drugim rečima, svaki molekul ima ukupno dvanaest aktivnih mesta. Ovi molekuli se nalaze u neposrednoj blizini ACh receptora i bukvalno su u stanju da zgrabe molekul ACh. Veruje se da AChE spada među najefikasnije enzime poznate do sada - za hidrolizu ACh potrebno je svega 100 μ s. Inhibitori acetilholinesteraza tj. jedinjenja koji inhibiraju AChE, ne zaustavljaju proces AB, već privremeno ublažavaju pojedine simptome bolesti prvenstveno utičući na sinaptičku aktivnost. To za posledicu ima poboljšanje kognitivnih sposobnosti (**Slika 8**). Ako se ACh ne razgradi, u stanju je da reaktivira holinerški receptor. Stoga se može reći da se efekat inhibitora AChE svodi na povećanje nivoa ACh. Naime, inhibitori datog enzima imaju praktično isti biološki efekat kao agonisti holinerškog receptora.

Prema selektivnosti inhibitori acetilholinesteraze dele se na AChE i butirilholinesteraza (BuChE), a prema mehanizmu delovanja na: *reverzibilne* (na primer, takrin ili donepezil) koji su od aktivnog centra enzima odvojeni fiziološkim ligandima ili drugim holin estrima; *pseudoireverzibilne* (na primer, fizostigmin ili rivastigmin) koji se čvršće vezuju za enzim od fiziološkog liganda; *ireverzibilne* (na primer, organofosfati) koji imaju letalan efekat: inhibirani enzim može biti zamenjen samo novim AChE, u procesu biosinteze (Patric, 2005).



Slika 8. Efekat AChE inhibitora (modifikovano iz Patric, 2005)

Budući da skoro svi lekovi koji predstavljaju AChEi (galantamin, takrin, donepezil i rivastigmin) imaju ograničenu efikasnost i brojne nuspojave, postoji realna potreba za novim AB terapeutima. U carstvu gljiva, *Flammulina velutipes*, *Lentinus edodes* i mnoge *Pleurotus* vrste ispoljile su sposobnost da spreče ili uspore progresiju neurodegenerativnih bolesti (Filho i sar., 2006). Među supstancama sa acetilholinesteraznom aktivnošću, samo manji broj njih mogu se koristiti kao vodeće strukture (od engl. *lead structure*) za razvoj novih lekova. Naime, širok spektar organizama (morske životinje, biljke, gljive, lišajevi, mikroorganizmi, itd.) proučavan je u kontekstu potencijalnih izvora novih supstanci sa datom aktivnošću (Pejin i sar., 2012; Pejin i sar, 2014). U najvećem broju slučajeva radi se o sekundarnim metabolitima sa niskom molekulskom masom koji se uglavnom sintetišu od ugljenih hidrata,

aminokiselina i lipida, tj. na bazi nekog od učesnika (intermedijera) primarnog metabolizma. Ova organska jedinjenja uglavnom su specifična za određenu vrstu ili rod, te često imaju hemotaksonomski značaj. Smatra se da igraju važnu ulogu u borbi organizama za opstanak (hemijska ekologija) i adaptaciji na promene životnih uslova. Obično se grupišu prema svom poreklu i biosintezi (Brigida i sar., 2013). Glavne grupe prirodnih organskih jedinjenja sa acetilholinesteraznom aktivnošću su: alkaloidi, kumarini, flavonoidi, hinoni, stilbeni, terpeni i ksantoni (Pejin i sar., 2014).

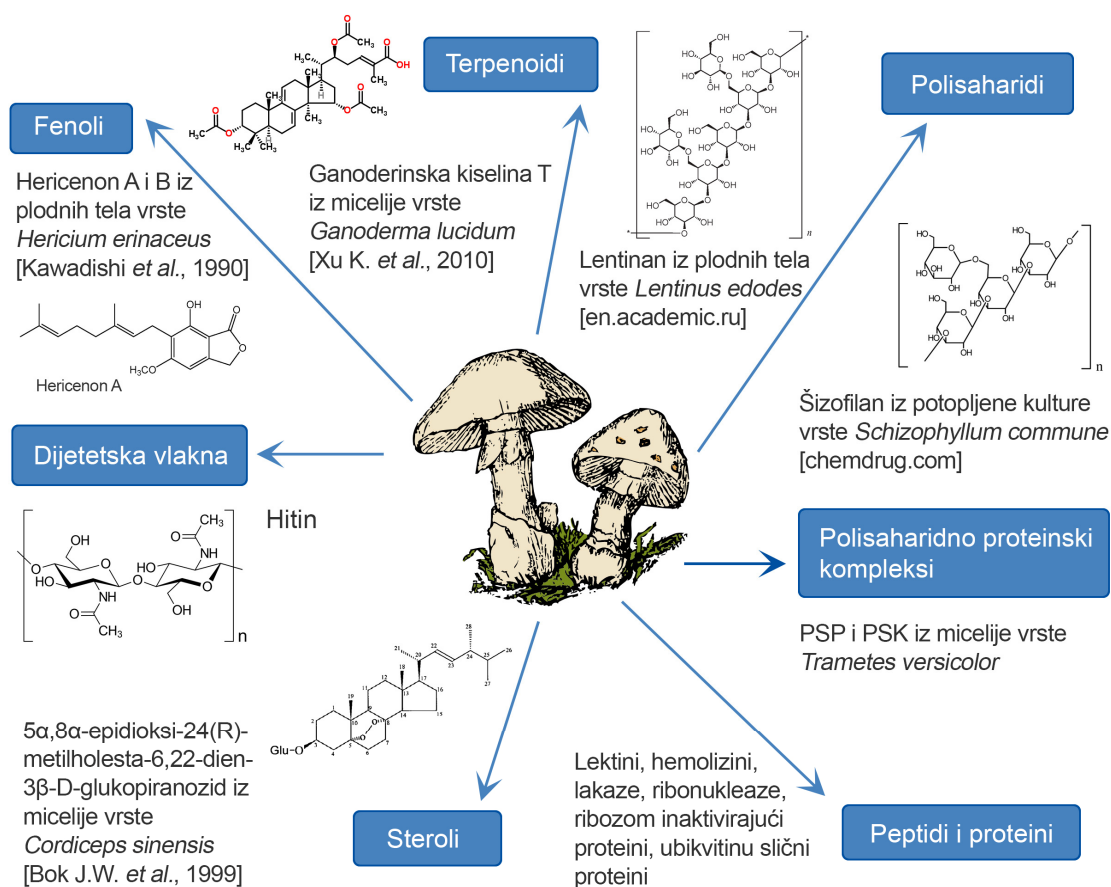
U poslednjih nekoliko godina ispitivanja prirodnih izvora sa potencijalnom aktivnošću inhibicije AChE (Pejin i sar., 2012; Pejin i sar., 2014) su postala intenzivnija. Do sada je opisano nekoliko vrsta gljiva koje ispoljavaju pomenutu aktivnost i to su uglavnom ekstrakti plodnih tela, micelija i filtrata potopljenih kultura vrsta roda *Agaricus* (Öztürk, 2011), *Pleurotus pulmonarius* (Nguyen i sar., 2016), *Trametes versicolor* (Orhan i Üstun, 2011), *Polyporus pinicola*, *Polyporus sulphureus* (Orhan i Üstun, 2011), kao i različite vrste roda *Ganoderma* (Hasant i sar., 2013).

2.7. Antitumorska aktivnost gljiva

Antitumorska aktivnost makrogljiva veoma se intenzivno proučava u današnje vreme. Jedna od najpoznatijih grupa jedinjenja koje sadrže gljive, sa farmaceutskim efektima, a u tom smislu posebno antikancerogenim i imunomodulatornim aktivnostima, jesu polisaharidi (Wasser, 2002; Moradali i sar., 2007; Zhang i sar., 2007). Polisaharidi i polisaharidno-proteinski kompleksi sadržani u gljivama zavređuju naučnu pažnju istraživača jer poseduju sposobnost inhibicije rasta tumora, odnosno povećavaju sposobnost organizma da se odbrani sopstvenim mehanizmima. Osim toga, ovi biomakromolekuli imaju sposobnost da preveniraju nastajanje i metastaze tumora (Guterres i sar., 2005; Lee i sar., 2005). Mehanizam antikancerogenog delovanja polisaharida još uvek nije u potpunosti razjašnjen, ali je poznato da su u stanju da aktiviraju imuni sistem. Zapravo, oni stimulišu hematopoetske matične ćelije, limfocite, makrofage, T-limfocite, DC i NK ćelije, da sintetišu citokine (uključujući interleukine, interferone i imunoglobuline) koji imaju antiproliferativno dejstvo i indukuju apoptozu i diferencijaciju ćelija tumora (Wasser, 2002; Moradali i sar., 2007). Sedamdesetih i osamdesetih godina prošlog veka je izolovano nekoliko polisaharida antikancerogenog delovanja, kao što su: lentinan (*Lentinula edodes*), šizofilan (*Schizophyllum commune*) i polisaharidno-proteinski kompleksi (PSP, PSK - *Trametes versicolor*) koji su veoma popularni u zemljama Dalekog Istoka (Mizuno i sar., 1995; Ooi i Liu, 2000). U širokoj upotrebi, kao dodaci ishrani koji pomažu u terapiji kancera, su i glukani izolovani iz sledećih

vrsta: *Grifola frondosa*, *Sparassis cispra*, *Agaricus balzei* i *Phellinus linteus* (Hilszczańska, 2012).

Pored pomenutih jedinjenja, naročito polisaharidno-proteinskih kompleksa, i mnoge druge grupe jedinjenja kao što su proteini (Xu i sar., 2011), masne kiseline (Lam i sar., 2016), steroli (Ng, 2004), terpenoidi (Ngai i Ng, 2003; Harhaji i sar., 2008), glikozidi i fenolna jedinjenja (Yip i sar., 2006; Bemani i sar., 2012; Rao i sar., 2012; Sung i sar., 2016) (Slika 9), mogu da inhibiraju proliferaciju različitih ćelijskih linija kancera bilo putem zaustavljanja ćelijskog ciklusa ili indukovanjem apoptoze i nekroze (Lau i sar., 2004; Harhaji i sar., 2008).



Slika 9. Antitumorska jedinjenja izolovana iz gljiva

(<https://i0.wp.com/globalmedicaldiscovery.com/Anticancer-substances-of-mushroom-origin.jpg>)

Upotreba gljiva sa potencijalnim terapijskim svojstvima predstavlja veliki interes kako naučne tako i zdravstvene zajednice i to iz dva osnovna razloga: prvo, gljive pokazuju efikasnost protiv brojnih bolesti i metaboličkih poremećaja, među kojima su rak i degenerativna oboljenja; drugo, bioaktivni metaboliti gljiva se mogu dobiti iz različitih izvora kao što su: plodna tela divlje rastućih ili gajenih gljiva, biomase micelije ili medijuma potopljenih kultura (kultivisanih pomoću bioreaktora) (Poucheret i sar., 2006).

2.8. Analizirane vrste gljiva

2.8.1. *Bjerkandera adusta* Karst (1880)

Narodni naziv: poličasta/zadimljena bjerkandera

Carstvo: Fung

Razdeo: Basidiomycota

Klasa: Agaricomycetes

Red: Polyporales

Familija: Meruliaceae

Rod: *Bjerkandera*

Vrsta: ***Bjerkandera adusta***



Slika 10. *B. adusta* (Willd.) P. Karst.

([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2009-11-11_Bjerkandera_adusta_\(Willd.\)_P._Karst_64486.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2009-11-11_Bjerkandera_adusta_(Willd.)_P._Karst_64486.jpg))

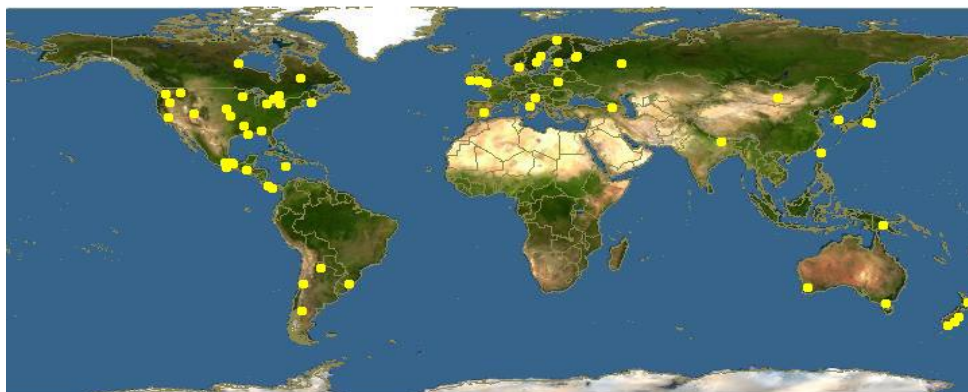
Plodno telo: do 6 cm širine, oblika terase, široko naslonjeno na supstrat, uvek ih je mnogo zajedno. Gornja površina je somotasta, u nijansama braon do sivo-crne boje, najčešće nije zonirana. Donja, himenijumska površina je siva i po pravilu sivo obrubljena, sa sitnim porama (5-7 na 1 mm).

Spore: eliptične, glatke, hijaline, 4-6 x 2,5-3,5 μm . Bazidijumi nose 4 spore.

Ekologija: široko rasprostranjena vrsta, sreće se na mrtvom drvetu najrazličitijih vrsta, najčešće listopadnog drveća, izaziva bele truleži.

Jestivost: nejestiva gljiva, zbog svoje konzistencije.

Rasprostranjenost: široko rasprostranjena vrsta, zabeležena je u Severnoj i Južnoj Americi, Evropi, Aziji, Australiji i na Novom Zelandu.



Slika 11. Mapa rasprostranjenja vrste *B. adusta*

(<http://www.discoverlife.org/mp/Bjerkandera+adusta>)

2.8.2. *Pleurocybella porrigens* (Pers.) Singer 1947

Narodni naziv : anđeosko krilo

Carstvo: **Fungi**

Podcarstvo: **Dikarya**

Razdeo: **Basidiomycota**

Klasa: **Agaricomycetes**

Red: **Agaricales**

Familija: **Marasmiaceae**

Rod: ***Pleurocybella***

Vrsta: ***Pleurocybella porrigens***



Slika 12. *P. porrigens* (Pers.) Singer 1947
(<http://www.planetdeadly.com/nature/poisonous-mushrooms>)

Morfologija: izgledom podseća na bukovaču, ali je mnogo sitnija; kada je sveža, svetle je boje; plodonosno telo je malo, široko oko 1,5-2,5 cm, ponekad do 4 cm; sa donje strane uočavaju se karakteristični beli listi.

Jestivost: do nedavno, smatrana je jestivom vrstom; u poslednje vreme, međutim, zabeleženi su slučajevi trovanja u Aziji; kako njena toksičnost još uvek nije dovoljno izučena, trebalo bi je smatrati nejestivom, odnosno potencijalno toksičnom

Ekologija: saprotrof; raste od avgusta do novembra; u grupama, na trulim panjevima i deblima četinara, uzrokujući belu trulež.

Rasprostranjenost: u šumama umerenog pojasa severne hemisfere; zabeležena je u Evropi, Severnoj Americi i Japanu.



Slika 13. Mapa rasprostranjenja vrste *P. porrigens*
(<http://www.discoverlife.org/mp/Pleurocybella+porrigens>)

2.8.3. *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. (1800)

Narodni naziv: dlakava poličica

Carstvo: Fungi

Razdeo: Basidiomycota

Klasa: Agaricomycetes

Red: Russulales

Familija: Stereaceae

Rod: *Stereum*

Vrsta: *Stereum hirsutum*



Slika 14. *S. hirsutum* (Willd.) Pers. (1800)
(<http://www.first-nature.com/fungi/stereum-hirsutum.php>)

Plodno telo: meso debljine 5-3 cm, tvrdo i krhko, pljosnata, valovitog oboda boja varira od žute, žuto-braon, tamno žute do tamno braon.

Spore: cilindričnog ili elipričnog oblika, 5-8/2-3.5 μm .

Ekologija: saprotrof; raste na trulom drveću u jesenjim mesecima, smatra se bolešću drveta.

Jestivost: nejestiva.

Rasprostranjenost: široko rasprostranjena vrsta, zabeležen je u Severnoj i Južnoj Americi, Evropi, Aziji, Australiji, na Novom Zelandu.



Slika 15. Mapa rasprostranjenje vrste *S. hirsutum*
(<http://www.discoverlife.org/mp/Stereum+hirsutum>)

2.8.4. *Stereum subtomentosum* Pouzar 1964

Narodni naziv: zelenkasta poličica

Carstvo: Fungi

Razdeo: Basidiomycota

Klasa: Agaricomycetes

Red: Russulales

Familija: Stereaceae

Rod: *Stereum*Vrsta: ***Stereum subtomentosum***

Slika 16. *S. subtomentosum* Pouzar 1964
([http://www.pilz-pilz.de/index.php?=Stereum subtomentosum](http://www.pilz-pilz.de/index.php?=Stereum+subtomentosum))

Plodno telo: lepezastog oblika, širine do 7 a dužine do 5 cm; sterilna površina je somotasta, zonirana, mirnih boja, uglavnom u nijansama oker i braon; himenijumska površina joj je glatka, žuta do sivožuta, uvek svetlije ivice.

Spore: izduženo eliptične, glatke, hijaline, amiloidne, 5,5-7 x 2-3 μm .

Jestivost: nejestiva.

Ekologija: saprotrof; raste tokom cele godine, u grupama, na mrtvom drvetu listopadnih vrsta, najčešće bukvi i brestu, uzrokujući belu trulež.

Rasprostranjenost: zabeležen je u Evropi, Severnoj Americi i Aziji.



Slika 17. Mapa rasprostranjenje vrste *S. subtomentosum*
(<http://www.discoverlife.org/mp/Stereum+subtomentosum>)

2.8.5. *Trametes versicolor* (L.) Lloyd 1921

Narodni naziv: ćuranov rep, šarena tvrdokoška

Carstvo: Fungi

Razdeo: Basidiomycota

Klasa: Agaricomycetes

Red: Poriales

Familija: Poriaceae

Rod: *Trametes*

Vrsta: ***Trametes versicolor***



Slika 18. *T. versicolor* (L.) Lloyd

1921

(<http://www.panoramio.com/photo/78747326>)

Plodno telo: meso je debljine od 1-3 mm, kožaste površine, gornja površina ima koncentrične oblasti različitih boja, tamnobraon do crne.

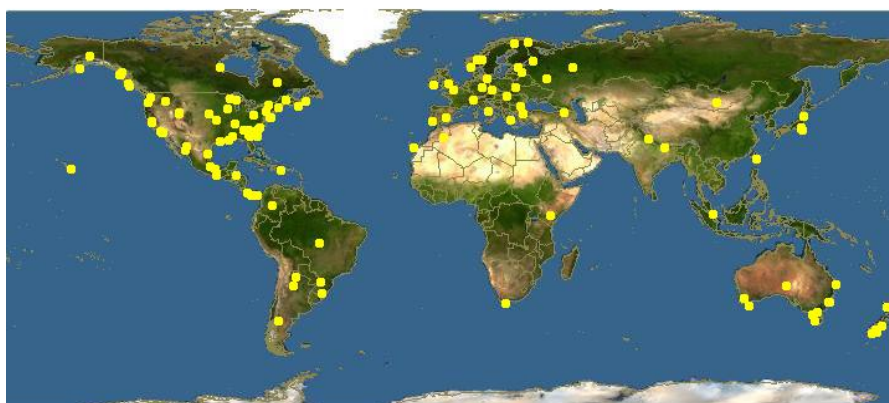
Spore: cilindrične, 5-6/1.5-2 µm.

Jestivost: nejestiva vrsta zbog svoje konzistencije.

Ekologija: saprotrof; raste obično na mrtvom, oštećenom i bolesnom drvetu, na površini ili u unutrašnjosti četinara i listopadnog drveća, izaziva belu trulež.

Vreme rasta: tokom letnjih i jesenjih meseci.

Rasprostranjenost: naseljava znatan deo svetskih šuma: konkretno, nađena je kako u Evropi, tako i u Americi i Aziji (Narodna Republika Kina).



Slika 19. Mapa rasprostranjenja vrste *T. versicolor*

(<http://www.discoverlife.org/mp/Trametes+versicolor>)

2.8.6. *Amanita strobiliformis* (Paulet ex Vittad.) Bertill. 1866

Narodni naziv: usamljena muhara, debela muhara

Carstvo: Fungi

Razdeo: Basidiomycota

Klasa: Agaricomycetes

Red: Agaricales

Familija: Amanitaceae

Rod: Amanita

Vrsta: ***Amanita strobiliformis***



Slika 20. *A. strobiliformis* (Paulet ex Vittad.) Bertill.

1866

(<http://wikigrib.ru/muxomor-shishkovidnyj/>)

Plodno telo: klobuk belo-sive boje, u početku polukuglast, kasnije mesnat, širok 5-20 cm, drščica bela, valjkasta, puna, prekrivena ljuspama, u donjem delu zadebljala dok se u gornjem delu nalazi venčić koji kasnije nestaje. Meso je mekano, debelo, bez izraženog mirisa i ukusa.

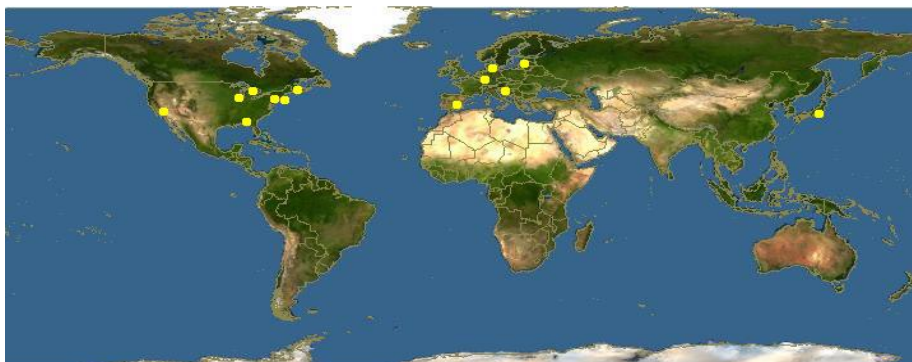
Spore: eliptične i glatke.

Jestivost: u nekim izvorima se navodi kao jestiva, međutim postoji bojazan da sadrži psihoaktivne hemijske komponente tipa iboteične kiseline i muscimola koje se javljaju u vrstama kao što su *Amanita muscaria* i *Amanita pantherina*; u savremenim priručnicima preporučuje se izbegavanje sakupljanja ove vrste, zbog moguće lake zamene sa otrovnim belim vrstama ovog roda.

Ekologija: retko raste pojedinačno, ređe u skupinama u šumama, uz rubove šuma i uz šumske puteve.

Vreme rasta: javlja se tokom jeseni.

Rasprostranjenost: zabeležena je na području Evrope i Severne Amerike.



Slika 21. Mapa rasprostranjenja vrste *A. strobiliformis*

(<http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Amanita+strobiliformis>)

2.8.7. *Hydnum repandum* L. 1753

Narodni naziv: ježevica, bela ježevka, prosenjak

Carstvo: Fungi

Razdeo: Basidiomycota

Klasa: Agaricomycetes

Red: Cantharellales

Familija: Hydnaceae

Rod: *Hydnum*

Vrsta: *Hydnum repandum*



Slika 22. *H. repandum* L. 1753

(http://www.wikiwand.com/en/Hydnum_repandum)

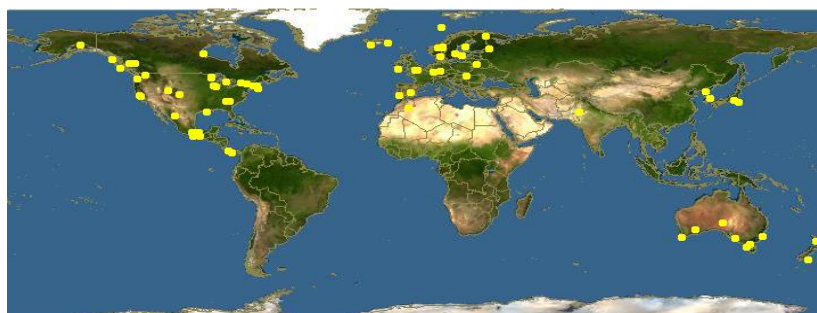
Plodno telo: meso bele boje, belkasto – žute, pa sve do narandžaste i okercrvenkaste, na preseku žuto – narandžasto, čvrsto, i debelo, pod jačim pritiskom lako puca. Kod mladih primeraka rub klobuka je podvrnut prema zemlji, a kod starijih najčešće valovit, bez posebnog mirisa, mladi primerci se odlikuju blagim ukusom dok se kod starijih zapaža gorko – ljut ukus.

Spore: elipsoidnog oblika; 6.5-9/5.5-7µm

Jestivost: jestiva je dok je mlada; kasnije je gorkog ukusa, premda joj se gorčina može redukovati skidanjem bodljica; zabeleženo je da sadrži i bioaktivnu komponentu repandiol, koja deluje citotoksično na različite tumorske ćelije; predstavlja jednu od najčešće korišćenih divljih, jestivih vrsta, koja se često može naći u slobodnoj prodaji; zbog vrlo često prekomernog sakupljanja, našla se na Crvenoj listi gljiva Holandije, Belgije i Nemačke.

Ekologija: formira mikorizu sa listopadnim i četinarskim drvećem; raste tokom leta i jeseni, pojedinačno ili ređe u manjim grupama, ponekad obrazujući vilina kola, uz rubove šuma i šumske puteve.

Rasprostranjenost: široko rasprostranjena vrsta, u šumama umerenog pojasa severne hemisfere; zabeležena na teritoriji Evrope, Severne Amerike, Azije, Australije i Novog Zelanda.



Slika 23. Mapa rasprostranjenja vrste *H. repandum*

(<http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Hydnum+repandum>)

3. CILJ RADA

Gljive predstavljaju potencijalni izvor novih farmaceutskih proizvoda, koji je još uvek u velikoj meri neiskorišćen zbog nedovoljne proučenosti njihovih bioloških i hemijskih principa. Na osnovu mnogobrojnih literaturnih podataka potvrđeno je da su gljive dragocen izvor prirodnih jedinjenja čija se biološka aktivnost danas sve više primenjuje kako u vidu nutraceutika i farmaceutika, tako i u poljoprivredi, u biokontroli različitih fitopatogena.

Shodno usmerenosti naučne javnosti ka iznalaženju alternativnih izvora prirodnih antioksidanasa, nekonvencionalnih i neškodljivih po ljudsko zdravlje i okolinu, zatim novih agenasa u borbi protiv humanih patogena i fitopatogena, kao i neuroprotektivnih i citotoksičnih agenasa, opšti cilj ove disertacije bio je ispitivanje hemijskog sastava autohtonih makrogljiva čiji ekstrakti ispoljavaju antiradikalnu, antioksidativnu, antimikrobnu, anti-acetilholinesteraznu i antiproliferativnu aktivnost, kao i pronalaženje novih agenasa poreklom iz njih. Specifičnih ciljevi bili su sledeći:

- ❖ Sakupljanje i determinacija autohtonih lignikolnih vrsta gljiva (*Bjerkandera adusta*, *Pleurocybella porrigens*, *Stereum hirsutum*, *Stereum subtomentosum* i *Trametes versicolor*) i terikolnih vrsta gljiva (*Amanita strobiliformis* i *Hydnum repandum*), sa različitih lokaliteta sa područja Srbije (Fruška gora, Tara, Vršački breg);
- ❖ Priprema "sirovih" ekstrakata ("čvrsti", "neprečišćeni") plodnih tela gljiva, koristeći rastvarače različite polarnosti (H₂O, 80 % EtOH, 70 % MeOH).
- ❖ Dopuna kolekcije kultura gljiva FUNGICULT Katedre za mikrobiologiju (prof dr Maja Karaman), kao i mikološke zbirke u okviru herbarijuma Departmana za biologiju i ekologiju (BUNS Herbarijum), Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu;
- ❖ Hemijska karakterizacija ekstrakata gljiva utvrđivanjem hemijskog sastava i ukupnog sadržaja polisaharida, fenolnih jedinjenja, proteina, organskih i masnih kiselina i biogenih elemenata;
- ❖ Ispitivanje antiradikalne aktivnosti *in vitro* prema radikalima OH[•], O₂^{•-}, NO[•], Asc[•], DPPH[•] i ABTS^{•+};
- ❖ Ispitivanje antioksidativne aktivnosti spektrofotometrijskim redukcionim testom (FRAP) i polarografskom metodom (HPMC);
- ❖ Ispitivanje antimikrobne aktivnosti - antibakterijske, antifungalne i antiviralne prema atestiranim sojevima (ATCC) bakterija, kvasaca i virusa kao i humanim izolatima (vaginalnog porekla) i fitopatogenim izolatima plesni poreklom sa poljoprivrednih

kultura: belog luka, soje i pirinča (dr Maja Ignjatov, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad);

- ❖ Ispitivanje uticaja ekstrakata na inhibiciju enzima acetilholinesteraze (AChE), radi otkrivanja novih potencijalnih izvori neuroprotektivnih agenasa poreklom iz gljiva koji bi mogli biti upotrebljeni za lečenje neurodegenerativnih bolesti, npr. Alchajmerove bolesti;
- ❖ Ispitivanje citotoksičnog delovanja ekstrakata na HepG2 humane hepatoma ćelije radi iznalaženja alternativnih izvora antikancerogenih agenasa poreklom iz gljiva;
- ❖ Utvrđivanje sličnosti odnosno razlika u ispoljenim biološkim aktivnostima između autohtonih lignikolnih i terikolnih vrsta, kao i u okviru jedne vrste poreklom sa dva različita lokaliteta (model organizam *H. repandum* poreklom sa Tare i Vršačkog brega) radi razumevanja uticaja sredinskih i genetičkih faktora na ispoljavanje dobijenih bioloških aktivnosti i biohemijskog sastava vrsta.

Dobijeni rezultati biće značajna smernica za dalja ispitivanja analiziranih vrsta gljiva *in vivo*, kao i ispitivanje mogućih mehanizama delovanja određenih grupa jedinjenja ili njihov sinergizam u okviru ispoljenih aktivnosti.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

4.1. Biološki materijal

Sakupljeno je i okarakterisano 5 lignikolnih i 2 terikolne vrste gljiva (**Tabela 1**). Svež biološki materijal (plodna tela gljiva) determinisan je na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Vrste su identifikovane klasičnim postupcima taksonomske analize prema standardnim mikološkim makroskopskim i mikroskopskim karakteristikama (izgled plodnog tela, presek himenofora, karakteristike spora). Vaučer primerici su deponovani u okviru mikološke zbirke herbarijuma Departmana za biologiju i ekologiju (BUNS Herbarijum), Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu i zavedeni u nizu pod brojevima od 12 - 00706 do 12 - 00713.

Tabela 1. Pregled ispitivanih vrsta gljiva, lokaliteta i vaučer vrsta

Vrsta	Familija	Lokalitet	Godina	Broj vaučer vrste
<i>Bjerkandera adusta</i> (Willd.) P. Karst 1879	Meruliaceae	Iriški venac Fruška gora	2014	12 - 00708
<i>Pleurocybella porrigens</i> (Pers.) Singer 1947	Marasmiaceae	Mitrovac Tara	2015	12 - 00712
<i>Stereum hirsutum</i> (Willd.) Pers. 1800	Stereaceae	Papratski do Fruška gora	2014	12 - 00711
<i>Stereum subtomentosum</i> Pouzar 1964	Stereaceae	Papratski do Fruška gora	2014	12 - 00707
<i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd 1921	Poriaceae	Iriški venac Fruška gora	2014	12 - 00706
<i>Amanita strobiliformis</i> (Paulet ex Vittad.) Bertill. 1866	Amanitaceae	Liparija Fruška gora	2014	12 - 00709
<i>Hydnum repandum I</i> L. 1753	Hydnaceae	Mitrovac Tara	2015	12 - 00710
<i>Hydnum repandum II</i> L. 1753	Hydnaceae	Vršački breg Vršac	2016	12 - 00713

Nakon determinacije plodna tela su očišćena i zamrznuta na temperaturi od - 18 °C, zatim su liofilizovana na - 80 °C (Alpha 2-4 LDplus, Christ GmbH, Švajcarska), a potom samlevana (IKA A11 basic, Nemačka) do finog praha i čuvana na sobnoj temperaturi u tamnim bocama sa šlifovanim čepom do dalje upotrebe.

4.2. Priprema ekstrakata

4.2.1. Vodeni, etanolni i metanolni ekstrakti

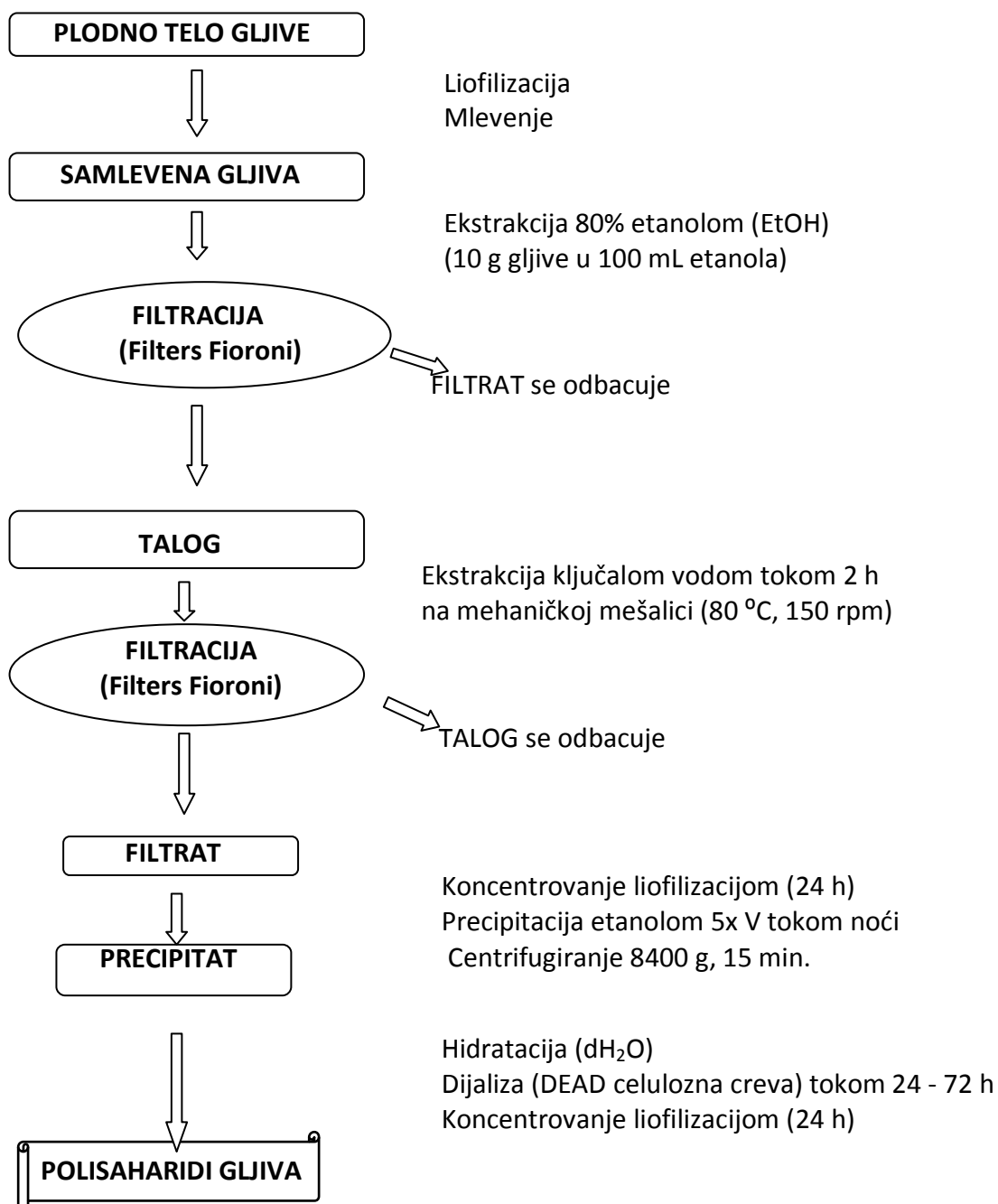
Za pripremu alkoholnih ekstrakata odmereno je 5 g liofilizovane gljive i ekstrahovano sa 100 mL 80 % etanola (Zorka Pharma, Srbija) odnosno 70 % metanola (Sigma Aldrich, USA) i mešano na mehaničkoj mešalici pri brzini od 120 rpm (New Brunswick Scientific, Edison, N.Y., SAD), na sobnoj temperaturi tokom 72 h.

Za pripremu vodenih ekstrakata odmereno je 5 g liofilizovane gljive i preliveno sa 100 mL ključale vode i mešano na mehaničkoj mešalici pri brzini od 120 rpm na sobnoj temperaturi, tokom 24 h. Nakon toga uzorci su profiltrirani (Filters FIORONI, Francuska) pomoću vakuum pumpe (Büchi V-700 Vacuum Pump, Švajcarska), a nakon toga alkoholni su upareni (Büchi R-210, Švajcarska), dok su vodeni liofilizovani do postizanja suve mase (s.m.). Rastvaranjem suvog ostatka dobijeni su ekstrakti određene koncentracije (tzv. štok ekstrakti) rastvoreni u DMSO-u ili rastvaraču u kome su i ekstrahovani, i čuvani u zamrzivaču (- 20 °C) do daljih analiza.

Za analiziranje antioksidativne i antiproliferativne aktivnosti ekstrakata suvi ostatak je rastvoren u 100 % DMSO-u (Baker Analyzed Reagent, JT Baker, Norveška), dok su za analizu antimikrobne aktivnosti ekstrakti rastvoreni u 5 % DMSO-u. Za ispitivanje acetilholinesterazne aktivnosti suvi ostatak rastvoren je ponovo u rastvaraču koji je služio kao ekstrakciono sredstvo (metanolni ekstrakti su rastvoreni u metanolu, etanolni u etanolu i vodeni u vodi).

4.2.2. Polisaharidni ekstrakti

Polisaharidi iz plodnih tela gljiva ekstrahovani su metodom (**Slika 24**) koja je modifikovana prema Ren i sar. (2014), radi dobijanja polisaharidnih (PSH) ekstrakata.



Slika 24. Ekstrakcija polisaharida iz plodnog tela gljiva

4.3. Određivanje antiradikalske aktivnosti

Antiradikalska aktivnosti analiziranih vrsta gljiva utvrđena je na osnovu sposobnosti njihovih ekstrakata da neutrališu sledeće slobodne radikale: OH^\bullet , O_2^- , NO^\bullet , Asc^\bullet , DPPH^\bullet i $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

4.3.1. Anti-OH radikalska aktivnost

Neutralizacija hidroksil radikala (OH^\bullet) koji se generiše Fentonovom reakcijom:



određuje se praćenjem reakcije degradacije deoksiriboze metodom prema Halliwell i sar. (1987). Naime, nastali OH^\bullet , u aerobnoj sredini, oduzima H-atom 2-deoksiriboze, gradeći malondialdehid (MDA) koji potom reaguje sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA). Ova promena rezultuje stvaranjem obojenog kompleksa, a prati se spektrofotometrijski na 532 nm. Napravljene su početne koncentracije ekstrakata u opsegu od 0,0125 do 25 mg/mL, od kojih su napravljena razblaženja tako da su se radne koncentracije kretale u opsegu od 0,020 do 49,98 $\mu\text{g/mL}$. Standardni antioksidans pirogolol (PG), korišćen kao pozitivna kontrola, testiran je u rasponu koncentracija od 8,625 do 138 $\mu\text{g/mL}$. Potencijal neutralizacije OH^\bullet (*engl.* Radical Scavenging Capacity - $\text{RSC}_{\text{OH}^\bullet}$) ispitivanih ekstrakata izračunat je na osnovu sledeće formule:

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

Na osnovu dobijenih RSC vrednosti određene su IC_{50} vrednosti, koje predstavljaju koncentraciju ekstrakta pri kojoj je neutralisano 50 % radikala. Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri ponavljanja, odnosno tri određene $\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ ($\mu\text{g/mL}$).

4.3.2. Anti- O_2^- radikalska aktivnost

Antiradikalska aktivnost O_2^- ispitivanih ekstrakata određena je merenjem njihove sposobnosti da neutrališu ove radikale, nastale tokom aerobne redukcije NBT-a pomoću NADH u prisustvu fenazinmetilsulfata (PMS) (Nishikimi, 1972).

Testirane početne koncentracije ekstrakata kretale su se u opsegu od 0,0125 do 20 mg/mL. Od početnih koncentracija napravljena je serija razblaženja, te su se radne koncentracije kretale u opsegu od 0,08 do 132,45 $\mu\text{g/mL}$. Standardni antioksidans PG korišćen je u rasponu koncentracija kao i u prethodno opisanom testu. Potencijal neutralizacije $\text{RSC}_{\text{O}_2^-}$ izračunat je prema formuli iz odeljka 4.3.1., a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri dobijene IC_{50} vrednost $\pm \text{SD}$ ($\mu\text{g/mL}$).

4.3.3. Anti-NO radikalska aktivnost

NO radikal, nastao iz natrijum-nitroprusida (SNP) u vodenom rastvoru pri fiziološkom pH, reaguje sa kiseonikom dajući nitritne jone. Koncentracija nitritnih jona određena je Griess-ovim reagensom prema metodi koju su opisali Green i sar. (1982).

4.3.4. Anti-askorbil radikalska (Asc) aktivnost

Elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPR) je spektroskopska metoda koja se zasniva na izlaganju elektrona dejstvu elektromagnetnog zračenja gde je moguće u molekulu sa nesparenim elektronom indukovati prelaze između elektronskih spinskih energetskih nivoa (Weil i Bolton, 2007).

Analiza vodenih ekstrakata urađena je na EPR spektrometru marke Bruker Elexsys II EPR koji radi u X-oblasti. Snimljen je Asc radikal stvoren u klasičnoj Fenton-ovoj reakciji u prisustvu askorbata, pri sledećim parametrima: centar polja (H) 3506,6 G, širina polja (SW) 40 G, modulaciona amplituda (MA) 2 G, snaga mikrotalasa (P) 10,02 mW i amplituda reflektovanih talasa 100 kHz. Rezultati su dobijeni na osnovu izmerene sposobnosti ekstrakta da neutrališu nastali Asc[•] a izraženi su u %.

4.3.5. Anti-DPPH radikalska aktivnost

Kapacitet hvatanja DPPH radikala (radical scavenging capacity - RSC) je određen metodom prema Espin i sar. (2000) koja se bazira na transformaciji ljubičasto obojenog stabilnog kompleksa DPPH u redukovanu formu DPPH-H žute boje.

4.3.6. Anti-ABTS radikalska aktivnost

Test za određivanje antiradikalske aktivnosti (izražene u troloks ekvivalentima) određen je metodom prema Arnao i sar. (2001). Naime, oksidans ABTS^{•+} generiše se u reakciji oksidacije 2,2'-azinonbis (3-etilbenzotiazolin- 6-sulfonske kiseline) (ABTS²⁻) amonijum-persulfatom.

4.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost analiziranih vrsta gljiva određena je na osnovu sposobnosti ekstrakata da redukuju feri-jone (Fe³⁺) u fero-jone (Fe²⁺) i na osnovu nedavno razvijene, polarografske HPMC metode.

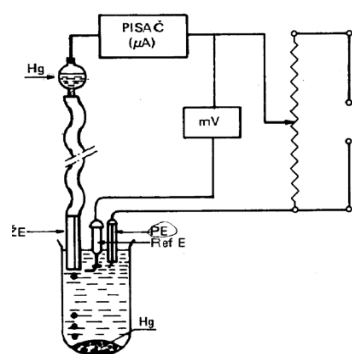
4.4.1. Redukciona sposobnost određena FRAP testom

FRAP metoda (Ferric Reducing Antioxidant Power Assay) (Benzie i Strain, 1999) primenjena je za određivanje redukcionne sposobnosti ekstrakata gljiva.

Ova spektrofotometrijska metoda zasnovana je na reakciji redukcije Fe^{3+} u Fe^{2+} . Nastali Fe^{2+} sa prisutnim ligandom grade plavo obojeni kompleks Fe^{2+} -TPTZ (gvožđe-tripiridiltriazin). Hemijska reakcija između Fe^{3+} (TPTZ) i fenolnih jedinjenja kao donora elektrona praćena je spektrofotometrijski na 593 nm.

4.4.2. Redukciona sposobnost određena polarografskom HPMC metodom

Polarografska metoda HPMC (*engl.* HydroxoPerhydroxoMercury(II) Complex) za merenje AO aktivnosti, zasnovana na klasičnoj polarografiji sa kapajućom živinom (Hg) elektrodom, razvijena je u Elektrohemijskoj laboratoriji, Instituta za opštu i fizičku hemiju u Beogradu (Sužnjević i sar., 2011). U oblasti potencijala anodnog rastvaranja žive u prisustvu OH^- i HOO^- (perhidroksidnog) jona umesto karakterističnog polarografskog talasa javlja se strujni pik. Obzirom da u alkalnim uslovima dolazi do nastanka perhidroksidnog jona, pretpostavljeno je nastajanje mešovitog hidroksoperhidroksoživa(II) kompleksa ($[\text{Hg}(\text{O}_2\text{H})(\text{OH})]$) koje je uzrok nastanka pomenute struje.



Slika 25. Šema polarografskog uređaja

(KŽE - kapajuća živina elektroda; PE - pomoćna elektroda; Ref E - referentna elektroda (Sužnjević *et al.*, 2011))

U prisustvu antioksidansa dolazi do smanjenja anodne struje građenja ovog mešovitog kompleksa žive. Osetljivost ove anodne struje na prisustvo antioksidanasa iskorišćena je u smislu razvoja jednostavne, brze i reproduktivne metode za određivanje antioksidativne aktivnosti koja ne zahteva upotrebu skupih reagenasa, radikalskih vrsta koje ne postoje u prirodi, kratkoživećih kiseoničnih radikala itd. Prisustvo individualnih fenolnih jedinjenja, ili kompleksnih uzoraka sa odgovarajućom AO aktivnošću, izaziva smanjenje anodne granične struje proporcionalno aktivnosti ispitivanih uzoraka. Veća aktivnost uzorka izaziva i veće smanjenje struje. Procedura je veoma jednostavna a merenja su brza (Sužnjević i sar., 2011).

Merenja su obavljena na polarografskom uređaju „PAR” (*engl.* Princeton Applied Research) 174 A (**Slika 25**). Radi automatskog beleženje polarografskih *i*-E krivih, za osnovni uređaj priključen je X-Y pisač (Houston Instruments, Omnigraph 2000). Sistem elektrolitičke ćelije sastoji se od tri elektrode: 1) kapajuće živine elektrode (KŽE) kao radne elektrode sa $m = 2,5 \text{ mg/s}$ (masa žive istekla iz kapilare u 1 s) i V (Hg rezervoara) = 75 cm, 2) zasićene kalomelske elektrode (ZKE) kao referentne elektrode i 3) platinskog (Pt) lima kao pomoćne elektrode. Korišćena je polarografska ćelija zapremine 30 mL. Vreme kapanja od 1 s (τ) KŽE programirano je pomoću instrumenta. Polarizujući napon odlikovao se brzinom promene od 10 mV/s, a početni potencijal iznosio je 0,1 V prema ZKE. Promena potencijala polarizacije usmerena je ka negativnijim vrednostima. Pomoću filter elementa na poziciji 3 s suzbijana je kapacitivna komponenta struje *i*-E signala. Pri tome je strujna osetljivost iznosila 20 μA (pun otklon skale od 250 mm). Kroz rastvor u ćeliji propuštena je struja čistog azota u trajanju od 30 s radi uklanjanja prisutnog kiseonika. Tokom snimanja održavana je inertna atmosfera (struja azota iznad rastvora). Rastvor je, nakon dodavanja uzorka, homogenizovan mešanjem azota tokom 20 s. Sam postupak merenja podrazumevao je sledeće: po 100 μL uzoraka dodavano je u alikvotima u 20 mL rastvora koji se sastojao od 5mM peroksida i Clark Lubs pufera (pH 9,8). Najpre su snimane *i*-E krive polaznog rastvora peroksida, a zatim nakon svakog dodatog alikvota, koji su u zapremini od 100 μL uzorka, izazivali ravnomerno smanjenja struje peroksida. Mereni su intenzitet (visina) granične struje osnovnog anodnog pika peroksida (i_{l0}) i visine pikova dobijenih nakon svakog dodatka uzorka (i_{lr}). Nakon toga izračunato je smanjenje struje nakon svakog dodatka. Procenat smanjenja početne struje vodonik peroksida izračunato je prema sledećoj jednačini:

$$HPMC (\%) = \left(1 - \frac{i_{lr}}{i_{l0}}\right) \times 100$$

Na osnovu procenta smanjenja granične struje u zavisnosti od zapremine, odnosno mase dodatog ekstrakta, konstruisan je grafikon zavisnosti, a nagib pravolinijskog dela te krive, predstavlja aktivnost uzorka.

4.5. Određivanje antimikrobne aktivnosti

4.5.1. Analizirani sojevi mikroorganizama

Za određivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakata korišćeno je ukupno trinaest bakterijskih izolata uključujući pet Gram-pozitivnih i osam Gram-negativnih sojeva (**Tabela 2**). Antibakterijski skrining urađen je prema referentnim sojevima koji su dobijeni iz kolekcije kultura Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. Svi bakterijski sojevi čuvaju se u hranljivom bujonu sa 20 % glicera na - 80 °C do dalje upotrebe.

Tabela 2. Ispitivani sojevi mikroorganizama

	Mikroorganizam	Oznaka	Poreklo/domaćin
	Bakterijski sojevi		
Gr +	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	referentni soj
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433	referentni soj
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	referentni soj
	<i>Staphylococcus aureus</i> I		humani izolat
	<i>Staphylococcus aureus</i> II		humani izolat
Gr -	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11229	referentni soj
	<i>Escherichia coli</i> I		humani izolat
	<i>Escherichia coli</i> II		humani izolat
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 35554	referentni soj
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> I		humani izolat
	<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	referentni soj
	<i>Proteus mirabilis</i>		humani izolat
	<i>Proteus vulgaris</i>		humani izolat
	Virus		
	λ fag	vB_BbrS_LK3	<i>Bordatella bronchiseptica</i> ATCC 10580
	Kvasci		
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	referentni soj
	<i>Candida albicans</i> I		humani izolat
	<i>Candida albicans</i> II		humani izolat
	Plesni		
	<i>Fusarium proliferatum</i>	BL1	beli luk
	<i>Fusarium verticillioides</i>	BL4	beli luk
	<i>Fusarium proliferatum</i>	BL5	beli luk
	<i>Fusarium graminearum</i>	S1	soja
	<i>Alternaria padwickii</i>	ALT	pirinač

Takođe, analizirana je aktivnost i prema sedam kliničkih izolata koji su dobijeni sa Medicinskog fakulteta, Kliničkog Centra Vojvodine, Departmana za akušerstvo i ginekologiju,

(ili iz EuroLaba) izolovanih pri redovnom ginekološkom pregledu kod žena. Njihova upotreba odobrena je od strane Etičkog Odbora Medicinskog fakulteta.

Za antifungalni esej korišćena su tri izolata kvasnice *Candida albicans*, uključujući dva soja vaginalnog porekla od pacijenata volontera sa Instituta za javno zdravlje Vojvodine u saradnji sa prof. dr Mirjanom Bogavac i privatnom laboratorijom EuroLab iz Novog Sada i jedan referentni soj (ATCC 10231) dobijen iz Laboratorije za mikrobiologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu.

Analizirane fitopatogene gljive izolovane su sa nekoliko biljnih domaćina (beli luk, soja i pirinač) sa oglednih polja Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu (kolekcija kultura dr Maje Ignjatov, naučnog saradnika).

4.5.2. Priprema suspenzije mikroorganizama i standardizacija inokuluma

Bakterijske suspenzije su dobijene od prekonocnih kultura koje su rasle na Müller Hinton agaru (MHA) (Torlak, Beograd, Srbija) na 37 °C, dok su suspenzije *Candida* dobijene od prekonocnih kultura koje su rasle na sladnom agaru (SL) napravljene u sterilnom fiziološkom rastvoru, određenog zamućenja, prema standardnim procedurama Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2008) sa malim modifikacijama prema Karaman i sar. (2009). Zamućenje bakterijskog i inokuluma *Candida*-e podešeno je korišćenjem 0,5 McFarland-ovog standarda pomoću fotoelektričnog fotometra (MA COLORIMETER 9504. Metrix). Početni broj ćelija u testiranom bakterijskom inokulumu je podešen na $1,5 \times 10^8$ CFU/mL, dok je za inokulum *C. albicans* podešen na $1,5 \times 10^6$ CFU/mL.

Kulture plesni su zasejane na PDA podlozi (Torlak, Srbija) koja se pokazala kao dobra podloga za brz rast i sporulaciju u trajanju od 7 dana na 27 °C. Nakon inkubacije u sterilnim uslovima, ezom je uzet uzorak kultivisanih gljiva i suspendovan u sterilnoj destilovanoj vodi. Suspenzija spora gljiva *F. proliferatum* (BL1), *F. verticillioides* (BL4), *F. proliferatum* (BL5) odgovaraju gustini $1,5 \times 10^7$, dok kod *F. graminearum* (S1) i *A. padwickii* odgovaraju gustini $1,5 \times 10^6$ ćelija po mL.

Za dobijanje inokuluma određenog zamućenja, odnosno gustine, korišćena je Bürker Türk komora (hemocitometar) i mikroskop. Broj spora u komori utvrđen je direktnim brojanjem pomoću mikroskopa u odgovarajućim kvadratima komore. Broj spora u komori se koristi za izračunavanje koncentracije ili gustine spora u suspenziji po sledećoj formuli:

$$\text{Koncentracija ćelija} = (N_{\text{ćelija}} / N_{\text{komora}} \times V_{\text{komora}}) \times 1000$$

4.5.3. Procena vrednosti MIC i MBC/MFC

Minimalna koncentracija aktivne supstance koja sprečava rast u standardnoj suspenziji mikroorganizama predstavlja minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC) i odraz je relativne osetljivosti mikroorganizama. MIC predstavlja prvu koncentraciju ispitivane supstance u čijem prisustvu u komorici nema precipitacije ili zamućenja (uočljivog rasta). Kako je MIC u najvećem broju slučajeva nedovoljna da bi lečenje bilo efikasno neophodno je odrediti minimalnu baktericidnu/fungicidnu (MBC/MFC) koncentraciju odnosno koncentraciju antimikrobnog agensa koja je smrtonosna za dati mikroorganizam (Duraković, 1996). MBC/MFC predstavlja koncentraciju koja ubija 99,9 % mikroorganizama, što je 99,9 % od finalne brojnosti mikroorganizama u bujonu u svakoj od komorica unutar mikrotitar ploče.

Tabela 3. Protokol za određivanje vrednosti MIC

Radna proba	Kontrola vizuelnog efekta ekstrakta	Kontrola rastvarača (0,5 % DMSO)	Kontrola rasta
100 µl inok. bujona*	100 µl čistog bujona	100 µl inok. bujona*	110 µl
10 µl ekstrakta/antibiotika/antimikotika	10 µl ekstrakta najjače konc.	10 µl 5 % DMSO	inok. bujona*

*Inokulacija MH/SL bujona: 4950 µl bujona + 50 µl suspenzije m.o.

Nakon postavljanja tretmana prema navedenom protokolu (**Tabela 3**), mikrotitar ploče su odložene u termostat na inkubaciju tokom 24 h na 37 °C za bakterije i 26 °C za *C. albicans* sojeve. Nakon 24 h određivana je vrednost MIC upoređivanjem rasta kultura sa tretmanom i rasta kultura u kontrolnim komoricama (u bujonu bez ekstrakta gljiva).

Za identifikovanje metabolički aktivnih bakterijskih ćelija korišćen je 2,3,5 trifenil tetrazolijum hlorid (TTC) - bela kristalna supstanca, rastvorljiva u vodi, koja služi kao akceptor elektrona različitih dehidrogenaza. Delovanjem dehidrogenaza TTC prelazi u redukovani trifenil tetrazolijum formazan (TTF) koji je nerastvorljiv u vodi i daje crvenu boju. U velovima gde postoje, bakterijske ćelije boje se u crveno.

Za određivanje MBC/MFC vrednosti, po 100 µl smeše iz velova u kojima nije bilo vidljivog rasta (zamućenja), zasejano je na petri ploče sa hranljivim/sladnim agarom i odloženo na inkubaciju tokom 24 h/48 h na 37 °C/26 °C nakon čega je vršeno prebrojavanje kolonija.

4.5.4. Antifungalna aktivnost

Antifungalna aktivnost makrogljiva određena je *in vitro* testom mikrodilucionom metodom u mikrotitar pločama, kako bi se utvrdile minimalne inhibitorne i minimalne fungicidne koncentracije (MIC i MFC). Ukupna zapremina u velu iznosila je 101 μ l. U svaki vel aplicirano jelo 50 μ l hranljivog bujona (Sladni bujon, Torlak, Srbija) i 1 μ l suspenzije spora fitopatogenih gljiva. Radi lakšeg apliciranja u velove, suspenzija spora makrogljiva se prethodno može dodati u hranljivi bujon. Pored pomenute suspenzije i hranljivog bujona u velove je aplicirano i 50 μ l ekstrakta makrogljiva u 3 razređenja (početnih koncentracija 100 %, 50 % i 25 %). Svaki soj analiziran je u 2 ponavljanja.

Za pozitivnu kontrolu upotrebljena je suspenzija spora gljiva i bujon, za negativnu kontrolu čist bujon, dok je za kontrolu rastvarača upotrebljen rastvarač i suspenzija spora gljiva.

Mikrotitar ploče inkubirane su 72 h na temperaturi 27 °C. Nakon inkubacije rezultati su očitani vizuelno. Prva koncentracija ekstrakta bez vidljivog rasta je tretirana kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC), dok je minimalna fungicidna koncentracija (MFC) utvrđena nakon očitavanja MIC vrednosti, prebacivanjem sadržaja vela na petri ploče sa agarom i inkubacije ploča. Iz zapremine čitavog vela (101 μ l) u kome nije bilo zamućenja, preneseno je po 100 μ l na ploče sa sladnim agarom (Torlak, Srbija). Nakon inkubacije 72 h na 27 °C očitani su rezultati koji su zabeleženi prebrojavanjem kolonija.

4.5.5. Antivirusna aktivnost

Prilikom određivanja antiviralne aktivnosti ekstrakata gljiva korišćen je bakteriofag vB_BbrS_LK3 (familija *Siphoviridae*) specifičan za referentni bakterijski soj *Bordatella bronchiseptica* ATCC 10580. Fagi su umnoženi na odgovarajućem domaćinu, zatim su percipitirani pomoću NaCl (koncentracije 58,4 g/L) i PEG6000 (1:10 w/v), istaloženi centrifugiranjem (pri 11000 g, tokom 10 min. na temperaturi od 4 °C) i prečišćeni izopikničkim ultracentrifugiranjem u diskontinualnom gradijentu CsCl (Sambrook i Russell, 2001). Nakon dijalize, suspenzije faga su čuvane u SM puferu (50 mM Tris HCl pH 7,5; 0,1 M NaCl; 8 mM MgSO₄; 1 mg/mL želatina) na +4 °C, dok je bakterijski soj čuvan na -70 °C, u podlozi sa 10 % glicerola. Bakterije su za potrebe eksperimenta gajene na tečnoj Luria-Bertani podlozi na 37 °C u toku 24 h. Bakteriofagi su pomešani sa analiziranim ekstraktima čije su se finalne koncentracije kretale u opsegu od 0,20 do 300 mg/mL. Brojnost faga u finalnoj zapremini iznosila je 1×10^5 PFU/mL. Kontrola je podrazumevala inkubaciju bakteriofaga sa najvišom koncentracijom rastvarača (5 % DMSO). Pripremljene smeše tretmana faga određenim koncentracijama ekstrakata inkubirane su tokom 30 min. na 37 °C nakon čega je efekat

ekstrakata neutralisan desetostepenim razređivanjem bakteriofaga u SM puferu. Na opisani način, tretirana je i kontrola. Nakon tretmana određivan je titar faga metodom plaka (Carlson, 2005). Broj infektivnih faga u odnosu na kontrolu izražen je u procentima (%).

Procenat antiviralne aktivnosti ispitivanih ekstrakata izražen je kao % inhibicije prema sledećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = 1 - N_{\text{tretmana}}/N_{\text{kontrola}} \times 100$$

gde je,

N_{tretmana} - broj plaka u tretmanu (sa ekstraktom)

N_{kontrola} - broj plaka u kontroli (rastvaraču/puferu)

4.6. Određivanje anti-acetilholinesterazne aktivnosti

4.6.1. *In solid* (TLC ploča)

Inhibicija enzima AChE određena je prema proceduri opisanoj u radu Marston i sar. (2002). Vodeni i metanolni ekstrakti su, nakon liofilizacije i uparavanja, rastvoreni u metanolu i napravljena je stoka koncentracija od 1 mg/mL. Serija razblaženja napravljena od ovog stoka je bila sledeća: 0,001, 0,01 i 0,1 mg/mL. 100 μ L svakog razblaženja je aplicirano na TLC ploču u cilju testiranja 100, 10, 1 i 0,1 μ g koncentracija uzorka da bi se detektovala najmanja koncentracija koja inhibira enzim AChE. Kao pozitivna kontrola korišćen je alkaloid galantamin (Sigma-Aldrich, SAD). Napravljen je stok rastvor AChE (1000 U enzima u 150 mL tris-hidrohlidnog kiselog pufera pH 7,8) koji je stabilizovan dodavanjem goveđeg serum albumina (150 mg). Uzorci su nanešeni na TLC ploču, rastvarač je uklonjen sušenjem fenom i ploča je isprskana sa rastvorom enzima. Za vreme inkubacije enzima ploča je držana 20 min. u vlažnoj atmosferi na 37 °C. Aktivnost AChE detektovana je prskanjem TLC ploče rastvorima 1-naftil acetata (250 mg 1-naftil acetata u 100 mL etanola) i Fast Blue B soli (400 mg Fast Blue B u 160 mL destilovane vode) koji su pomešani neposredno pre upotrebe. Inhibicija AChE uočavala se u vidu belih mrlja na ružičastoj podlozi oko 1-2 min. nakon nanošenja reagensa.

4.6.2. *In liquid*

Acetilholinesterazna aktivnost određena je u *in vitro* uslovima prema Ellman (1961). U ovoj metodi koristi se acetilholinjodid (AChI), poreklom iz električne jegulje, kao veštački supstrat za enzim acetilholinesterazu (AChE). Dejstvom ovog enzima AChI se razlaže do tiholina i acetata, gde tako nastali tiholin reaguje sa ditiobenzoatom (DTNB) što rezultira nastankom žute boje. Jačina ovog obojenja mera je acetilholinesterazne aktivnosti i može se

pratiti spektrofotometrijski. Aktivnost enzima generalno se izražava kao stepen tj. količina supstrata (u molima) utrošena od strane poznate količine enzimskih jedinica u određenom vremenskom intervalu. U ovom slučaju, to bi bila količina AChI koju je AChE utrošio u min. Aktivnost datog enzima određena je spektrofotometrijski u 0,1 M puferu Na-fosfata.

Postupak

U mikrotitar ploču sa 96 velova aplicirano je po 20 μ L ekstrakta/standarda/rastvarača u rasponu koncentracija od 500 do 10 μ g/mL. Nakon toga, u svaki vel dodato je po 150 μ L rastvora A (Ellman-ov reagens + supstrat AChI) i ploča je ostavljena na inkubaciju tokom 12 min. na 25 °C. Nakon inkubacije, u velove je dodat rastvor B (enzim AChE prethodno rastvoren u fosfatnom puferu pH 8), što je rađeno na ledu. Odmah po dodatku enzima izvršeno je 15 merenja u vremenskim intervalima od 1 min., na talasnoj dužini od 412 nm. Kao pozitivna kontrola korišćen je komercijalni terapeutik donezepil (Donecept, Zdravlje, Leskovac). Inhibicija enzimske aktivnosti izračunava se na osnovu izmerenih apsorbanci, prema sledećoj formuli:

$$I_{\text{AChE}} (\%) = (1 - A_{\text{uzorka}}/A_{\text{kontrola}}) \times 100$$

gde je

A_{uzorka} — apsorbanca pri određenoj koncentraciji uzorka (ekstrakta)

A_{kontrola} — apsorbanca kontrole, tj. apsorbanca bez uzorka (ekstrakta)

4.7. Određivanje citotoksične aktivnosti

Radi ispitivanja citotoksične aktivnosti H₂O, EtOH i MeOH ekstrakata gljiva korišćena je HepG2 (ATCC) kontinualna linija humanih hepatoma ćelija izolovanih iz hepatocelularnog karcinoma, dobijena od kolega iz Laboratorije za humanu biomedicinu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd. Ispitane su četiri koncentracije ekstrakata gljiva u rasponu od 33,3 do 900 μ g/mL. Ćelije su gajene u flasku i neposredno pred početak rada ispirane sa 10 mL sterilnog PBS rastvora (140 mM NaCl, 27 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4), nakon čega je dodato 2 mL 0,01 % rastvora tripsina, i ostavljene u inkubator 10 minuta da bi došlo do odvajanja ćelija od zida faska. Zatim je dodato 15 mL medijuma Minimum Essential Medium - MEM (M0643, Sigma Aldrich, SAD) (1,5 g/L NaHCO₃, 100 000 IU/L penicilin, 100 mg/L streptomycin-sulfat, 0,11 g/L natrijum-piruvat, HEPES pufer (20 mM); pH 7,4) u koji je dodato 10 % telećeg fetalnog seruma (FCS), čime je dobijeno 20 mL suspenzije u kojoj je određen broj živih ćelija TBE testom (Trypan Blue Exclusion test). U 50 μ L suspenzije ćelija dodaje se 50 μ L boje Trypan blue 0,4 %. Mrtve ćelije se oboje, jer boja prolazi kroz njihovu membranu pa se pod svetlosnim mikroskopom

vide kao plavo obojene, dok žive ćelije ostaju neobojene. Žive ćelije se broje u kvadratima u uglovima Nauber-ove komoree i izračunava se broj ćelija u mililitru suspenzije. Nakon određivanja broja ćelija u suspenziji, priprema se potrebna količina nove suspenzije tako da količina živih ćelija bude 15000/0,2 mL MEM 10 % FCS. Iz ovako pripremljene finalne suspenzije ćelije su sađene u 96-vel mikrotitar ploče.

Iz finalne suspenzije ćelija u svaki vel se dodaje 200 μ L, odnosno 15 000 ćelija po velu. Ćelije se apliciraju samo u unutrašnje velove, dok se u spoljašnje dodaje 100 μ L medijuma radi postizanja što ujednačenijih uslova za ćelije u tretmanu. Ovako postavljene ćelije inkubiraju se u CO₂ inkubatoru 24 h, i tokom tog perioda žive ćelije se pričvrste za podlogu ploče i uspostavljaju normalnu metaboličku aktivnost.

Tretman: Nakon inkubacije uklanja se medijum iz velova. U velove namenjene za tretman dodaje se 100 μ L svežeg MEM 10 % FCS, koji sadrži odgovarajuću koncentraciju ispitivanog ekstrakta, a analiza je rađena u triplikatu. Uzorci za tretman su pripremljeni sukcesivnim razblaživanjem osnovnog rastvora uzorka u medijumu. Kao rastvarač za osnovni uzorak koristi se DMSO, dok je serija razblaženja napravljena u MEM 10 % FCS (sadržaj DMSO u medijumu ne prelazi 0,5 %). U kontrolne velove dodaje se po 100 μ L svežeg MEM 10 % FCS. Ploče se zatim vraćaju u inkubator i inkubiraju u vremenskim periodima od 24 i 72 h.

Citotoksična aktivnost utvrđena je kolorimetrijskim MTT testom (Mosmann, 1983), koji se koristi za određivanje broja živih ćelija u testovima proliferacije i osetljivosti na različite supstance. Princip metode se zasniva na redukciji tetrazolijumove soli [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid] (MTT) u plavo obojeni proizvod (formazan), u prisustvu mitohondrijalnog enzima sukcinat dehidrogenaze. Količina nagrađenog formazana direktno je proporcionalna broju vijabilnih ćelija, a apsorbancu se određuje spektrofotometrijski, na dve talasne dužine: 540 i 690 nm. Nakon inkubacije od 24 h/72 h, postojeći medijum se odliva i u sve velove dodaje se rastvor MTT u koncentraciji od 0,5 mg/mL, koji se priprema u medijumu neposredno pre dodavanja. Dodaje se 100 μ l rastvora u svaki vel, tako da se finalno dobija koncentracija 0,05 mg/velu. Sledi inkubacija u trajanju od 3 h, na 37 °C, 5 % CO₂. Po isteku inkubacionog vremena, medijum se odliva iz velova. Dodaje se 100 μ l 0,04 M HCl u izopropanolu. Ploča se ostavi tokom 10 min. na sobnoj temperaturi, nakon čega se meri apsorbancu (A1 540 nm i A2 690 nm). Konačna apsorbancu računa se na sledeći način:

$A_{uzorka} = A1 - A2$. Na osnovu dobijenih rezultata, citotoksičnost se računa prema formuli:

$$\text{Citotoksičnost (\%)} = (1 - A_{uzorka}/A_{kontrola}) \times 100$$

4.8. Hemijska karakterizacija ekstrakata

4.8.1. Polisaharidi

Planarna hromatografija (PC) - uzorci PSH ekstrakata su hidrolizovani sa 2M trans masnom kiselinom (*engl.* trans fatty acid TFA) na 120°C, tokom 16 sati. Dobijeni hidrolizati analizirani su silaznom papirnom hromatografijom, u razvijaču etil-acetat-piridin-voda (2,5:1:2,5, v/v/v). PC hromatografijom, u hidrolizovanim PSH ekstraktima ispitivanih uzoraka, identifikovane su monosaharidne komponente i upoređivana je hromatografska mobilnost sa autentičnim monosaharidnim standardima.

Infracrvena spektroskopija sa Furijevom transformacijom - Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR spektroskopija) spektroskopska je metoda kojom se određuje karakterizacija polisaharida.

Odmereno je 2 mg liofilizovanog PSH ekstrakta i pomešano sa 200 mg KBr da bi se napravio pelat. FTIR spektar dobijenog pelata je meren kamerom Nicolet 6700 FT (Thermo Scientific, USA), tehnikom snimanja ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform Infrared Spectroscopy) u rasponu od 400 - 4000 cm^{-1} brzinom od 0,2 cm/s (Ren *i sar.*, 2014).

Elementalnom organskom mikroanalizom (EOMA) je određen sadržaj C, H, N, S koji je analiziran je na automatskom analizatoru Vario EL III CHNS/O Elementar analize firme Elementar.

4.8.2. Ukupan sadržaj proteina

Ukupan sadržaj proteina u ispitivanim vrstama gljiva određen je spektrofotometrijskom metodom prema Lowry *i sar.* (1951). Uzorci gljiva su pripremljeni na sledeći način: 0,5 g liofilizovana gljive je pomešano sa 4 mL 0,1 M fosfatnog pufera (pH 6,4), zatim je dodat 1 mM phenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) - inhibitor proteaza i 0,2 % tween (deterdžent koji poboljšava proteinsku ekstrakciju). Nakon toga uzorak je centrifugiran tokom 10 min. na 10 000 rpm. Potom je na 2 mL uzorka dodato 0,1 g polivinil piroolidona (PVP), čiji je krajnji udeo u puferu za ekstrakciju iznosio 5 %, radi taloženja fenola. Supernatant je odliven i korišćen za dalje analize.

Priprema dobijenih uzoraka za određivanje proteina: 30 mL reagensa (koji je sadržavao rastvore 1 (2 % Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH), 2 (1 % CuSO_4) i 3 (2 % NaK tartarat) u odnosu 98:1:1) i 200 μL uzorka (koji je razblažen 4x - 50 μL uzorka + 150 μL dH_2O) je odstovalo 10 min. na sobnoj temperaturi, zatim je dodato 600 μL Folin–Ciocalteu (FC) reagensa i ostavljeno da stoji tokom 30 min. u mraku. Apsorbanca je merena na λ 550 nm.

Kao standard korišćen je Bovine Serum Albumine (BSA) na osnovu koga je konstruisana kalibraciona kriva.

4.8.3. Ukupan sadržaj fenola i flavonoida

Sadržaj ukupnih fenola određen je metodom koja je bazirana na reakciji fenola sa FC reagensom, u kojoj nastaje obojeni kompleks sa maksimumom apsorpcije na 760 nm (Singleton i sar., 1999). Kao standard korišćena je galna kiselina.

Sadržaj flavonoida određen je spektrofotometrijskom metodom prema Chang i sar. (2002), prilagođenoj za mikrotitar ploče. Kao standard je korišćen kvercetin. Razblaženja kvercentina za standardnu krivu napravljena su u rasponu koncentracija od 1,25 do 100 µg/mL. Sve radne probe su rađene u tri ponavljanja. ApSORBANCA je merena na λ 450 nm, nakon 30 min. inkubacije.

4.8.4. Fenolni profil (HPLC-MS/MS)

Fenolni profil ekstrakata determinisan je pomoću HPLC-MS/MS metode (Orčić i sar., 2014). Kalibraciona kriva je konstruisana u OriginLabs OriginPro (verzija 8) gde su preračunate i koncentracije fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima. Referentni standardi za fenolna jedinjenja dobijeni su od Sigma-Aldrich Chem (Steinheim, Nemačka), Fluka Chemie GmbH (Buchs, Švajcarska) ili Chromadex (Santa Ana, SAD).

4.8.5. Organske kiseline (HPLC)

Analiza sadržaja organskih kiselina sprovedena je na metanolnim i vodenim ekstraktima tehnikom tečne hromatografije visoke rezolucije (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) na aparatu HPLC Agilent 1200 serije (Agilent Technologies, USA) uz upotrebu NUCLEOGEL SUGAR 810 H (MACHEREY-NAGEL) kolone. Detekcija razdvojenih pikova izvršena je primenom detektora sa serijom dioda (Diode Array Detector, DAD) na 225 i 210 nm. Kao mobilna faza korišćena je 5 mmol/L H₂SO₄ uz izokratsko eluiranje sa protokom od 0,5 ml/min. Injektovano je 10 µL ekstrakta uzorka, automatski, korišćenjem autosamplera. Kolona je termostatisana na temperaturi 65 °C. Ukupno vreme jedne analize iznosilo je 25 minuta. Korišćeni su sledeći dostupni standardi organskih kiselina: *oksalna, limunska, jabučna, askorbinska, hinska, ćilibarna, mravlja, sirćetna, propionska i buterna* kiselina.

4.8.6. Masne kiseline (GC)

Priprema uzoraka i detekcija metil-estra masnih kiselina prisutnih u gljivama izvršena je metodom koja je opisana u radu Milovanovic i sar. (2012). Kao rastvarač upotrebljen je n-heptan, a za inertizaciju i oslobađanje metil estara masnih kiselina od ostataka rastvarača primjenjivano je uparavanje u struji azota. Pripremljeni uzorci analizirani su na gasnom hromatografu (GC) Agilent 7890A system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD), sa plameno-jonizujućim detektorom (FID – Flame Ionization Detector) i autoinjektujućim sistemom za tečnosti, na kapilarnoj koloni mešane silike (Supelco SP-2560 Capillary GC Column 100m x 0,25 mm d = 0,20 μ m). Kao gas nosač upotrebljen je helijum (čistoće 99,9997 vol %), pri protoku od 1,5 ml/min i pritisku od 1,092 bara. Uzorci su ubrizgavani u kolonu u takozvanom split režimu, čiji je odnos iznosio 30:1. Pikovi metil estara masnih kiselina identifikovani su poređenjem retencionih vremena iz uzoraka sa retencionim vremenima iz standarda “Supelco 37 component fatty acid methyl ester mix” kao i sa internim podacima dobijenim u prethodnim ispitivanjima masnih kiselina na gasnom hromatografu sa masenim detektorom. Dobijeni rezultati izražavani su kao masa pojedinačne masne kiseline, ili grupe masnih kiselina (g) u 100 grama masnih kiselina iz uzorka.

4.8.7. Biogeni elementi (AAS)

Atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom po standardnoj metodi Varian (Arsenijević-Maksimović i Pajević, 2002) određen je sadržaj određenog broja mikro- i makroelemenata, među kojima i sadržaj teških metala. Za obradu uzoraka korišćen je atomski apsorpcioni spektrofotometar (FS AAS240/GTA120, Varian) uz upotrebu acetilen-vazdušne plamene tehnike (pri atomizacionoj temperaturi oko 2300 °C za kvantifikaciju jona Cu i Mg) i N₂O-acetilenskog plamena (pri atomizacionoj temperaturi oko 2700 °C za kvantifikaciju jona Ca). Za određivanje pojedinih jona metala (Cu, Mg i Ca) korišćene su katodne lampe pri talasnim dužinama od 324,8, 285,2 i 422,7 nm, a njihov sadržaj je izražen u mg/kg suve mase gljive.

4.9. Statistička analiza

Za statističku analizu korišćen je programski paket STATISTICA (StatSoft, Inc. (2013), version 12.0 www.statsoft.com). Sva mernja su urađena u triplikatima, a dobijene vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Za jednofaktorsku analizu varijanse dobijenih rezultata korišćen je Tukey test (One-way ANOVA, post hoc Tukey HSD, $p < 0,01$). Pearson korelacije su izračunate između sadržaja ukupnih fenola i flavonoida i IC_{50} vrednostima za različite testove, u programu Statistika. Za određivanje varijabilnosti uzoraka korišćene su aglomerativne politetičke klaster analize, a rezultati su prikazani u vidu horizontalnog klastera i analize osnovnih komponenti PCA.

5. REZULTATI

5.1. Biološka aktivnost analiziranih gljiva

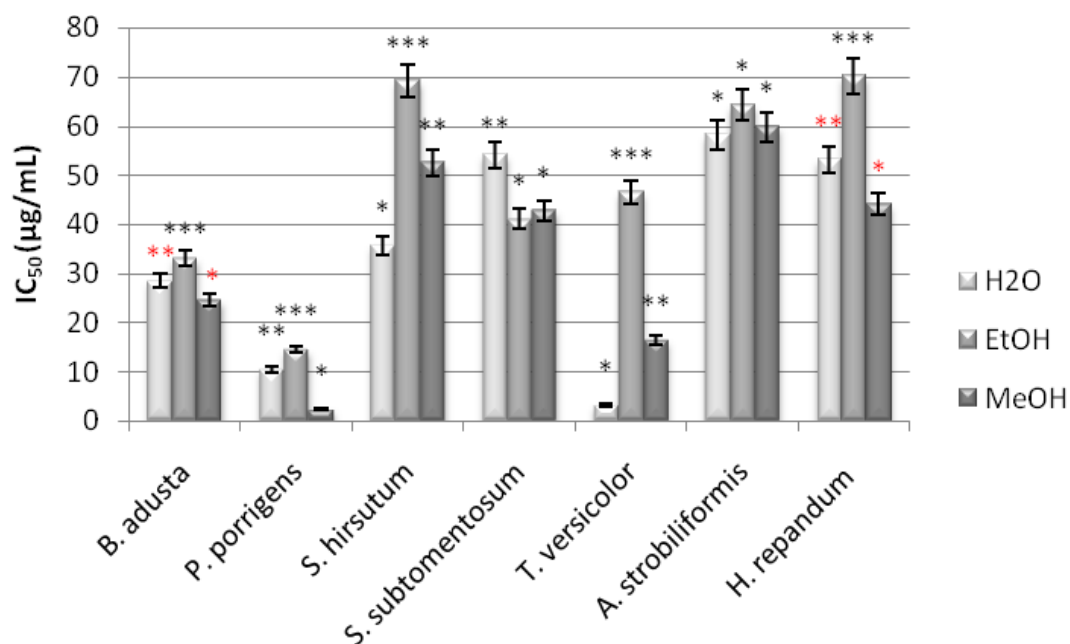
5.1.1. Antiradikalska aktivnost

Antiradikalska aktivnost, anti-OH, anti-O₂⁻, anti-NO, anti-Asc, anti-DPPH i anti-ABTS radikalna aktivnost, je ispitana za sve ekstrakte gljiva.

Rezultati su predstavljeni na slikama 26-31, a izraženi su kao IC₅₀ vrednost (µg/mL) ± SD. Razlika između ekstrakata unutar jedne vrste utvrđena je Tukey HSD testom ($p < 0,01$, $p < 0,05$). Stubići koji ne dele isti broj zvezdica statistički se značajno razlikuju. Zvezdice koje su obeležene crnom bojom razlikuju se prema značajnosti $p < 0,01$, dok crvene zvezdice označavaju nivo značajnosti od $p < 0,05$.

5.1.1.1. Anti-OH radikalna aktivnost

Najbolju aktivnost neutralizacije OH[•] ispoljio je **MeOH ekstrakt vrste *P. porrigens*** (IC₅₀ 2,32 µg/mL), kao i H₂O ekstrakt vrste *T. versicolor* (IC₅₀ 3,21 µg/mL), dok su najmanju sposobnost neutralizacije OH[•] ispoljili EtOH ekstrakti vrsta *H. repandum* i *S. hirsutum*. Među analiziranim H₂O, EtOH i MeOH ekstraktima unutar svake vrste postoji statistički značajna razlika u ispoljenoj aktivnosti neutralizacije OH[•] (Slika 26).

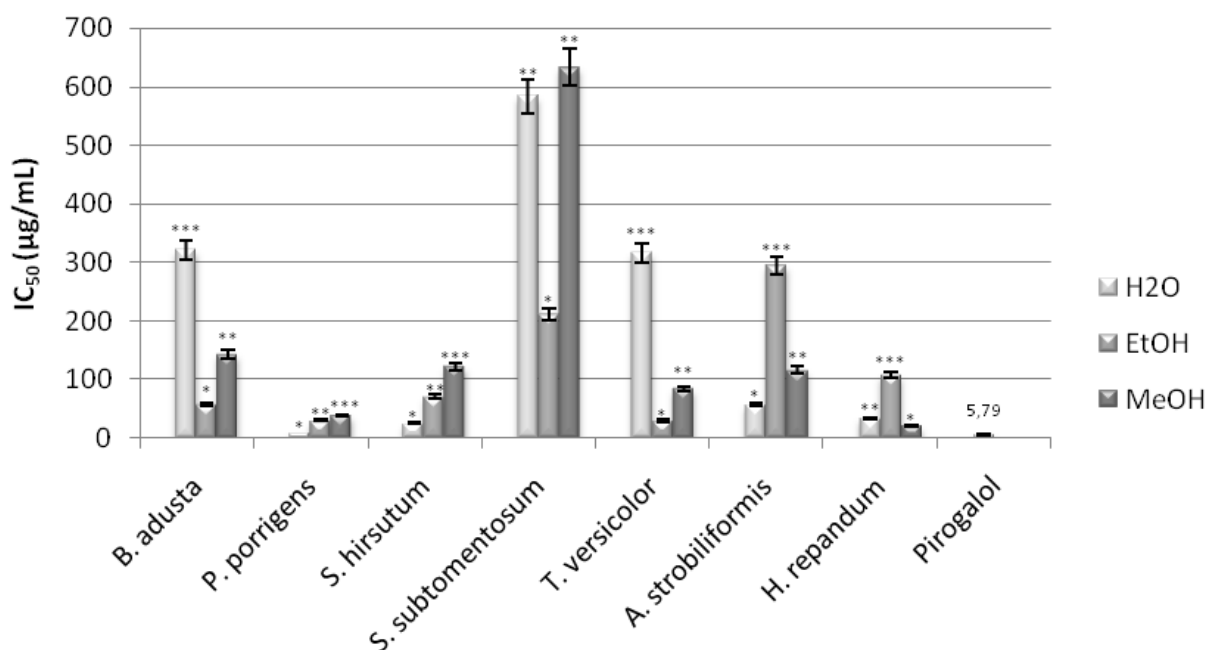


Slika 26. Uporedni prikaz vrednosti IC₅₀ za anti-OH radikalnu aktivnost

Kod većine ispitivanih vrsta MeOH ekstrakti su ispoljili statistički značajno bolju anti-OH radikalsku aktivnost u odnosu na H₂O i EtOH ekstrakte, sa izuzetkom vrsta *S. hirsutum* i *T. versicolor* kod kojih su se kao najpotentniji pokazali H₂O ekstrakti. Sa druge strane, najmanje polarni ekstrakti (EtOH ekstrakti) ispoljili su najslabiju aktivnost kod šest od sedam analiziranih vrsta. Na osnovu dobijenih rezultata uočava se nešto bolja anti-OH aktivnost lignikolnih u odnosu na analizirane terikolne vrste.

5.1.1.2. Anti-O₂⁻ radikalska aktivnost

Svi ispitivani ekstrakti ispoljili su sposobnost neutralizacije O₂⁻. Na osnovu uporednog prikaza dobijenih IC₅₀ vrednosti (**Slika 27**), jasno se uočava da je H₂O ekstrakt vrste *P. porrigens* imao najjaču anti-O₂⁻ radikalsku aktivnost među svim ispitanim ekstraktima pri koncentraciji od 9,81 µg/mL, dok su najslabiju aktivnost pokazali MeOH i H₂O ekstrakt vrste *S. subtomentosum* (632,78 µg/mL i 584,07 µg/mL). Sva tri tipa analiziranih ekstrakata vrste *P. porrigens* istakli su se kao dobri neutralizatori O₂⁻, sa veoma niskim IC₅₀ vrednostima od 9,81 do 39,12 µg/mL.



Slika 27. Uporedni prikaz vrednosti IC₅₀ za anti-O₂⁻ radikalsku aktivnost

H₂O ekstrakti su ispoljili najbolju aktivnost kod tri od sedam analiziranih vrsta: *S. hirsutum*, *P. porrigens* i *A. strobiliformis*, dok su kod tri vrste: *T. versicolor*, *S. subtomentosum* i *B. adusta*, EtOH ekstrakti ispoljili najbolju aktivnost neutralizacije O₂⁻ dok je kod jedne vrste *H. repandum* najbolju aktivnost pokazao MeOH ekstrakt. Među ekstraktima unutar svake

vrste, postoji statistički značajna razlika u ispoljenim aktivnostima. Poređenjem aktivnosti, lignikolnih, sa aktivnostima terikolnih vrsta, ne uočava se razlika.

Prema dobijenim IC₅₀ vrednostima ispitivane vrste se po svojoj aktivnosti od najjače do najslabije mogu prikazati na sledeći način:

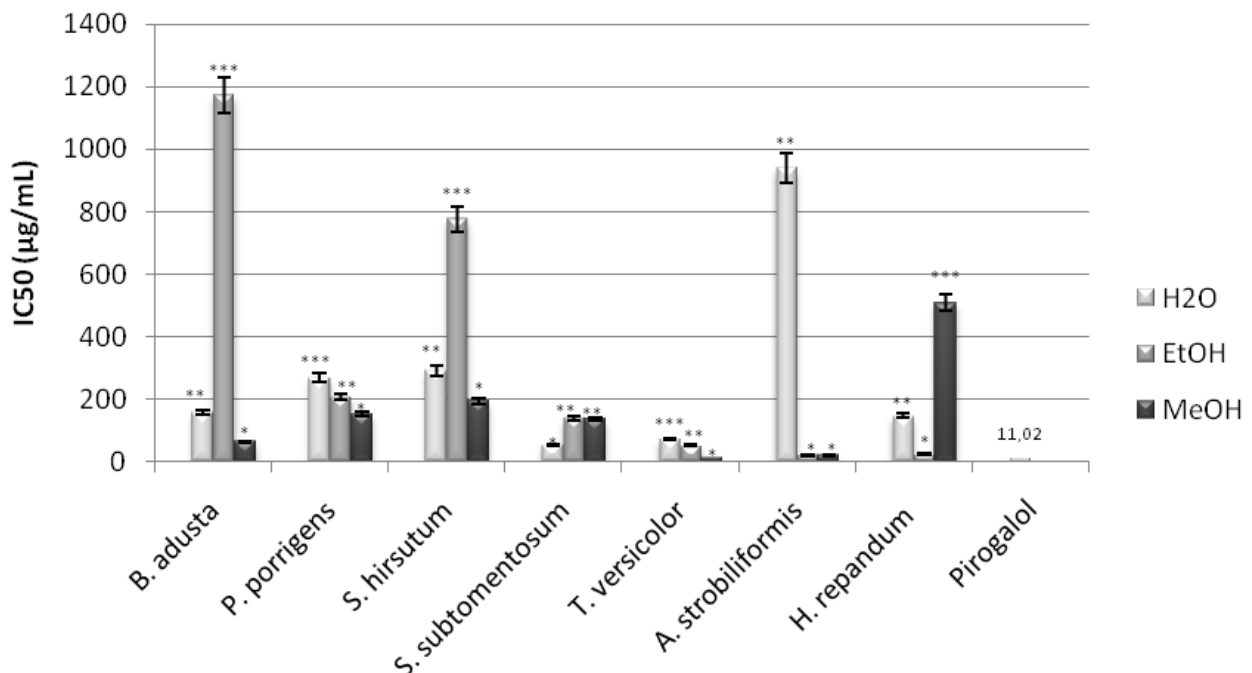
MeOH ekstrakti: *H. repandum* (21,41 µg/mL) > *P. porrigens* (39,12 µg/mL) > *T. versicolor* (84,42 µg/mL) > *A. strobiliformis* (116,43 µg/mL) > *S. hirsutum* (122,68 µg/mL) > *B. adusta* (143,8 µg/mL) > *S. subtomentosum* (632,78 µg/mL)

EtOH ekstrakti: *P. porrigens* (30,23 µg/mL) > *B. adusta* (57,05 µg/mL) > *S. hirsutum* (70,67 µg/mL) > *T. versicolor* (79,45 µg/mL) > *H. repandum* (107,31 µg/mL) > *S. subtomentosum* (210,92 µg/mL) > *A. strobiliformis* (294,75 µg/mL)

H₂O ekstrakti: *P. porrigens* (9,81 µg/mL) > *S. hirsutum* (25,65 µg/mL) > *H. repandum* (34,16 µg/mL) > *A. strobiliformis* (57,03 µg/mL) > *T. versicolor* (316,09 µg/mL) > *B. adusta* (321,59 µg/mL) > *S. subtomentosum* (584,07 µg/mL)

5.1.1.3. Anti-NO radikalska aktivnost

Ispitivani ekstrakti svih sedam analiziranih vrsta ispoljili su sposobnost neutralizacije NO[•].



Slika 28. Uporedni prikaz vrednosti IC₅₀ za anti-NO radikalsku aktivnost

Uporedni prikaz IC₅₀ vrednosti dobijenih za anti-NO radikalsku aktivnost (**Slika 28**) ukazuje na najveću aktivnost MeOH ekstrakta vrste *T. versicolor* čija je IC₅₀ vrednost iznosila 12,87 µg/mL. Među analiziranim H₂O, EtOH i MeOH ekstraktima unutar svake vrste, postoji statistički značajna razlika, osim između EtOH i MeOH ekstrakata vrste *S. subtomentosum* i

EtOH i MeOH ekstrakata vrste *A. strobiliformis*. Dosta slabiju aktivnost u odnosu na većinu dobijenih vrednosti ispoljili su EtOH ekstrakti vrsta *B. adusta* i *S. hirsutum*, H₂O ekstrakt vrste *A. strobiliformis* i MeOH ekstrakt vrste *H. repandum*.

Na osnovu svih dobijenih rezultata anti-NO radikalske aktivnosti analizirane gljive se, prema svojoj aktivnosti od najjače do najslabije, mogu raspodeliti na sledeći način:

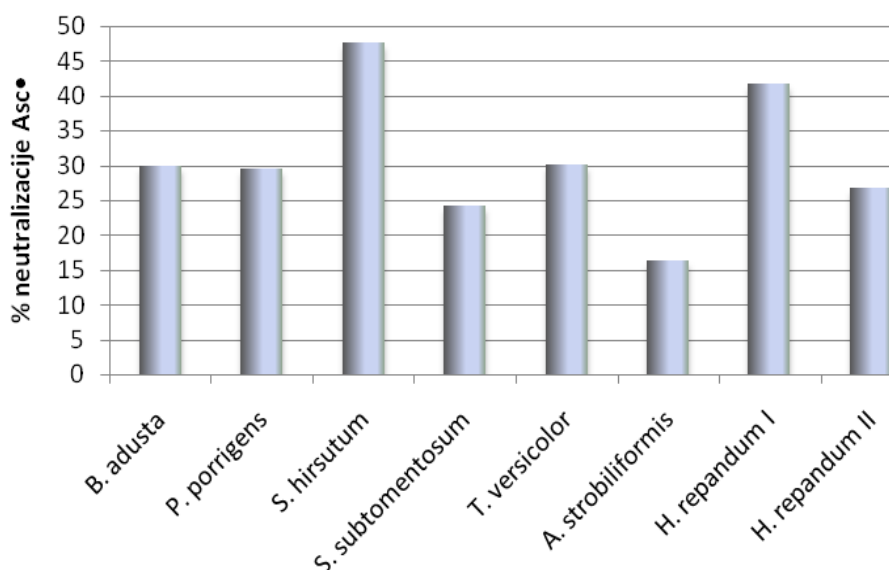
MeOH ekstrakti: *T. versicolor* (12,87 µg/mL) > *A. strobiliformis* (20,45 µg/mL) > *B. adusta* (63,73 µg/mL) > *S. subtomentosum* (136,59 µg/mL) > *P. porrigens* (151,43 µg/mL) > *S. hirsutum* (194,56 µg/mL) > *H. repandum* (509,09 µg/mL);

EtOH ekstrakti: *A. strobiliformis* (20,45 µg/mL) > *H. repandum* (23,83 µg/mL) > *T. versicolor* (52,48 µg/mL) > *S. subtomentosum* (138,25 µg/mL) > *P. porrigens* (208,69 µg/mL) > *S. hirsutum* (776,36 µg/mL) > *B. adusta* (1171,69 µg/mL);

H₂O ekstrakti: *S. subtomentosum* (54,70 µg/mL) > *T. versicolor* (71,76 µg/mL) > *H. repandum* (146,75 µg/mL) > *B. adusta* (159,2 µg/mL) > *P. porrigens* (270,52 µg/mL) > *S. hirsutum* (290,93 µg/mL) > *A. strobiliformis* (938,94 µg/mL).

5.1.1.4. Anti-Asc radikalska aktivnost

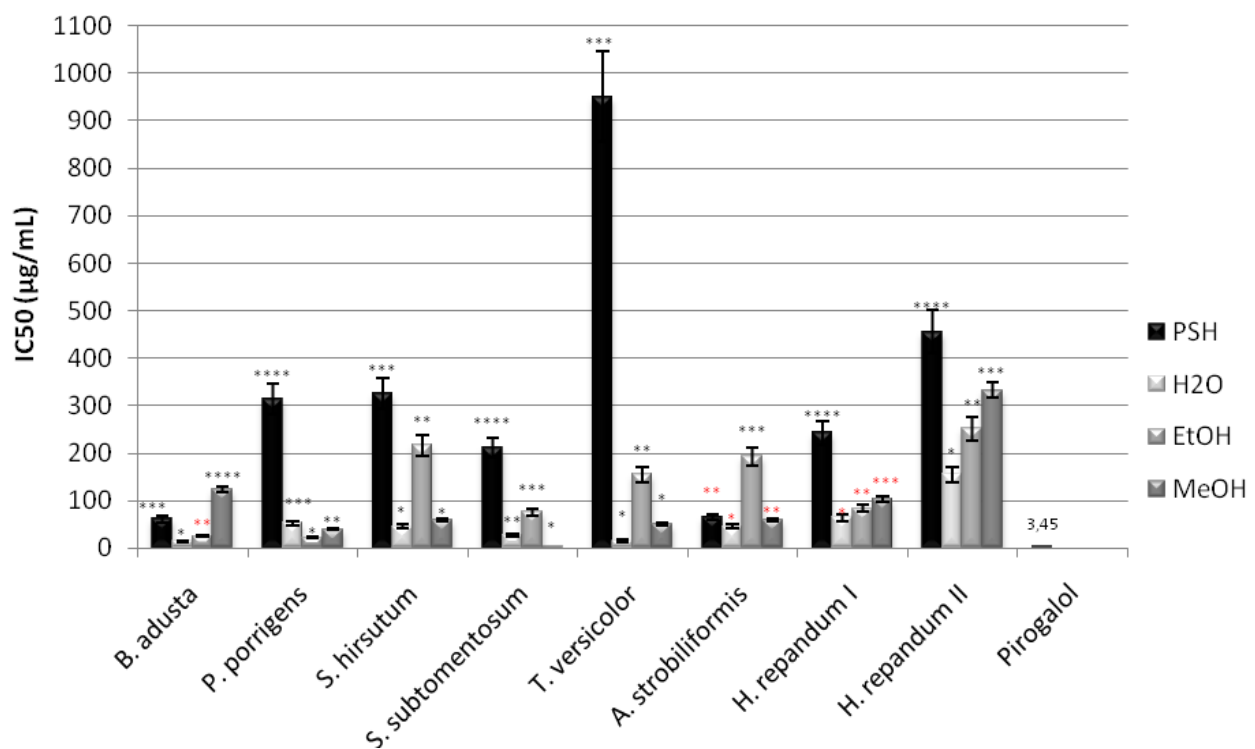
Prema Asc[•] ispitivani su samo H₂O ekstrakti analiziranih vrsta. Svi ispitivani H₂O ekstrakti ispoljili su relativno slabu anti-Asc radikalsku aktivnost (**Slika 29**). **H₂O ekstrakt vrste *S. hirsutum*** bio je najaktivniji (47,46 %), a H₂O ekstrakt vrste *A. strobiliformis* najslabiji (16,25 %). Razlika u aktivnosti između lignikolnih i terikolnih vrsta se ne uočava. Ako posmatramo ekstrakte vrste *H. repandum*, razlika u aktivnosti ove vrste sa različitim lokalitetima je evidentna, vrsta sa područja Tare (41,65 %) ispoljila je skoro dva puta bolju aktivnost od iste vrste sa područja Vršačkog brega (26,51 %).



Slika 29. Usporedni prikaz anti-Asc radikalske aktivnosti

5.1.1.5. Anti-DPPH radikalska aktivnost

Svi ispitivani PSH, H₂O, EtOH i MeOH ekstrakti ispoljili su anti-DPPH radikalsku aktivnost, a koncentracije ekstrakata koje su neutralisale 50 % DPPH[•] kretale su se u opsegu od 4,60 do 950,16 µg/mL (Slika 30). Na uporednom prikazu postignutih IC₅₀ vrednosti uočava se da je najbolju aktivnost ispoljio MeOH ekstrakt vrste *S. subtomentosum*, dok je najslabiju ispoljio PSH ekstrakt vrste *T. versicolor*. Razlika između ekstrakata unutar svake vrste statistički je značajna. Izuzetak čine H₂O i MeOH ekstrakt vrste *S. hirsutum*, H₂O i MeOH ekstrakti vrste *T. versicolor* i PSH i MeOH ekstrakti vrste *A. strobiliformis*. Kod većine analiziranih vrsta (pet od osam) H₂O ekstrakti su pokazali najbolju aktivnost, dok je kod dve vrste (*B. adusta* i *P. porrigens*) to bio EtOH ekstrakt a kod jedne vrste (*S. subtomentosum*) MeOH ekstrakt je ispoljio najbolju aktivnost.

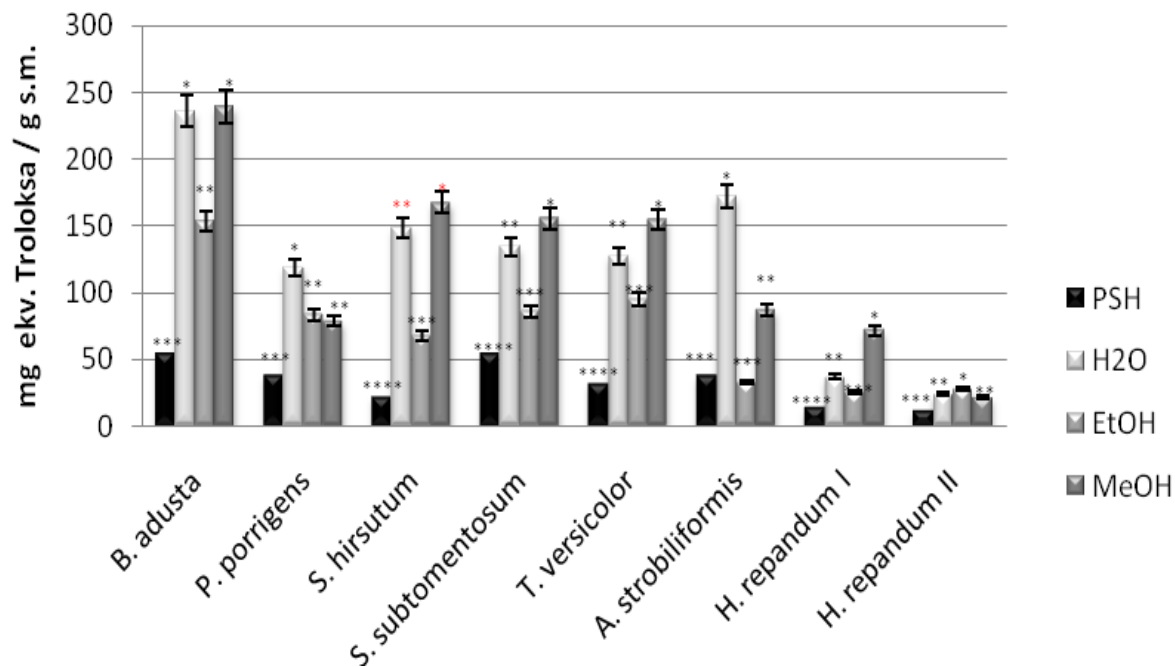


Slika 30. Uporedni prikaz vrednosti IC₅₀ za anti-DPPH radikalsku aktivnost

5.1.1.6. Anti-ABTS radikalska aktivnost

Najveću anti-ABTS radikalsku aktivnost pokazali su MeOH i H₂O ekstrakt lignikolne vrste *B. adusta* (239,48 mg ekv. troloksa/g s.m), dok je najmanju sposobnost ispoljio PSH ekstrakt terikolne vrste *H. repandum I* ili *II* (25,55 mg ekv. troloksa/g s.m). Unutar vrsta postoji statistički značajna razlika između aktivnosti koje su ispoljili analizirani ekstrakti (Slika 31). Lignikolne vrste pokazale su veću sposobnost neutralizacije ABTS[•] u odnosu na

analizirane terikolne vrste, sa izuzetkom H₂O ekstrakta vrste *A. strobiliformis* čija je aktivnost približa vrednostima koje su dobijene kod lignikolnih vrsta.

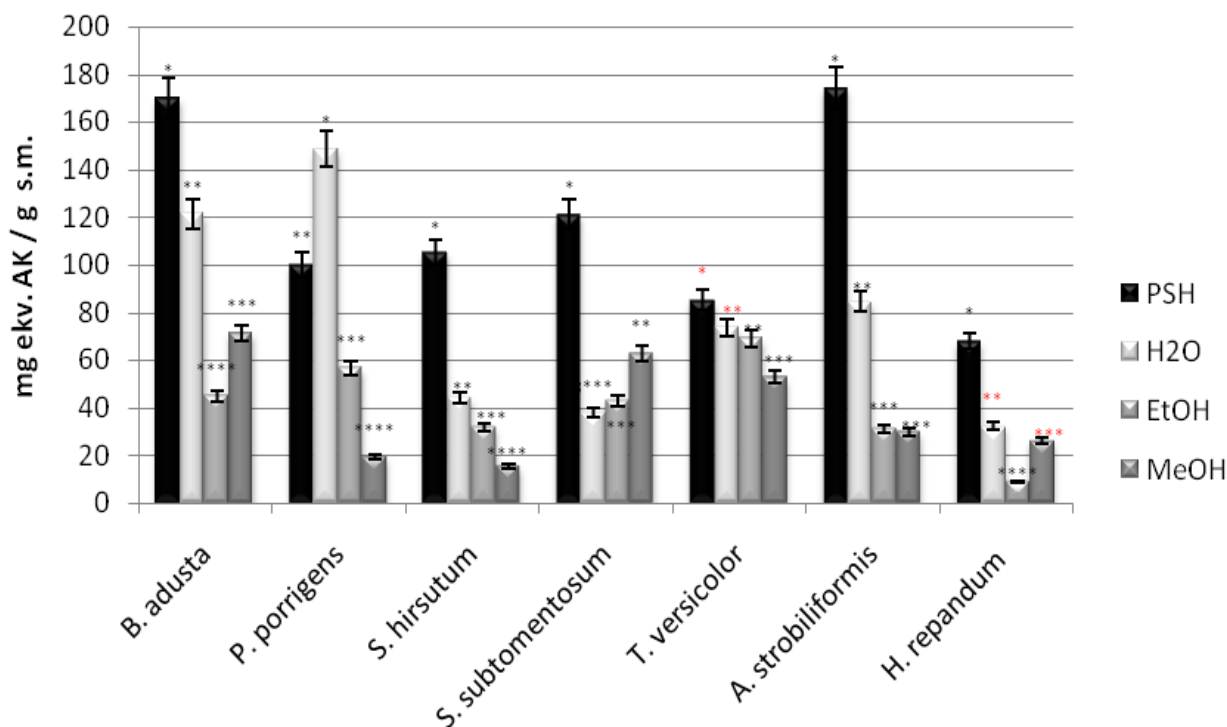


Slika 31. Uporedni prikaz vrednosti za anti-ABTS radikalsku aktivnost

5.1.2. Antioksidativna aktivnost gljiva

5.1.2.1. FRAP metoda

Posmatrajući uporedni prikaz srednjih vrednosti redukujucih sposobnosti ekstrakata analiziranih vrsta gljiva (Slika 31), može se primetiti da su PSH ekstrakti imali najjaču redukujucu sposobnost (sa izuzetkom vrste *P. porrigens* kod koje je napotentniji bio H₂O ekstrakt), zatim H₂O ekstrakti, dok su EtOH i MeOH ispoljili slabiji redukciona sposobnost. Najbolji redukcionni potencijal ispoljio je PSH ekstrakt vrste *A. strobiliformis* (174,11 mg ekv. AK/g s.m.) i PSH ekstrakt vrste *B. adusta* (170,02 mg ekv. AK/g s.m.). Najslabiji redukcionni potencijal ispoljio je MeOH ekstrakt vrste *S. hirsutum* (15, 43 mg ekv. AK/g s.m.). Značajna razlika u ispoljenim aktivnostima izmđu lignikolnih i terikolnih vrsta se ne uočava.



Slika 32. Uporedni prikaz redukcionne sposobnosti ekstrakata dobijene FRAP testom

Na osnovu dobijenih vrednosti primenom FRAP testa ispitivane vrste gljiva prema svojoj aktivnosti od najjače do najslabije mogu se prikazati na sledeći način:

MeOH ekstrakt: *B. adusta* (125,43 mg ekv. AK/g s.m.) > *S. hirsutum* (66,89 mg ekv. AK/g s.m.) > *S. subtomentosum* (62,77 mg ekv. AK/g s.m.) > *T. versicolor* (52,72 mg ekv. AK/g s.m.) > *A. strobiliformis* (29,75 mg ekv. AK/g s.m.) > *H. repandum* (26,92 mg ekv. AK/g s.m.) > *P. porrigens* (19,37 mg ekv. AK/g s.m.);

EtOH ekstrakt: *T. versicolor* (60,01 mg ekv. AK/g s.m.) > *P. porrigens* (56,49 mg ekv. AK/g s.m.) > *S. subtomentosum* (43,02 mg ekv. AK/g s.m.) > *B. adusta* (41,6 mg ekv. AK/g s.m.) > *S. hirsutum* (31,97 mg ekv. AK/g s.m.) > *A. strobiliformis* (31,28 mg ekv. AK/g s.m.) > *H. repandum* (8,81 mg ekv. AK/g s.m.);

H₂O ekstrakt: *P. porrigens* (152,03 mg ekv. AK/g s.m.) > *B. adusta* (121,48 mg ekv. AK/g s.o.) > *A. strobiliformis* (84,57 mg ekv. AK/g s.m.) > *T. versicolor* (73,74 mg ekv. AK/g s.m.) > *S.*

hirsutum (44,13 mg ekv. AK/g s.m.) > *S. subtomentosum* (37,72 mg ekv. AK/g s.m.) > *H. repandum* (1,51 mg ekv. AK/g s.m.);

PSH ekstrakt: *A. strobiliformis* > *B. adusta* > *S. subtomentosum* > *S. hirsutum* > *P. porrigens* > *T. versicolor* > *H. repandum*.

5.1.2.2. HPMC metoda

Na osnovu uporedne analize antioksidativne aktivnosti PSH, H₂O, EtOH i MeOH ekstrakata ispitivanih vrsta gljiva (**Slika 33**) može se uočiti da kod svih vrsta najveću aktivnost pokazuju MeOH ekstrakti. Izuzetak čini vrsta *A. strobiliformis* kod koje je najveću antioksidativnu aktivnost ispoljio H₂O ekstrakt, što je i najveća zabeležena aktivnost među svim vrstama ($787,06 \pm 39,35$ %/mL), dok je najslabiju ispoljio PSH ekstrakt vrste *S. hirsutum* ($3,04 \pm 0,20$ %/mL). Pored H₂O ekstrakta vrste *A. strobiliformis* po jakoj antioksidativnoj aktivnosti ističu se još i MeOH ekstrakti vrsta *B. adusta*, *S. subtomentosum* i *A. strobiliformis*, dok su PSH ispoljili znatno slabiju aktivnost u odnosu na sve analizirane ekstrakte. Naime, unutar svake vrste zabeležena je statistički značajna razlika u ispoljenoj aktivnosti između analiziranih ekstrakata (Tukey HSD, $p < 0,01$, $p < 0,05$). Razlika u ispoljenoj aktivnosti između lignikolnih vrsta sa jedne strane i terikolnih vrsta sa druge strane nije uočena.

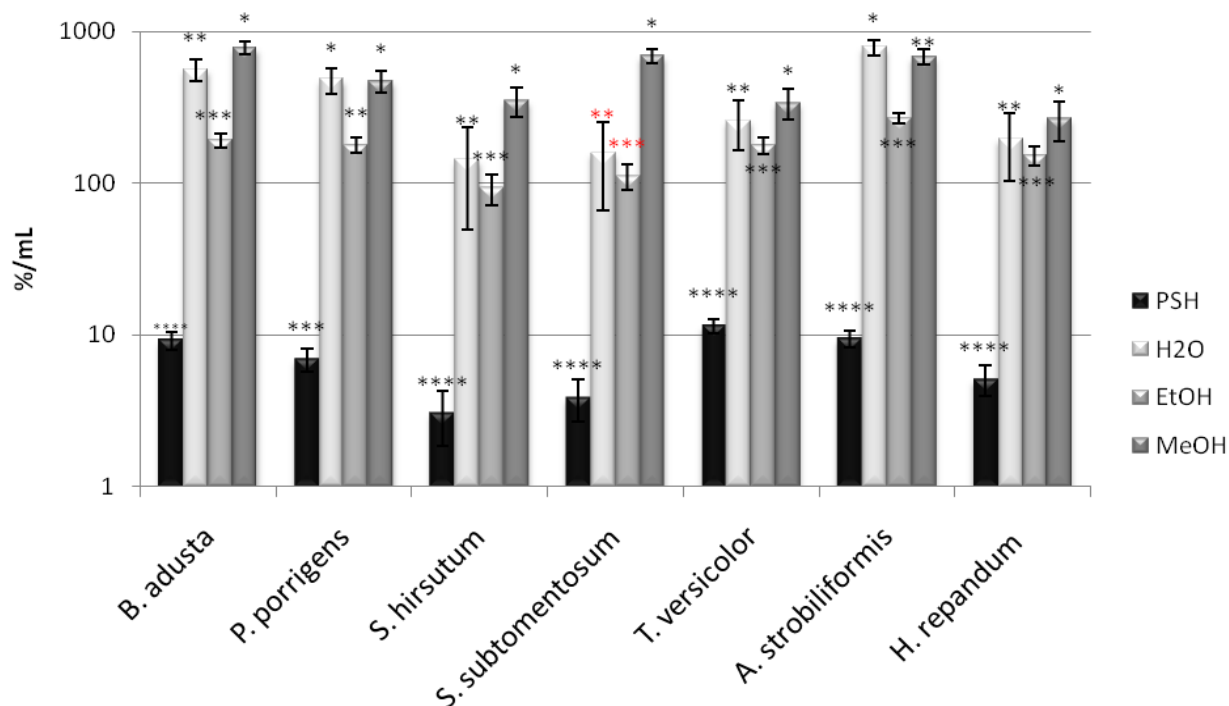
Na osnovu dobijenih rezultata za antioksidativnu aktivnost ekstrakata ispitivanih vrsta redosled prema jačini aktivnosti je sledeći:

Na osnovu dobijenih rezultata za antioksidativnu aktivnost ekstrakata ispitivanih vrsta redosled prema jačini aktivnosti je sledeći:

PSH ekstrakti: *T. versicolor* (11,45 %/mL) > *A. strobiliformis* (9,37 %/mL) > *B. adusta* (9,18 %/mL) > *P. porrigens* (6,92 %/mL) > *H. repandum* (5,10 %/mL) > *S. subtomentosum* (3,85 %/mL) > *S. hirsutum* (3,04 %/mL).

Na osnovu post hoc Tukey testa ($p < 0,01$) vrednost PSH ekstrakta *T. versicolor* se statistički značajno razlikuje od ostalih ekstrakata, vrednosti naredne dve vrste u nizu

statistički nisu značajne međusobno, kao ni razlike u dobijenim vrednostima između poslednje dve vrste u nizu.



Slika 33. Antioksidativna aktivnost dobijena polarografskom HPMC metodom

H₂O ekstrakti: *A. strobiliformis* (787 %/mL) > *B. adusta* (562 %/mL) > *P. porrigens* (483 %/mL) > *T. versicolor* (259 %/mL) > *H. repandum* (196 %/mL) > *S. subtomentosum* (159 %/mL) > *S. hirsutum* (142 %/mL).

Među ispitivanim H₂O ekstraktima postoje statistički značajne razlike na osnovu kojih se ekstrakti mogu svrstati u četiri grupe. Prvoj grupi pripada ekstrakt vrste *A. strobiliformis* koji je ispoljio najbolju aktivnost koja se statistički značajno razlikuje u odnosu na ostale ispitivane vrste. Drugu grupu čine vrste *B. adusta* i *P. porrigens*, treću *T. versicolor*, dok četvrtoj grupi pripadaju vrste *H. repandum*, *S. subtomentosum* i *S. hirsutum*, čiji su H₂O ekstrakti ispoljili najslabiju aktivnost. Između svih grupa nivo značajnosti je $p < 0,01$, dok je između vrednosti dobijenih za H₂O ekstrakt vrste *H. repandum* i *S. subtomentosum* razlike su na nivou značajnosti $p < 0,05$.

EtOH ekstrakti: *A. strobiliformis* (269 %/mL) > *B. adusta* (192 %/mL) > *P. porrigens* (179 %/mL) > *T. versicolor* (176 %/mL) > *H. repandum* (151 %/mL) > *S. subtomentosum* (112 %/mL) > *S. hirsutum* (93 %/mL)

Na osnovu statističke analize EtOH ekstrakti bi se prema sličnosti mogli svrstati u četiri grupe ($p < 0,01$). Prvu grupu čini ekstrakt vrste *A. strobiliformis* statistički značajno razlikujući se od ostalih, drugoj grupi pripadaju *B. adusta* i *P. porrigens*, *T. versicolor*, treću grupu čini vrste *H. repandum* koja se od vrste *T. versicolor* razlikuje na nivou $p < 0,05$ i četvrtu grupu čine vrste istog roda, *S. subtomentosum* i *S. hirsutum*.

MeOH ekstrakti: *B. adusta* (779 %/mL) > *S. subtomentosum* (690 %/mL) > *A. strobiliformis* (680 %/mL) > *P. porrigens* (473 %/mL) > *S. hirsutum* (348 %/mL) > *T. versicolor* (340 %/mL) > *H. repandum* (266 %/mL)

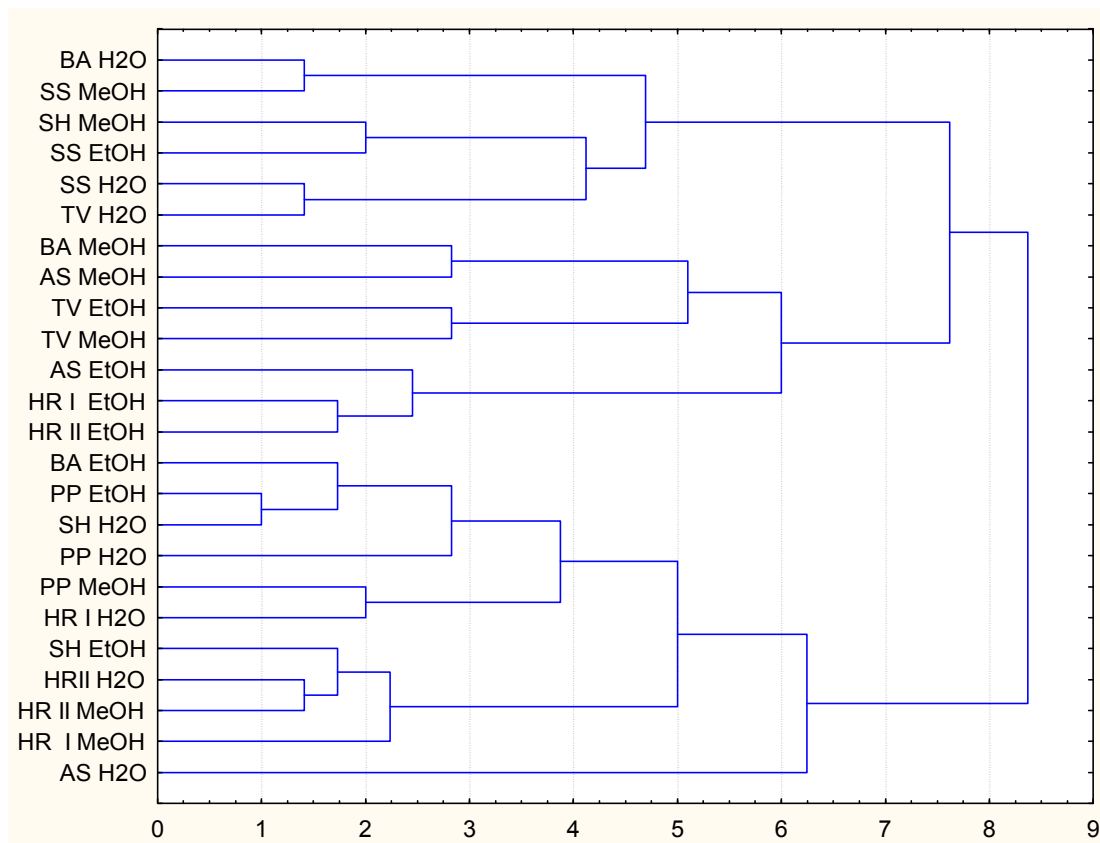
5.1.3. Klaster analiza dobijenih antiradikalnih i antioksidativnih vrednosti

Klaster analiza podataka, dobijenih primenom spektrofotometrijskih i HPMC polarografske analize, omogućila je grupisanje ekstrakata ispitivanih gljiva prema jačini antioksidativne aktivnosti (**Slika 34**). Na dendogramu se uočavaju dva odvojena klastera - Grupa I i Grupa II.

U Grupi I našli su se ekstrakti istog tipa rastvarača ili alkoholni ekstrakti, gde se izdvajaju sledeći parovi: H₂O ekstrakti *S. subtomentosum* i *T. versicolor*; MeOH ekstrakti *B. adusta* i *A. strobiliformis*; MeOH *S. hirsutum* i EtOH *S. subtomentosum* (koji pripadaju istom rodu *Stereum*); EtOH i MeOH iste vrste *T. versicolor*; EtOH ekstrakti vrste *H. repandum* I i II (ista vrsta sa različitim lokaliteta) kojima se u sledećem stepenu pripaja i EtOH ekstrakt vrste *A. strobiliformis*, gde sve tri vrste pripadaju ekološki istoj grupi terikolnih gljiva.

Grupi II čine ekstrakti istih vrsta ili vrsta sa istog staništa koji su ispoljili bolju ukupnu antioksidativnu aktivnost u odnosu na ekstrakte Grupe I, a izdvajaju se sledeći parovi: MeOH ekstrakt vrste *P. porrigens* i H₂O ekstrakt vrste *H. repandum* I (oba poreklom sa Mitrovca - Tara); H₂O i MeOH ekstrakt vrste *H. repandum* II. Ovoj grupi pripada i H₂O ekstrakt vrste *A. strobiliformis* koji je znatno udaljeniji od ostalih ekstrakata, što je rezultat veoma dobre aktivnosti prema četiri od šest primenjenih testova i najbolje ispoljene antioksidativne aktivnosti primenom HPMC testa.

Uzevši sve u obzir, možemo primetiti da su se prema ispoljenim aktivnostima grupisale vrste kako prema ekologiji (terikolne vs lignikolne), tako i prema staništu odnosno lokalitetu na kome su sakupljene. Zatim, primećujemo grupisanost ekstrakata na osnovu tipa rastvarača iz čega proističe da su za ispoljene slične aktivnosti odgovorna jedinjenja iste polarnosti.



Slika 34. Dendrogram sa grupama ekstrakata gljiva prema antioksidativnoj aktivnosti, dobijen na osnovu klaster analize podataka svih primenjenih metoda

5.1.4. Antimikrobna aktivnost

5.1.4.1. Antibakterijska aktivnost

Antibakterijska aktivnost ekstrakata gljiva određivana je prema pet Gram-pozitivnih (*B. subtilis* - ATCC 6633, *E. faecalis* - ATCC 19433 i *S. aureus* - ATCC 6538, I i II) i osam Gram-negativnih bakterije (*E. coli* - ATCC 11229, I i II, *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 35554 i *P. aeruginosa* I, *S. enteritidis* - ATCC 13076, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*) (Tabela 2). Testirani su EtOH i MeOH ekstrakti 6 analiziranih vrsta gljiva (*B. adusta*, *S. hirsutum*, *S. subtomentosum*, *T. versicolor*, *A. strobiliformis* i *H. repandum*). Njihova aktivnost upoređena je kako međusobno, tako i spram konvencionalnih antibiotika (ampicilin, tetraciklin, streptomycin, kanamicin i hloramfenikol).

Od ukupno 12 ispitivanih MeOH i EtOH ekstrakata, MeOH ekstrakti svih analiziranih gljiva (lignikolne - *B. adusta*, *S. hirsutum*, *S. subtomentosum* i *T. versicolor*, kao i terikolne - *A. strobiliformis* i *H. repandum*) pokazali su antibakterijsku aktivnost, dok se među EtOH ekstraktima izdvajaju ekstrakti samo dve vrste - *A. strobiliformis* i *H. repandum*, obe terikolne, koji su pokazali značajnu aktivnost prema testiranim sojevima (Tabela 4).

Dakle, kod svih analiziranih vrsta MeOH ekstrakti su pokazali bolju antibakterijsku aktivnost u odnosu na EtOH ekstrakte, sem kod vrste *H. repandum* gde je bolju aktivnost ispoljio EtOH ekstrakt, koji se ujedno pokazao i kao ekstrakt sa najboljom antibakterijskom aktivnošću.

Takođe, bolju antibakterijsku aktivnost ekstrakti su ispoljili prema Gram-pozitivnim bakterijama u odnosu na Gram-negativne sojeve.

Tabela 4. Vrednosti MIC i MBC analiziranih MeOH i EtOH ekstrakata gljiva na odabrane bakterijske sojeve (mg/mL)

Bakterijski soj	<i>B. adusta</i>		<i>S. hirsutum</i>		<i>S. subtomentosum</i>		<i>T. versicolor</i>		<i>A. strobiliformis</i>		<i>H. repandum</i>	
	MeOH MIC/MBC	EtOH MIC/MBC	MeOH MIC/MBC	EtOH MIC/MBC	MeOH MIC/MBC	EtOH MIC/MBC	MeOH MIC/MBC	EtOH MIC/MBC	MeOH MIC/MBC	EtOH MIC/MBC	MeOH MIC/MBC	EtOH MIC/MBC
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	>20	–	5/20	–	1,25/1,25	–	>20	–	20/20	–	–	1,25/2,50
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	–	–	–	–	>20	–	–	–	–	20/20	10/20	5/10
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	>20	–	>20	–	>20	–	>20	–	–	–	10/10	1,25/2,50
<i>S. aureus</i> I	5/5	–	–	–	–	–	10/10	–	–	–	–	–
<i>S. aureus</i> II	10/10	–	–	–	–	–	10/10	–	–	–	–	–
<i>E. coli</i> ATCC 11229	>20	–	>20	–	–	–	>20	–	–	–	–	20/20
<i>E. coli</i> I	>20	–	–	–	–	–	20/20	–	–	–	–	–
<i>E. coli</i> II	>20	–	–	–	–	–	20/20	–	–	–	–	–
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 35554	–	–	–	>20	1,25/1,25	>20	–	–	–	–	1,25/1,25	5/5
<i>P. aeruginosa</i> I	20/20	–	–	–	–	–	10/10	–	–	–	–	–
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	–	–	–	–	>20	–	–	–	>20	>20	>20	20/20
<i>P. mirabilis</i>	20/20	–	–	–	–	–	10/10	–	–	–	–	–
<i>P. vulgaris</i>	>20	–	–	–	–	–	>20	–	–	–	–	–

*MIC, minimalna inhibitorna koncentracija, MBC, minimalna baktericidna koncentracija, vrednosti su izražene u jedinicama mg/mL i predstavljaju aritmetičku sredinu vrednosti dobijenih u najmanje dva nezavisna ponavljanja; MeOH - metanolni ekstrakt; EtOH - etanolni ekstrakt; >20 - vrednost iznad ispitivane koncentracije; „–“ - vrednost nije određena

Kod vrste **B. adusta** zabeležena je antibakterijska aktivnost MeOH ekstrakata prema četiri humana patogena izolata, i to dva Gram-pozitivna (*S. aureus* I i II) i dva Gram-negativna (*P. aeruginosa* i *P. mirabilis*).

MeOH ekstrakt **S. hirsutum** ispoljio je aktivnost prema samo jednom soju, konkretno *B. subtilis* (MIC/MBC 5/20 mg/mL), dok EtOH ekstrakt nije ispoljio antibakterijsku aktivnost.

MeOH ekstrakt vrste **S. subtomentosum** ispoljio je veoma dobru antibakterijsku aktivnost prema jednom Gram-pozitivnom (*B. subtilis* ATCC 6633) i jednom Gram-negativnom (*P. aeruginosa* ATCC 35554) soju sa vrednostima MIC/MBC na 1,25 mg/mL, dok EtOH ekstrakt nije ispoljio aktivnost.

Analizirani MeOH ekstrakt **T. versicolor** ispoljio je antibakterijsku aktivnost prema 6 patogenih humanih izolata (*S. aureus* I i II, *E. coli* I i II, *P. aeruginosa* i *P. mirabilis*) pri koncentracijama od 10 i 20 mg/mL.

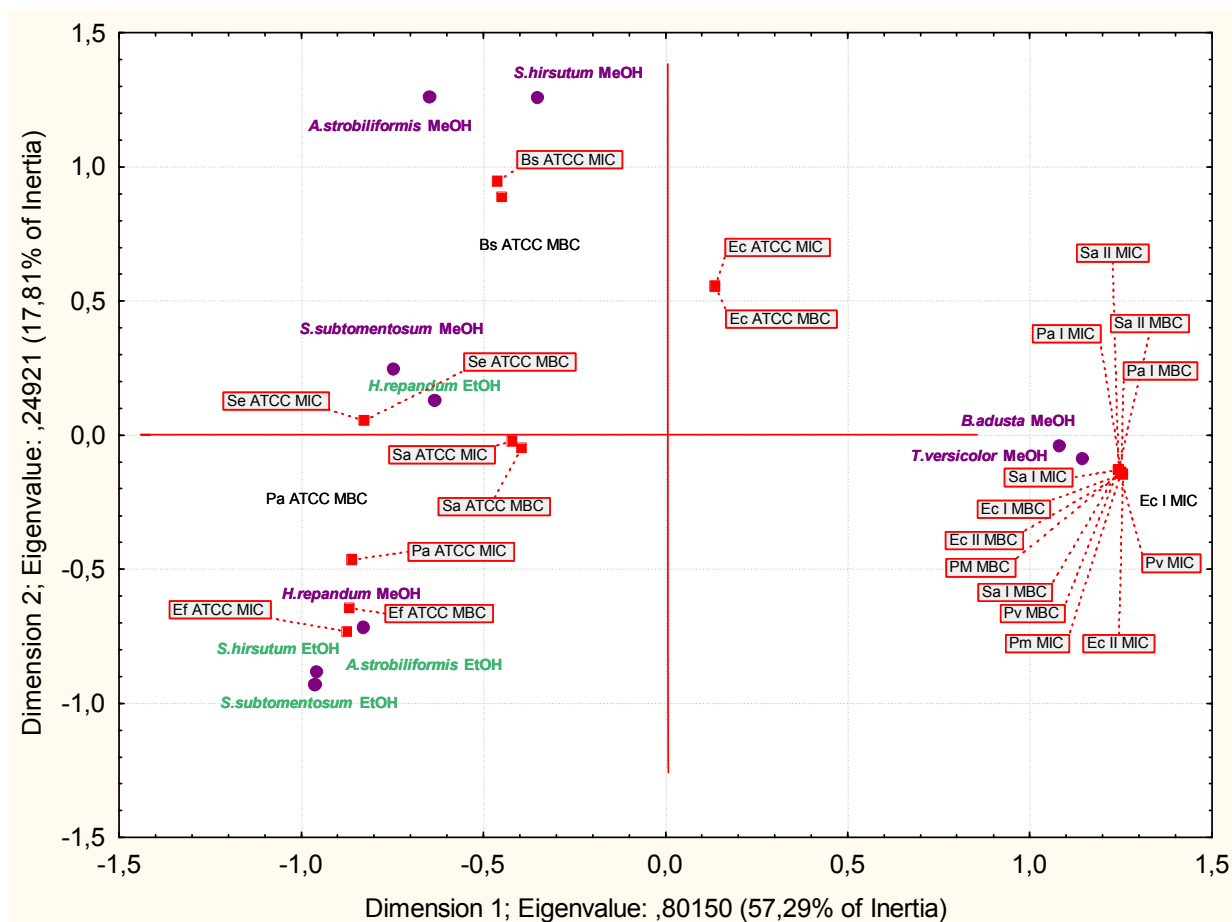
Oba analizirana ekstrakta vrste **A. strobiliformis** su ispoljila aktivnost prema Gram-pozitivnim sojevima i to MeOH prema *B. subtilis* a EtOH prema *E. faecalis*, pri najvišim testiranim koncentracijama (MIC/MBC - 20/20 mg/mL).

Oba ekstrakta vrste **H. repandum** (MeOH i EtOH) ispoljila su dobru antibakterijsku aktivnost. Naime, EtOH ekstrakt pokazao se kao najpotentniji od svih ispitivanih ekstrakata jer je aktivnost pokazao prema šest od ukupno dvanaest testiranih bakterijskih sojeva. Najosetljiviji sojevi prema pomenutom ekstraktu bili su *B. subtilis* i *S. aureus* (MIC 1,25 mg/mL), zatim *E. faecalis* i *P. aeruginosa* (MIC - 5,00 mg/mL).

Radi lakšeg sagledavanja dobijenih rezultata, urađena je statistička multivarijantna korespondentna analiza na osnovu dobijenih vrednosti MIC i MBC za sve ekstrakte analiziranih gljiva (**Slika 35**). Parametrijska analiza ukazuje na asociranost centriola u prostoru prve dve korespondentne ose. Centriole su raspoređene kako u pozitivnoj tako i u negativnoj zoni osa, pri čemu se uočava određena grupisanost. Kao poseban oblik asociranosti izdvajaju se sledeće grupe (**Slika 35**):

- 1) EtOH ekstrakt vrste *H. repandum* i MeOH ekstrakti vrsta *S. hirsutum*, *S. subtomentosum* i *A. strobiliformis* (pozitivna zona prve i negativna zona druge ose) na čije je grupisanje uticala najbolje ispoljene aktivnosti na soj *B. subtilis* ATCC 6633;
- 2) MeOH ekstrakt vrste *H. repandum* i EtOH ekstrakti vrste *S. hirsutum*, *S. subtomentosum* i *A. strobiliformis* (negativna zona prve i negativna zona druge ose), kao rezultat najbolje ispoljene antibakterijske aktivnosti. Aktivnost je ispoljena na 6 od 13 analiziranih bakterijskih sojeva, pri tom delujući na *B. subtilis* i *P. aeruginosa* pri najnižim ispitivanim koncentracijama (1,25 i 2,5 mg/mL);

3) MeOH ekstrakti vrsta *B. adusta* i *T. versicolor* (negativna zona prve i pozitivna zona druge ose), čije je izdvajanje rezultat antibakterijskog delovanja na 5 odnosno 6 ispitivanih sojeva, među kojim i na humane izolate *S. aureus* I i II, *E. coli* I i II, *P. aeruginosa*.



Slika 35. Pozicije centriola ekstrakata ispitivanih gljiva na osnovu dobijenih vrednost MIC i MBC protiv bakterijskih sojeva

5.1.4.2. Antibiotiska rezistencija

Primenom mikrodilucione metode (CLSI, 2007) određena je vrednost MIC konvencionalnih antibiotika (**Tabela 7**).

Od pet testiranih antibiotika, hloramfenikol je pokazao najveću antibakterijsku aktivnost, jer nijedna od ispitivanih bakterijskih kultura nije ispoljila rezistentnost. Vrednosti MIC pri kojima je delovao na sve bakterijske kulture iznosila je 0,06 mg/mL, izuzev kod Gram-negativne bakterije *P. aeruginosa* ^{ATCC 35554} gde je ispoljena vrednost MIC iznosila 0,12 mg/mL. Ampicilin je na sve analizirane ATCC sojev e delovao pri koncentraciji MIC - 0,06 mg/mL, dok su humani izolati *S. aureus* II i *P. aeruginosa* ^{ATCC 35554} ispoljili rezistentnost. Na

streptomycin bakterija *P. aeruginosa* ATCC 35554 ispoljila je rezistentnost, dok je na ostale sojeve streptomycin delovao pri koncentraciji od 0,06 mg/mL, odnosno 0,12 mg/mL na *E. faecalis*. Kanamicin je na sve ispitivane sojeve delovao pri koncentraciji od 0,06 mg/mL, dok se *P. aeruginosa* ATCC 35554 pokazala rezistentnom. Tetraciklin, koji je primenjen na humane izolate, ispoljio je aktivnost na sva tri izolata *S. aureus* I i II i *P. mirabilis*, pri koncentracijama od 0,06 i 0,128 mg/mL.

Na testirane bakterijske kulture jače su delovali ispitivani antibiotici u odnosu na ekstrakte gljiva, sem na Gram-negativnu bakteriju *P. aeruginosa*, koja je na većinu antibiotika pokazala rezistentnost, dok su na pomenutu bakteriju delovali MeOH ekstrakt *S. subtomentosum* kao i MeOH i EtOH ekstrakti vrste *H. repandum*.

Tabela 5. Vrednosti MIC testiranih antibiotika (mg/mL)

Bakterijski soj	Antibiotici (mg/mL)				
	Ampicilin	Streptomycin	Tetraciklin	Kanamicin	Hloramfenikol
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0,06	0,06	n.t.	0,06	0,06
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	0,06	0,12	n.t.	0,06	0,06
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0,06	0,06	n.t.	0,06	0,06
<i>S. aureus</i> I	0,128	n.t.	0,06	n.t.	n.t.
<i>S. aureus</i> II	R	n.t.	0,128	n.t.	n.t.
<i>E. coli</i> ATCC 11229	0,06	0,06	n.t.	0,06	0,06
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 35554	R	R	n.t.	R	0,12
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	0,06	0,06	n.t.	0,06	0,06
<i>P. mirabilis</i>	0,128	n.t.	0,128	n.t.	n.t.

R - rezistentan; n.t. - nije testirano

5.1.4.3. Antifungalna aktivnost

Antifungalna aktivnost ekstrakata gljiva je određena prema tri soja *C. albicans* (jedan atestirani soj i dva humana izolata) i pet izolata fitopatogenih plesni.

Prema izolatima *C. albicans* ni jedan od ispitivanih ekstrakata nije ispoljio aktivnost. Kada su u pitanju aktivnosti prema plesnima (**Tabela 6**), najsnažnije antifungalno dejstvo na sve ispitivane fitopatogene izolate pokazao je EtOH ekstrakt vrste *H. repandum* (MIC 24,75 mg/mL; MFC 24,75 - 49,50 mg/mL). S druge strane, MeOH ekstrakt ove vrste ispoljio je aktivnost isključivo na vrstu *A. padwickii* (MIC 24,75 mg/mL).

Pored etanolnog ekstrakta *H. repandum*, antifungalno dejstvo na sve fitopatogene izolate imao je još samo MeOH ekstrakti vrste *S. subtomentosum* (MIC 49,50-99 mg/mL; MFC 49,50 - 99 mg/ml). MeOH ekstrakt vrste *B. adusta* delovao je isključivo na gljive roda *Fusarium* (MIC 24,75 - 99 i MFC 24,75 - 99 mg/mL), dok su MeOH ekstrakt vrste *T. versicolor* i EtOH ekstrakt *A. strobiliformis* pokazali antifungalnu aktivnost isključivo prema

fitopatogenom izolatu *A. padwickii*. Samo u slučaju MeOH ekstrakta vrste *A. strobiliformis* nije detektovana antifungalna aktivnost ni na jedan ispitivani izolat fitopatogena.

Antifungalnu aktivnost na sve ispitivane fitopatogene gljive pokazao je i MeOH ekstrakt vrste *S. subtomentosum*, ali je ona detektovana na većim koncentracijama.

MeOH ekstrakt vrste *B. adusta* pokazao je dobru antifungalnu aktivnost na gljive roda *Fusarium* (MIC 24,75 - 99 i MFC 24,75 - 99 mg/mL), dok na vrstu *A. padwickii* nije ispoljio aktivnost.

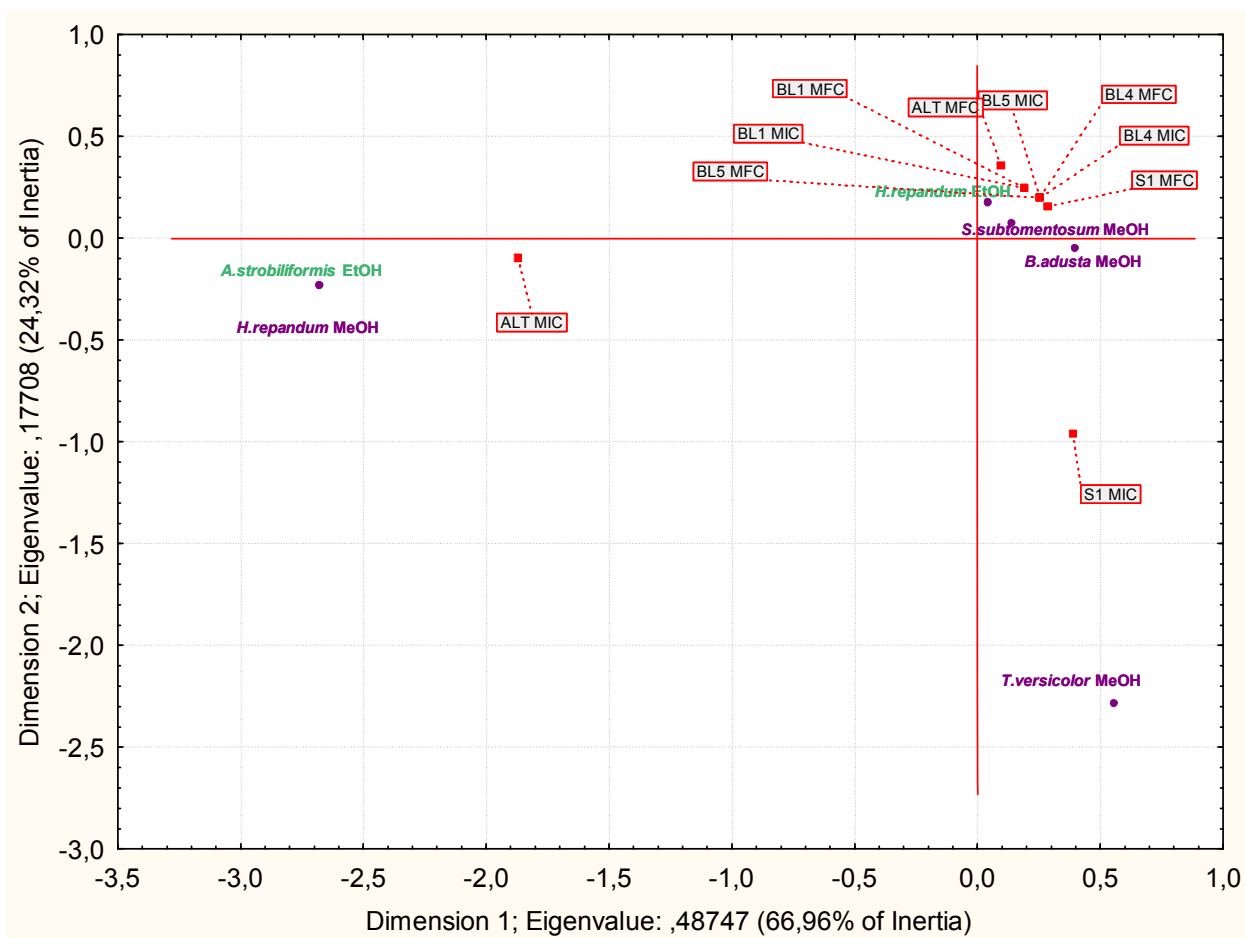
Za ekstrakte koji nisu imali dejstvo na fitopatogene gljive roda *Fusarium*, za vrstu *A. padwickii* detektovane su sledeće vrednosti MIC: 24,75 mg/mL kod MeOH ekstrakata vrste *H. repandum*; pri 49,5 mg/mL kod MeOH ekstrakta vrste *T. versicolor*; pri 99 mg/mL kod EtOH ekstrakta vrste *A. strobiliformis*.

Takođe, dobru antifungalnu aktivnost pokazao je i MeOH ekstrakt vrste *T. versicolor* (MIC 49,50 mg/mL) dok su ostali ispitivani ekstrakti makrogljiva ispoljili ujednačeno, slabije dejstvo (MIC/MFC 99 mg/mL). MeOH ekstrakt vrste *B. adusta* koji je pokazao dobru antifungalnu aktivnost na fitopatogene gljive roda *Fusarium* nije imao efekat na *A. padwickii*. Takođe bez efekta je bio i MeOH ekstrakt vrste *A. strobiliformis*.

Parametrijska analiza primenjena je i za predstavljanje i sagledavanje ispoljene antifungalne aktivnosti ekstrakata na osnovu dobijenih MIC i MFC vrednosti prema ispitivanim fitopatogenim izolatima (**Slika 36**).

Na osnovu pozicija centriola uočavamo asociranost ispitivanih ekstrakata u tri posebne grupe:

- 1) MeOH ekstrakt *S. subtomentosum* i EtOH ekstrakt *H. repandum* u pozitivnoj zoni prve i pozitivnoj zoni druge ose kao rezultat delovanja na sve ispitivane fitopatogene gljive;
- 2) MeOH ekstrakti vrsta *B. adusta* i *T. versicolor* delujući protiv *F. graminearum*. Međutim, primećuje se i njihova velika udaljenost (u okviru iste zone), odnosno približavanje MeOH ekstrakta vrste *B. adusta* prvoj grupi usled delovanja i na ostale izolate roda *Fusarium*.
- 3) EtOH ekstrakt vrste *A. strobiliformis* i MeOH ekstrakt vrste *H. repandum* u negativnoj zoni prve i negativnoj zoni druge ose usled ispoljene aktivnosti prema samo jednoj plesni - *A. padwickii*;



Slika 36. Pozicije centriola ekstrakata ispitivanih gljiva na osnovu dobijenih vrednosti MIC i MFC protiv fitopatogenih gljiva

Tabela 6. Vrednosti MIC i MFC analiziranih ekstrakata gljiva na analizirane fitopatogene gljive (mg/mL)

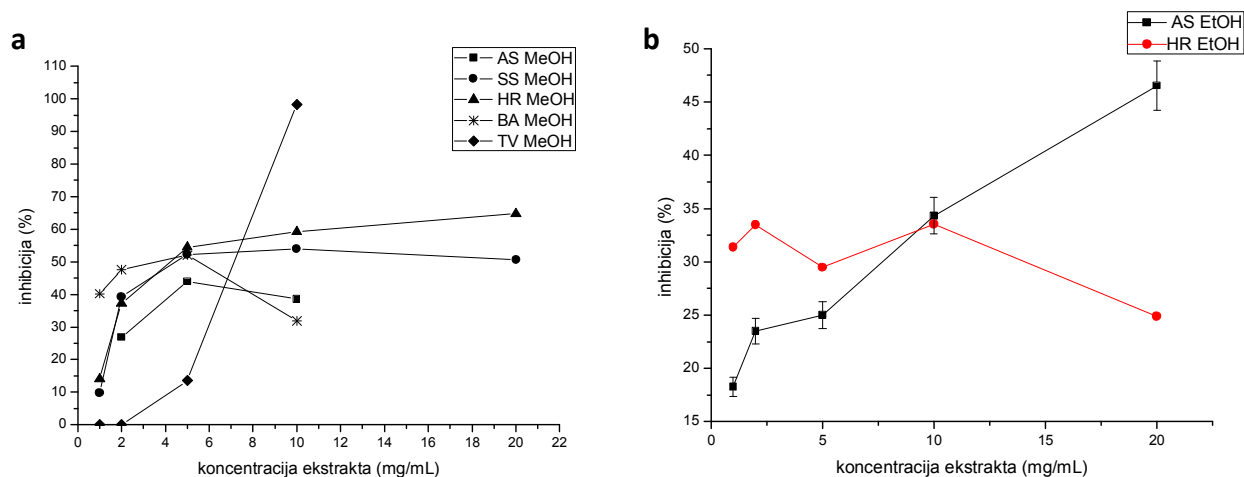
Ekstrakti gljiva Plesni	<i>B. adusta</i>		<i>S. subtomentosum</i>		<i>T. versicolor</i>		<i>A. strobiliformis</i>		<i>H. repandum</i>	
	MeOH MIC/MBC	EtOH MIC/MBC	MeOH MIC/MBC	EtOH MIC/MBC	MeOH MIC/MBC	EtOH MIC/MBC	MeOH MIC/MBC	EtOH MIC/MBC	MeOH MIC/MBC	EtOH MIC/MBC
<i>F. proliferatum</i> (BL1)	99/99	–	49,95/49,95	–	–	–	–	–	–	24,75/24,75
<i>F. verticillioides</i> (BL4)	49,95/49,95	–	99/99	–	–	–	–	–	–	24,75/24,75
<i>F. proliferatum</i> (BL5)	49,95/49,95	–	99/99	–	–	–	–	–	–	24,75/24,75
<i>F. graminearum</i> (S1)	24,75/24,75	–	49,95/49,95	–	49,95/–	–	–	–	–	24,75/24,75
<i>A. padwickii</i> (ALT)	–/–	–	99/99	–	–	–	–	99/–	24,75/–	24,75/49,95

“–”, - vrednost nije određena u opsegu ispitivanih koncentracija

5.1.4.4. Antivirusna aktivnost

Antivirusna aktivnost ekstrakata ispitana je na fagu vB_BbrS_LK3 iz familije *Siphoviridae*, čiji je domaćin *Bordatella bronchiseptica* ATCC 10580.

Testirani su H₂O, EtOH i MeOH ekstrakti pri koncentracijama u rasponu od 10 do 200 mg/mL. Generalno, analizirani ekstrakti gjiva ispoljili su slabu antiviralnu aktivnost, sa izuzetkom MeOH ekstrakta vrste *T. versicolor*, koji je pri najvišoj testiranoj koncentraciji (10 mg/mL) ispoljio visok procenat inhibicije faga (98,31±0,6 %). Pri najvišim testiranim koncentracijama (20 mg/mL), određeni stepen inhibicije pokazali su još i MeOH ekstrakt vrste *S. subtomentosum* (50,68±7,66 %) i EtOH ekstrakt vrste *A. strobiliformis* (46,54±5,87 %), dok je EtOH ekstrakt vrste *H. repandum* imao slab efekat na inhibiciju faga (24,87±3,06 %). Primenjeni H₂O ekstrakti nisu ispoljili antiviralnu aktivnost. Na osnovu grafikona uočavamo da su ekstrakti ispoljili doznu zavisnost (**Slika 37 a i b**).



Slika 37. Antivirusna aktivnost a) MeOH ekstrakata; b) EtOH ekstrakata

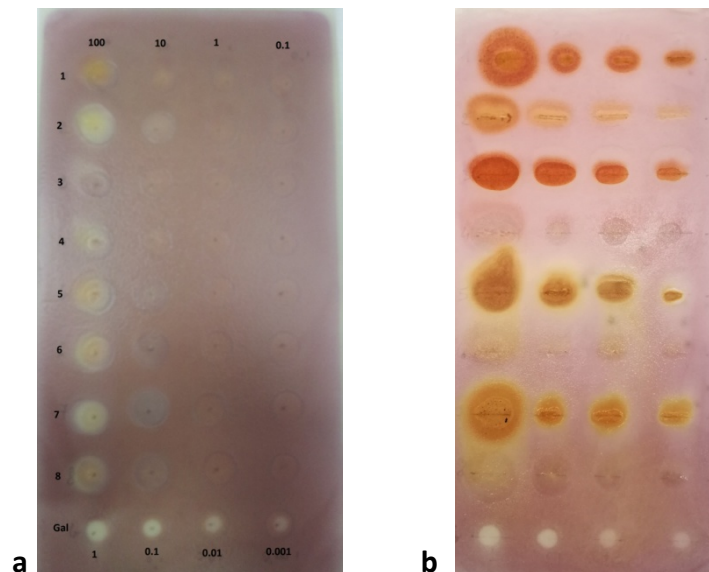
5.1.5. Anti-acetilholinesterazna aktivnost

Anti-acetilholinesterazna aktivnost određena je pomoću dve metode *in solid* i *in liquid*.

5.1.4.1. Inhibicija AChE *in solid*

Na osnovu rezultata dobijenih *in solid* utvrđena je aktivnost H₂O i MeOH ekstrakata ispitivanih vrsta gljiva (**Slika 38a i b, Tabela 7**). Na osnovu dobijenih prosvetljenih zona na pločama uočavamo aktivnost H₂O ekstrakta vrste *T. versicolor* pri 10 µg, što je ujedno i najbolja postignuta aktivnost za ispitivane uzorke *in solid*. Takođe, aktivnost su ispoljili H₂O i MeOH ekstrakti vrsta *H. repandum* i *P. porrigens* postigavši inhibiciju pri 100 µg (**Slika 36a**).

H₂O ekstrakti vrsta *S. subtomentosum* i *A. strobiliformis* su ispoljili aktivnost pri koncentraciji od 10 mg/mL. Za ostale ispitivane ekstrakte nije uočena inhibitorna sposobnost AChE.



Slika 38. *In solid* aktivnost inhibicije AChE odabranih ekstrakata analiziranih vrsta gljiva
 (A) 1 - H₂O ekstrakt *B. adusta*; 2 - H₂O ekstrakt *T. versicolor*; 3 - H₂O ekstrakt vrste *H. repandum*; 4 - H₂O ekstrakt vrste *P. porrigens*; 5 - MeOH ekstrakt vrste *B. adusta*; 6 - MeOH ekstrakt vrste *T. versicolor*; 7 - MeOH ekstrakt vrste *H. repandum*; 8 - MeOH ekstrakt vrste *P. porrigens*
 (B) 1 - MeOH ekstrakt vrste *S. hirsutum*; 2 - H₂O ekstrakt vrste *S. hirsutum*; 3 - MeOH ekstrakt vrste *S. subtomentosum*; 4 - H₂O ekstrakt vrste *S. subtomentosum*; 5 - MeOH ekstrakt vrste *A. strobiliformis*; 6 - H₂O ekstrakt vrste *A. strobiliformis*

5.1.4.2. Inhibicija AChE *in liquid*

Na osnovu dobijenih *in vitro* rezultata aktivnosti H₂O, EtOH i MeOH ekstrakata % inhibicije AChE kretao se u opsegu od 8,56 % do čak 98,44 %.

Generalno, EtOH ekstrakti su ispoljili najbolju aktivnost inhibicije AChE, sem kod vrste *P. porrigens* gde se kao najbolji inhibitor AChE pokazao MeOH ekstrakt, dok su PSH ekstrakti bili najslabiji inhibitori AChE (**Tabela 7**). Kao najpotentniji inhibitori enzima AChE izdvojili su se sledeći ekstrakti: EtOH ekstrakt vrste *S. hirsutum* sa izuzetno visokim procentom inhibicije od 98,44 %, EtOH ekstrakt vrste *B. adusta* sa 93,95 %, kao i EtOH ekstrakt vrste *S. subtomentosum* koji je ispoljio inhibiciju AChE sa čak 86,23 %.

Tabela 7. Anti-acetilholinesterazna aktivnost

Vrsta gljive	Tip ekstrakta	inhibicija AChE	
		<i>in solid</i> (mg)	* <i>in liquid</i> (%)
<i>Bjerkandera adusta</i>	PSH	n.t.	8,83±0,25 ^c
	H ₂ O	n.d.	16,46±0,44 ^b
	EtOH	n.t.	93,95±4,69 ^a
	MeOH	n.d.	n.d.
<i>Pleurocybella porrigens</i>	PSH	n.t.	14,63±0,73 ^d
	H ₂ O	0,1	29,16±0,43 ^c
	EtOH	n.t.	54,98±2,75 ^b
	MeOH	0,1	73,61±3,68 ^a
<i>Stereum hirsutum</i>	PSH	n.t.	10,51±0,52 ^d
	H ₂ O	0,1	21,38±0,43 ^c
	EtOH	n.t.	98,44±4,92 ^a
	MeOH	n.d.	55,89±2,79 ^b
<i>Stereum subtomentosum</i>	PSH	n.t.	17,69±0,88 ^b
	H ₂ O	10	n.d.
	EtOH	n.t.	86,23±4,31 ^a
	MeOH	n.d.	n.d.
<i>Trametes versicolor</i>	PSH	n.t.	36,87±1,84 ^c
	H ₂ O	0,01	60,63±2,90 ^a
	EtOH	n.t.	44,16±2,03 ^b
	MeOH	n.d.	n.d.
<i>Amanita strobiliformis</i>	PSH	n.t.	19,35±0,97 ^b
	H ₂ O	10	11,09±0,45 ^c
	EtOH	n.t.	42,33±2,12 ^a
	MeOH	n.d.	n.d.
<i>Hydnum repandum</i>	PSH	n.t.	21,49±1,07 ^d
	H ₂ O	0,1	40,44±0,52 ^c
	EtOH	n.t.	71,72±3,59 ^a
	MeOH	0,1	60,39±3,02 ^b
Galantamin		0,001	n.t.
Donepezil		n.t.	98,25±1,15

n.d. - nije detektovano; n.t. - nije testirano; *procenat inhibicije pri koncentraciji od 500 µg/mL
^{a,b,c,d} vrednosti označene različitim slovima okviru iste vrste statistički se značajno razlikuju
(Tukey HSD test, $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

5.1.6. Citotoksična aktivnost

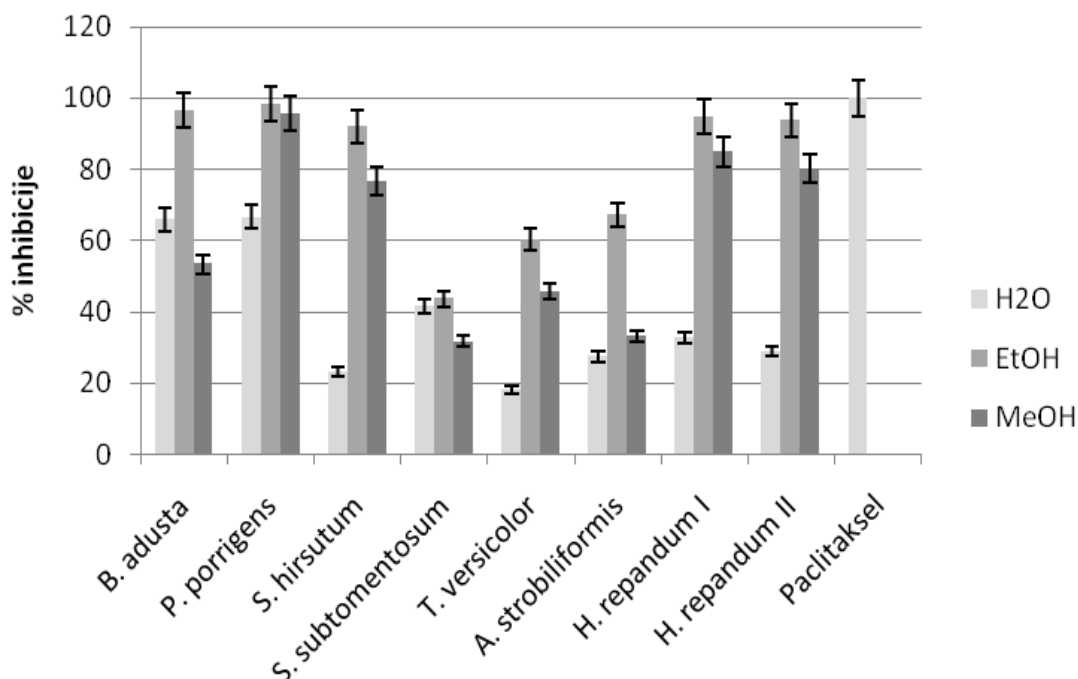
Većina analiziranih ekstrakata odabranih vrsta gljiva ispoljila je citotoksičnu aktivnost (**Tabela 8**). Međutim, stepen aktivnosti zavisio je kako od analizirane vrste gljive, tako i od samog ekstrakcionog sredstva (H₂O, EtOH, MeOH), ali i primenjene koncentracije ekstrakta (33,3 - 900 µg/mL).

Razlika u ispoljenoj aktivnosti zavisila je takođe i od vremena inkubacije (24 h i 72 h). Naime, već nakon 24 h većina ekstrakata je ispoljila citotoksičnost (tzv. subakutnu citotoksičnost) (Xia i sar., 2008), osim nekih H₂O ekstrakata i dva MeOH (**Tabela 8**) pri čemu je uočena i koncentracijska zavisnost. Najbolju aktivnost ispoljio je H₂O ekstrakt vrste *B. adusta* (IC₅₀ 81,93±4,10 µg/mL).

Međutim, statistički značajno bolje aktivnosti ekstrakti su ispoljili nakon 72 h inkubacije što ukazuje na hroničnu citotoksičnost ispitivanih ekstrakata (Xia i sar., 2008). Izuzetak čine EtOH ekstrakti vrsta *P. porrigens* i *T. versicolor*, kao i MeOH ekstrakt *S. hirsutum* koji su ispoljili neznatnu razliku u aktivnosti u odnosu na vreme inkubacije. Najbolju aktivnost nakon 72 h ispoljio je MeOH ekstrakt vrste *P. porrigens* (IC₅₀ 63,31±3,16 µg/mL), a zatim i H₂O ekstrakt vrste *B. adusta* (IC₅₀ 70,86±3,54 µg/mL).

Važno je izdvojiti vrste čiji su EtOH i MeOH ekstrakti ispoljili citotoksičnost preko 80 %, a to su: *P. porrigens*, *B. adusta* i *H. repandum* I i II. Ovi rezultati ukazuju na značaj EtOH i MeOH ekstrakata ispitivanih gljiva koji su dostigli % inhibicije koji je sličan ispoljenom efektu hemoterapeutskog antitumorskog leka (paklitaksel).

Svi ispitivani ekstrakti su ispoljili koncentracijsku zavisnost, u smislu da su pri najvišim primenjenim koncentracijama postigli i najveći stepen citotoksičnosti. Konkretno najveći % inhibicije ispoljili su pri najvišim testiranim koncentracijama (900 µg/mL) (**Slika 39**).



Slika 39. Uporedni prikaz antiproliferativne aktivnosti ekstrakata (pri najvišoj testiranoj koncentraciji - 900 µg/mL)

Tabela 8. Citotoksična aktivnost ekstrakata (nakon 24 h i 72 h inkubacije)

Vrsta gljive	Tip ekstrakta	IC ₅₀ (µg/mL)	
		24 h	72 h
<i>B. adusta</i>	H ₂ O	81,93±4,10 ^{b*}	70,86±3,54 ^{a*}
	EtOH	135,49±6,77 ^b	72,94±3,65 ^a
	MeOH	432,44±21,62 ^b	270,13±13,51 ^a
<i>P. porrigens</i>	H ₂ O	517,69±25,88 ^b	200,13±10,00 ^a
	EtOH	262,49±13,12 ^a	266,80±13,34 ^a
	MeOH	233,31±11,66 ^b	63,31±3,16 ^a
<i>S. hirsutum</i>	H ₂ O	n.d.	741,09±37,05
	EtOH	781,27±39,06 ^b	632,67±31,63 ^a
	MeOH	744,46±37,22 ^a	744,94±37,25 ^a
<i>S. subtomentosum</i>	H ₂ O	n.d.	n.d.
	EtOH	782,74±39,14	n.d.
	MeOH	n.d.	831,82±41,59
<i>T. versicolor</i>	H ₂ O	n.d.	830,43±41,52
	EtOH	123,51±6,17 ^a	151,84±7,59 ^a
	MeOH	456,93±22,85 ^a	340,29±17,01 ^b
<i>A. strobiliformis</i>	H ₂ O	n.d.	720,97±36,05
	EtOH	623,93±31,20 ^a	395,02±19,75 ^b
	MeOH	n.d.	n.d.
<i>H. repandum</i> I	H ₂ O	n.d.	720,97±36,05
	EtOH	250,71±12,53 ^b	192,50±9,62 ^a
	MeOH	680,74±34,04 ^b	247,96±12,40 ^a
<i>H. repandum</i> II	H ₂ O	n.d.	n.d.
	EtOH	300,85±3,13 ^b	267,54±13,06 ^a
	MeOH	713,25±26,12 ^b	354,24±11,45 ^a
Standard			
Paklitaksel		16,43±0,13 ^a	16,56±0,21 ^a

n.d. - nije detektovano;

^{a,b} vrednosti označene različitim slovima u istom redu statistički se značajno razlikuju (Tukey HSD test, $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

5.2. Hemijska karakterizacija ekstrakata

5.2.1. Polisaharidi

5.2.1.1. Planarna hromatografija

Analizom hidrolizovanih polisaharidnih ekstrakata ispitivanih vrsta gljiva planarnom hromatografijom, poređenjem sa standardima, utvrđeno je da uzorci sadrže iste monosaharidne komponente koje su zastupljene u različitom odnosu.

Polisaharidni ekstrakti vrsta *B. adusta*, *S. subtomentosum* i *H. repandum* I i II sadrže D-galaktozu u najvećoj količini, dok su u nešto manjoj količini zastupljene D-glukoze i u tragovima D-manoza i L-fukoza/D-ksiloza.

U polisaharidnim uzorcima vrsta *T. versicolor*, *P. porrigens* i *A. strobiliformis* preovlađujuća komponenta je D-glukoza, sa manjom količinom galaktoze i u tragovima manoze i ksiloze.

Uzorak *S. hirsutum* sadrži kao dominantne komponente D-glukozu i D-galaktozu, zatim L-fukoza i/ili D-ksiloza, dok se D-manoza nalazi u tragovima.

Komponente veoma slabe pokretljivosti označene su kao parcijalno hidrolizovani polisaharidni molekuli. Mala količina oligosaharidnih fragmenata bila je vidljiva u zoni pokretljivosti koja odgovara ovim komponentama. Prisustvo uronskih kiselina nije utvrđeno u ispitivanim uzorcima.

5.2.1.2. Elementalna organska mikroanaliza (EOMA)

U polisaharidnim ekstraktima plodnih tela ispitivanih vrsta gljiva određen je ukupan sadržaj azota (N), ugljenika (C), vodonika (H) i sumpora (S), elementalnom organskom mikroanalizom (**Tabela 9**). Mikroanaliza je pokazala da većina polisaharidnih ekstrakata ne sadrži sumpor.

Budući da je kod gljiva prisutna relativno velika količina neproteinskog N, određivanje sadržaja proteina iz ukupnog N je dosta kompleksno. Neproteinski N se prvenstveno odnosi na hitin (komponenta ćelijskog zida), kao i na slobodne aminokiseline i nukleinske kiseline (Kozarski, 2012). Samo oko 60 – 77 % N kod gljiva se nalazi vezano u proteinima (Fujihara i sar., 1995; Matilla i sar., 2002). NP faktori (engl. Nitrogen to Protein factor) koji se najčešće upotrebljavaju kada su u pitanju gljive jesu NP 4,38 (70 % N x 6,25) i 4,70 (Matilla i sar., 2002).

Tabela 9. Elementalna organska mikroanaliza PSH ekstrakata

PSH ekstrakt	N (%)	C (%)	H (%)	S (%)
<i>B. adusta</i>	4,72	41,48	5,88	–
<i>P. porrigens</i>	3,36	41,40	6,32	0,50
<i>S. hirsutum</i>	1,74	42,47	7,56	–
<i>S. subtomentosum</i>	2,19	41,49	6,87	–
<i>T. versicolor</i>	3,36	38,85	6,38	–
<i>A. strobiliformis</i>	4,85	34,66	5,87	0,65
<i>H. repandum</i> I	3,39	37,95	6,01	0,93
<i>H. repandum</i> II	2,67	36,78	6,02	–

Tabela 10. Sadržaj proteina u PSH ekstraktima

PSH ekstrakti	^a sadržaj proteina	^b sadržaj proteina
<i>B. adusta</i>	20,67	22,18
<i>P. porrigens</i>	14,72	15,79
<i>S. hirsutum</i>	7,62	8,18
<i>S. subtomentosum</i>	9,59	10,29
<i>T. versicolor</i>	14,72	15,79
<i>A. strobiliformis</i>	21,24	22,79
<i>H. repandum</i> I	14,85	15,93
<i>H. repandum</i> II	11,69	12,55

a: vrednost NP - 4,38; b: NP - 4,70

5.2.1.3. FTIR spektroskopija

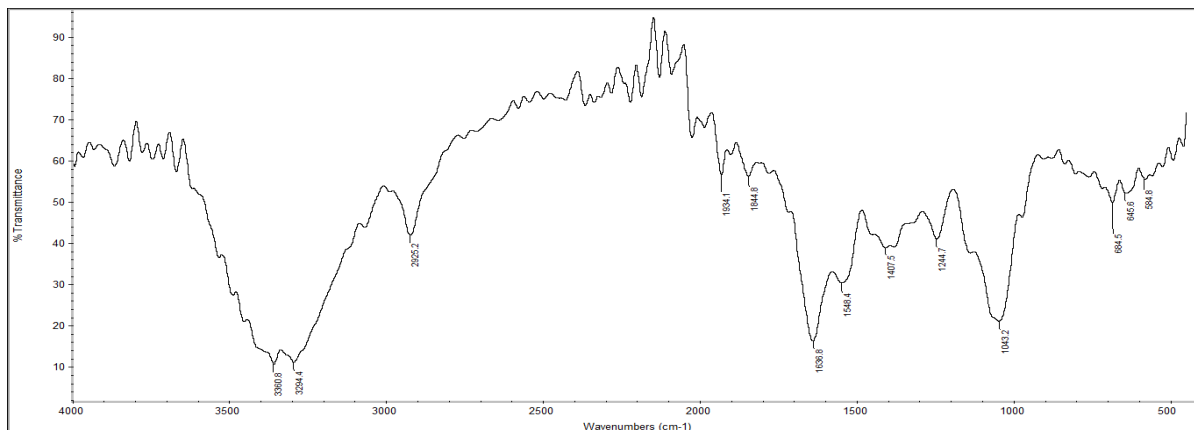
FTIR spektri svih ispitivanih polisaharidnih ekstrakata (PSH) pokazuju apsorpcione trake koje su specifične za polisaharidne strukture. Pored polisaharida, ekstrakti sadrže i smešu proteina i polifenolnih jedinjenja u različitom stepenu.

FTIR spektri ispitivanih polisaharidnih ekstrakata vrsta *B. adusta*, *S. hirsutum*, *S. subtomentosum* i *T. versicolor* prikazani su na slikama (Slika 40 - 43) i sadrže sledeće frekvence: karakterističnu široku apsorpcionu traku u oblasti 3500 - 3000 cm^{-1} koja odgovara valentnim vibracijama O–H grupa; traku na oko 2920 - 2950 cm^{-1} koja odgovara C–H razvučenim vibracijama; trake u regionu između 1500 - 1200 cm^{-1} koje odgovaraju C–H deformacionim vibracijama; trake na oko 1030 - 1070 cm^{-1} i 1150 cm^{-1} koje odgovaraju vibracijama istezanja glikozidne veze (C–O–C) i C–O–H; široku traku na 1630 - 1650 cm^{-1} koja je karakteristična za apsorbovanu vodu; karakterističnu slabu apsorpciju na 890 cm^{-1} koja ukazuje na prisustvo β – glikozidne veze; karakteristične trake niskog intenziteta na 850 cm^{-1} i 950 cm^{-1} koje ukazuju na prisustvo α – glikozidne veze.

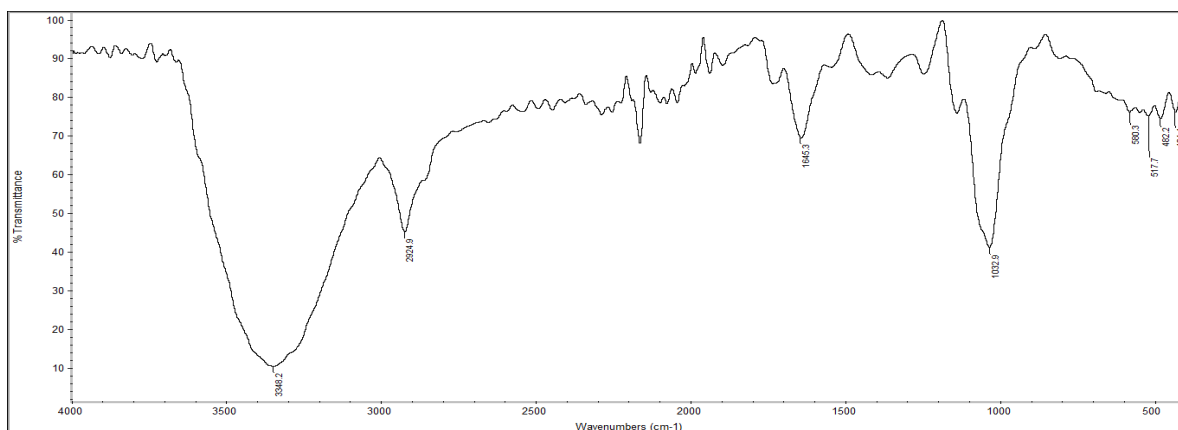
Pored apsorpcionih pikova karakterističnih za polisaharide, u FTIR spektrima ispitivanih uzoraka mogu se uočiti apsorpcije koje su specifične za proteine i polifenolna jedinjenja, uzimajući u obzir da se neke apsorpcije poklapaju. Prisustvo proteina u polisaharidnim ekstraktima karakterišu sledeće frekvence: intenzivna široka traka u oblasti 3500 cm^{-1} – 3000 cm^{-1} koja odgovara valentnim vibracijama N–H grupa (Carey, 1992) i apsorpcioni pik na 1630 – 1655 cm^{-1} odgovara amidnoj traci I, dok se pik na oko 1550 cm^{-1} (1600 – 1500 cm^{-1}) odnosi na amidnu traku II.

Prisustvo pigmenata u ispitivanim uzorcima karakterišu frekvence u oblasti (1650 – 1600 cm^{-1}) koje su identifikovane za aromatične C=C veze konjugovane sa C=O i /ili COO– grupama (MacCarthy i Rice, 1985), dok su trake u oblasti 1410 – 1310 cm^{-1} specifične za OH grupe fenolnih jedinjenja.

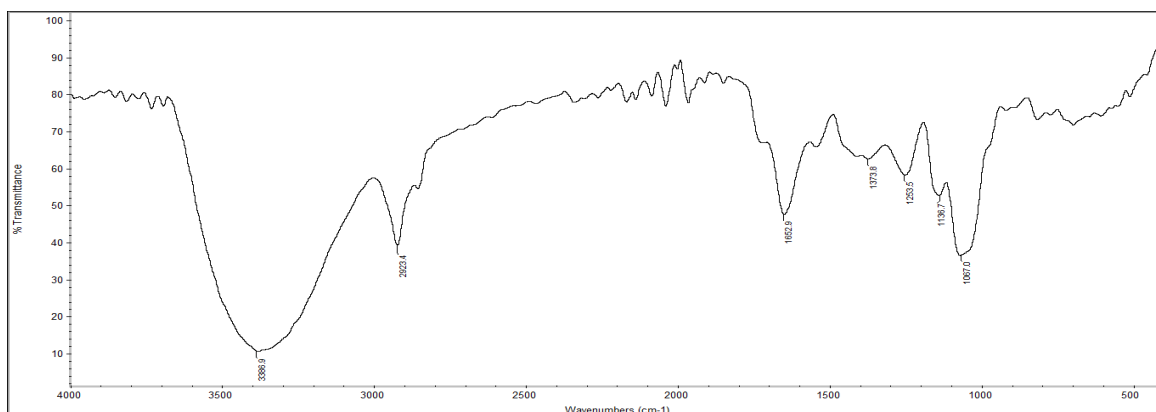
FTIR spektar polisaharidnog ekstrakta vrste *P. porrigens* (Slika 44) sadrži apsorpcione trake na 1079 cm^{-1} karakteristične za β – glukozidne veze, kao i slabu, ali relevantnu traku na 950 cm^{-1} koja je specifična za α -glikozidne veze. Traka na 1135 cm^{-1} odnosi se na vibracije istezanja C–O–C veza. Široka traka sa maksimumom na 3344 cm^{-1} karakteristična je za vibracije OH grupa i NH grupa, dok se traka na 2924 cm^{-1} odnosi na vibracije istezanja metilenske grupe. Trake koje ukazuju na prisustvo proteina nalaze se na 1650 cm^{-1} i na 1540 cm^{-1} .



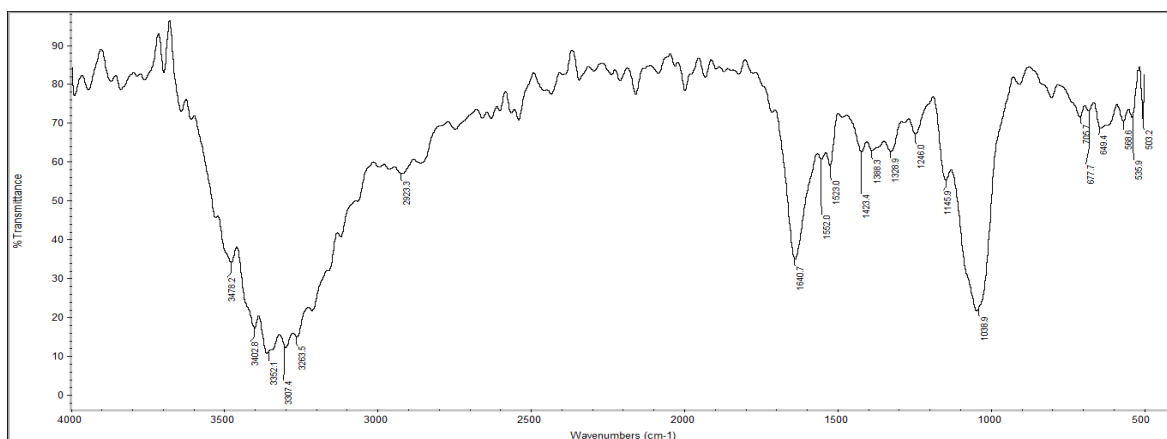
Slika 40. FTIR spektar polisaharidnog ekstrakta vrste *B. adusta*



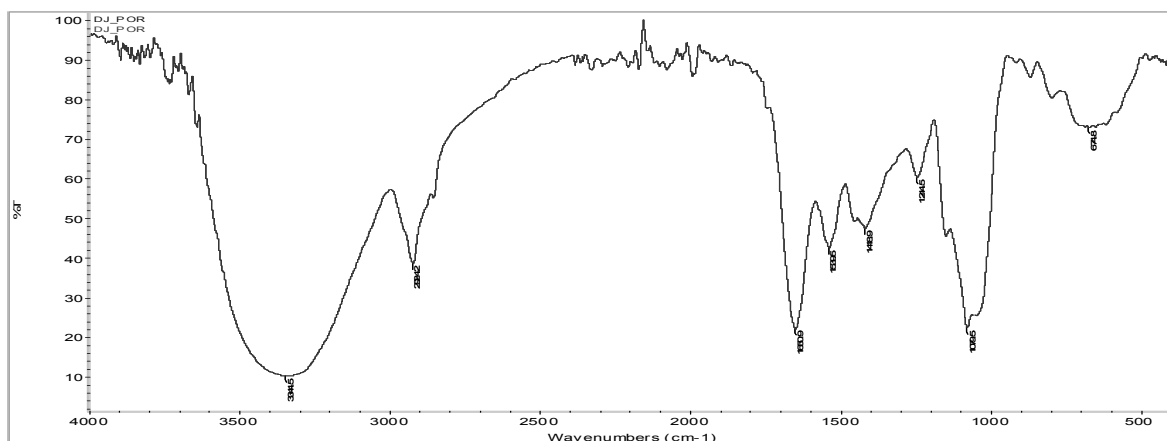
Slika 41. FTIR spektar polisaharidnog ekstrakta vrste *S. hirsutum*



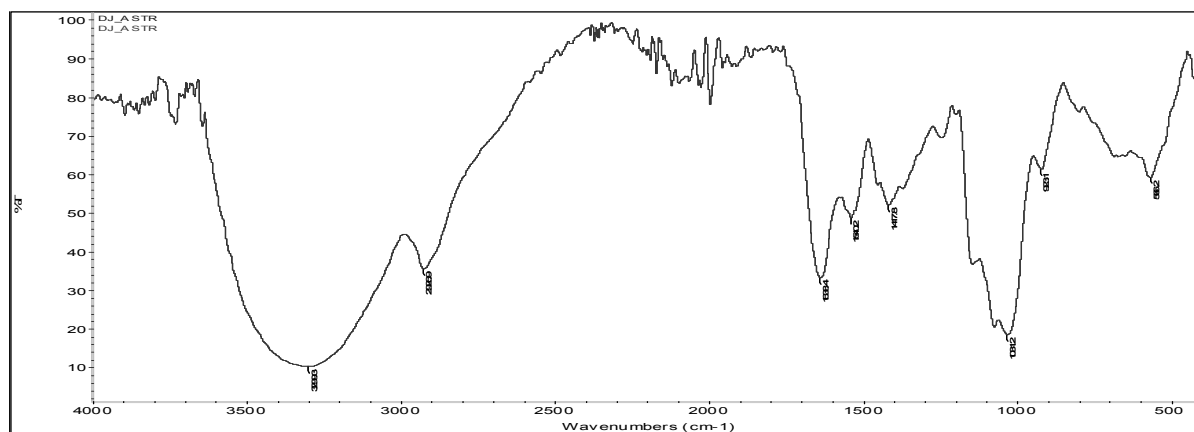
Slika 42. FTIR spektar polisaharidnog ekstrakta vrste *S. subtomentosum*



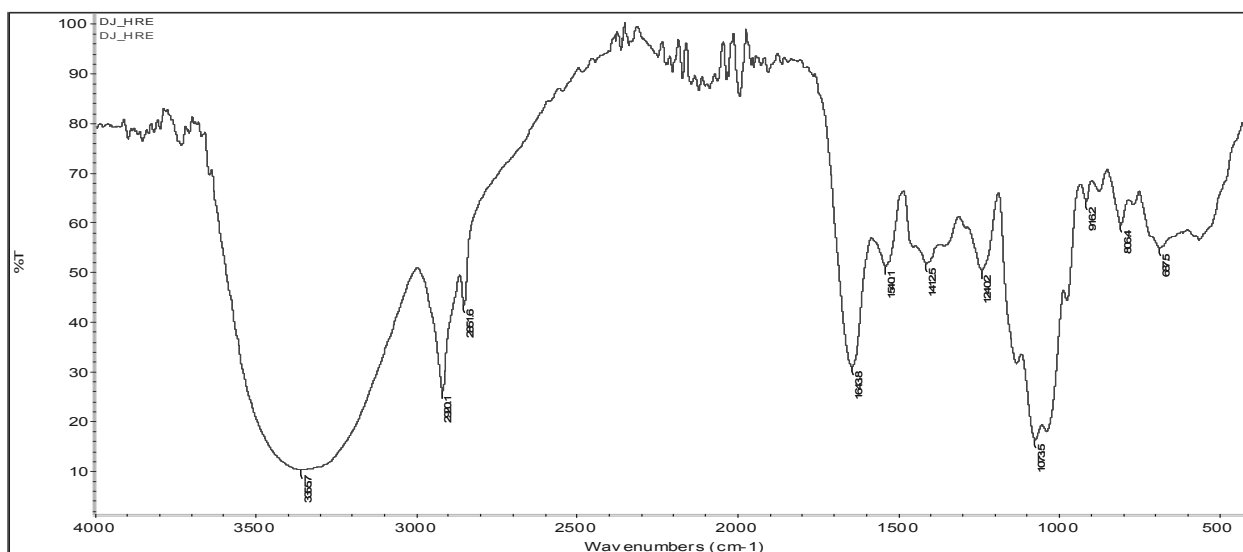
Slika 43. FTIR spektar polisaharidnog ekstrakta vrste *T. versicolor*



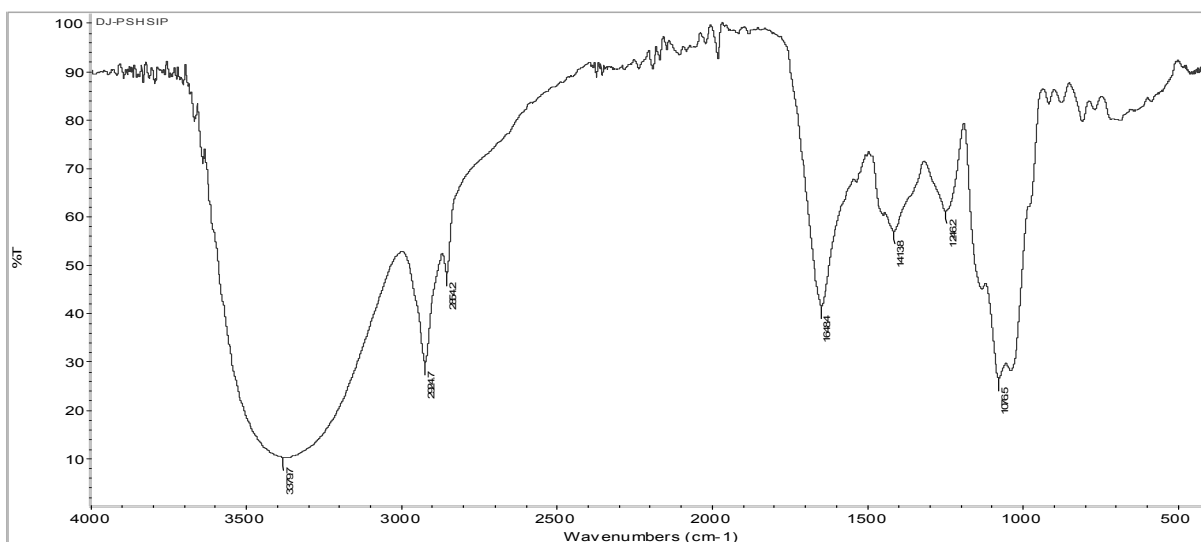
Slika 44. FTIR spektar polisaharidnog ekstrakta *P. porrigens*



Slika 45. FTIR spektar polisaharidnog ekstrakta vrste *A. strobiliformis*



Slika 46. FTIR spektar polisaharidnog ekstrakta vrste *H. repandum* I



Slika 47. FTIR spektar polisaharidnog ekstrakta vrste *H. repandum* II

FTIR spektar polisaharidnog ekstrakta dobijenog iz vrste *A. strobiliformis* (Slika 45) sadrži široku apsorpcionu traku sa maksimumom na 3299 cm^{-1} koja je karakteristična za valencione vibracije OH i NH grupa. Traka na 1167 cm^{-1} odnosi se na vibracije istezanja glikozidne C–O–C veze, dok jaka traka na 1031 cm^{-1} odgovara C–O valencionim vibracijama. Absorpcije na 1638 cm^{-1} i 1540 cm^{-1} odnose se na prisustvo proteina u ispitivanom uzorku.

FTIR spektar polisaharidnog ekstrakta vrste *H. repandum* I (Slika 46) sadrži dve delimično preklapljene trake na 1073 cm^{-1} i 1025 cm^{-1} koje se odnose na valencione

vibracije glikozidno vezanog heksopiranoznog prstena, kao i vibracije C–OH bočnih grupa. Jaka traka na 1644 cm^{-1} koja se odnosi na amidnu traku I (potiče najvećim delom od valencione C=O vibracije) kao i traka na 1540 cm^{-1} koja se odnosi na amidnu traku II (potiče najvećim delom od N–H deformacionih vibracija u ravni koje se kupluju sa valencionim C–N vibracijama, ukazuje na prisustvo proteina. Pikovi u oblasti $1410 - 1310\text{ cm}^{-1}$ vezani su za vibracije alifatičnog niza, dok na aromatična jedinjenja ukazuju frekvencije na $3000 - 3100\text{ cm}^{-1}$. Široka intenzivna traka sa maksimumom na 3356 cm^{-1} odnosi se na vibracije istezanja OH grupa u polisaharidima, kao i na vibracije istezanja NH grupa proteina, dok je traka na 2920 cm^{-1} tipična za asimetrične vibracije –CH₂ veza. Traka na 2852 cm^{-1} potiče od simetričnih vibracija metilenske grupe, dok traka na 1240 cm^{-1} potiče od vibracija van ravni γ CH₃ grupa alifatičnog niza. Apsorpcija na 763 cm^{-1} ($770 - 720\text{ cm}^{-1}$) korespondira sa vibracijama van ravni γ CH₂ alifatičnog niza.

FTIR spektar polisaharidnog ekstrakta izolovanog iz *H. repandum* II (**Slika 47**), sadrži karakteristične trake sa specifičnim maksimumima u regionu $1200 - 1000\text{ cm}^{-1}$ u kom se nalaze dominantne vibracije ugljenohidratnog prstena kao i vibracije istezanja bočnih grupa C–OH i vibracije glikozidnih C–O–C veza. Uočavaju se dve delimično preklapljene trake jakog intenziteta na 1076 cm^{-1} i 1041 cm^{-1} koje se odnose na valencione vibracije heksopiranoznog prstena. Apsorpcija na 1133 cm^{-1} karakteristična je za vibracije istezanja glikozidnih veza. Jaka traka na 1648 cm^{-1} (region $1600 - 1650\text{ cm}^{-1}$) ukazuje na prisustvo proteina, kao i na C=C frekvencije aromatičnih struktura. Traka na oko 1414 cm^{-1} vezana je za vibracije alifatičnih grupa. Široka traka u oblasti $3000 - 3500\text{ cm}^{-1}$ korespondira sa vibracijama O–H grupa kao i sa asimetričnim i simetričnim vibracijama N–H veza. Traka na 2925 cm^{-1} odnosi se na vibracije metilenske grupe, dok je traka na 2854 cm^{-1} relevantna za apsorpciju alifatičnih grupa. Slaba traka na oko 920 cm^{-1} ukazuje na prisustvo α -glikozidnih veza u ispitivanom ekstraktu.

Odsustvo karakteristične trake na 1740 cm^{-1} u svim analiziranim FTIR spektrima ukazuje na činjenicu da ispitivani polisaharidni ekstrakti ne sadrže uronske kiseline kao deo svojih strukturnih karakteristika, što je potvrđeno i rezultatima planarne hromatografije ispitivanih polisaharidnih ekstrakata.

5.2.2. Ukupni proteini

Među ispitivanim vrstama najveći sadržaj proteina ima vrsta *A. strobiliformis* (135,83 mg proteina/g s.m.), zatim vrsta *P. porrigens* (133,46 mg proteina/g s.m.) čiji se sadržaji proteina statistički značajno ne razlikuju. Najmanji sadržaj proteina zabeležen je za vrstu *S. subtomentosum* (19,58 mg proteina/g s.m.). Ne postoji statistički značajna razlika između ukupnog sadržaj proteina za vrstu *H. repandum* I u odnosu na istu vrstu sa drugog lokaliteta *H. repandum* II. Na osnovu razlike u ukupnom sadržaju proteina izdvojilo se pet grupe gljiva. Prvoj grupi pripadaju vrste *A. strobiliformis* i *P. porrigens* sa najvećim sadržajem proteina; drugu grupu čini vrsta: *T. versicolor*; treću grupu čine vrste: *S. hirsutum* i *B. adusta*; četvrtu: *H. repandum* I i *S. subtomentosum*, dok petoj grupi pripada vrsta *H. repandum* II. Između vrsta *H. repandum* I i II postoji razlika u sadržaju proteina koja je statistički značajna na nivou $p < 0,05$.

Tabela 11. Ukupan sadržaj proteina u ispitivanim vrstama gljiva

Vrsta	mg proteina/ g s.m.
<i>B. adusta</i>	58,43 ± 4,49 ^c
<i>P. porrigens</i>	133,46 ± 4,73 ^a
<i>S. hirsutum</i>	44,15 ± 2,63 ^c
<i>S. subtomentosum</i>	19,58 ± 0,52 ^d
<i>T. versicolor</i>	98,10 ± 0,88 ^b
<i>A. strobiliformis</i>	135,83 ± 7,19 ^a
<i>H. repandum</i> I	23,77 ± 0,98 ^{d*}
<i>H. repandum</i> II	11,74 ± 0,27 ^{e*}

Srednja vrednost ± STDEV

^{a,b,c,d,e} vrednosti označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju

(Tukey HSD test, $p < 0,01$ i $*p < 0,05$)

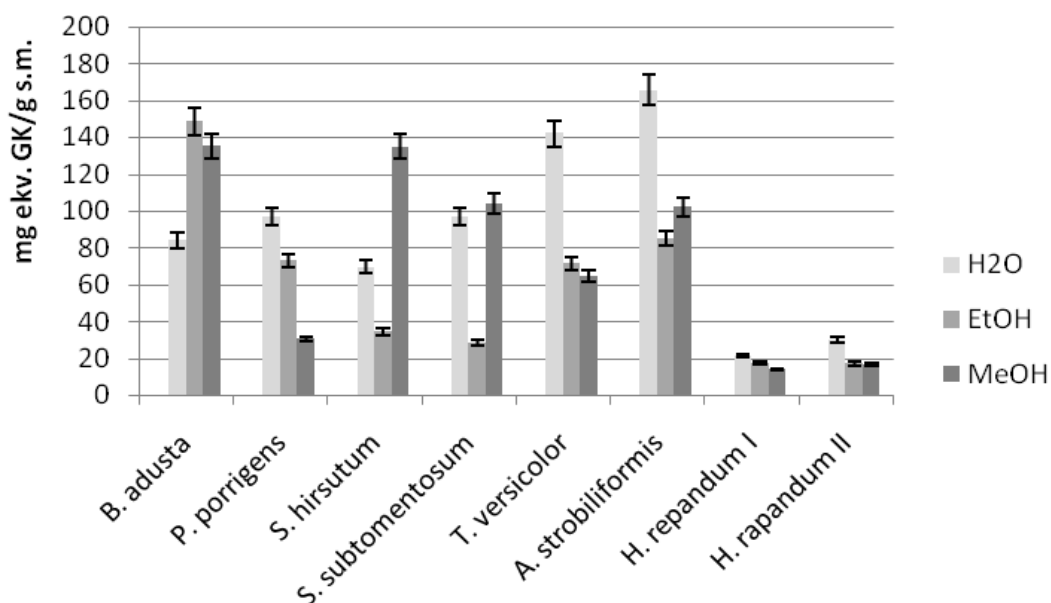
5.2.3. Ukupni fenoli i flavonoidi

Ukupan sadržaj fenola i flavonoida određen je za H₂O, EtOH i MeOH ekstrakte plodnih tela ispitivanih gljiva (**Slika 48 i 49**).

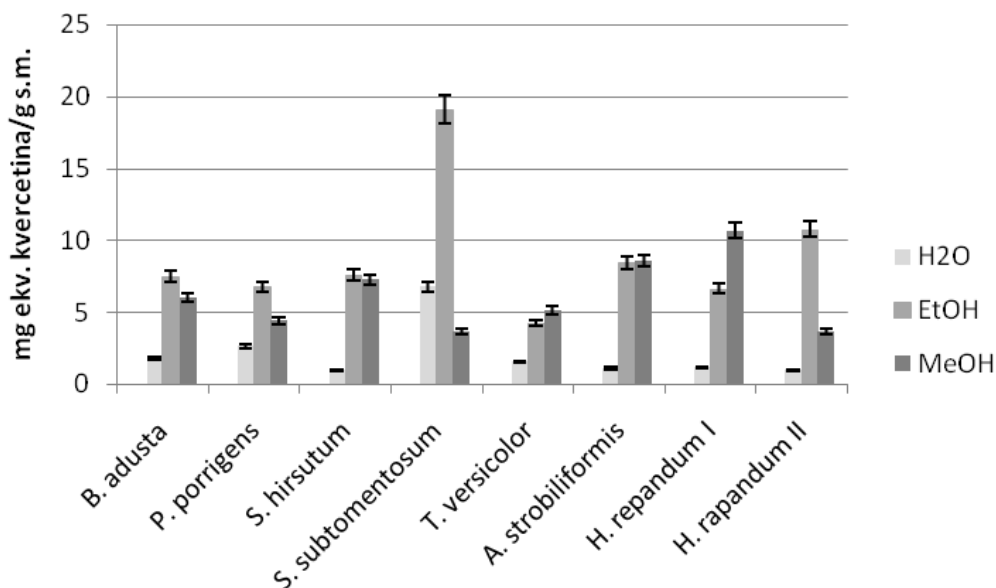
Najveći sadržaj ukupnih fenola zabeležen je u H₂O ekstraktu vrste *A. strobiliformis* (165,55 mg ekv. galne kiseline/g s.m.), a najmanji u MeOH ekstraktu vrste *H. repandum* T (13,87 mg ekv. galne kiseline/g s.m.). Brojna dosadašnja istraživanja potvrđuju činjenicu da sadržaj ukupnih fenola varira sa polanošću ekstrakata (Cheung i sar., 2003; Cheung i Cheung, 2005; Díaz-Godínez, 2015).

Najveći sadržaj ukupnih flavonoida dobijen je u EtOH ekstraktu vrste *S. subtomentosum* (19,10 mg ekv. kvercetina/g s.m.), dok je najmanji sadržaj utvrđen za H₂O

ekstrakt vrste *S. hirsutum* (0,95 mg ekv. kvercetina/g s.m.). Ako posmatramo liginkolne gljive uočavamo da je najveći sadržaj ukupnih flavonoida dobijen u EtOH ekstraktima (sem MeOH ekstrakta vrste *T. versicolor* kao izuzetka), dok su kod terikolnih gljiva MeOH ekstrakti bili najbogatiji flavonoidima. Na uporednom prikazu (**Slika 49**) jasno se uočava da je sadržaj ukupnih flavonoida u EtOH i MeOH veći u odnosu na H₂O ekstrakte svi ispitivanih vrsta, sa izuzetkom vrste *S. subtomentosum* čiji je H₂O ekstrakt bio bogatiji flavonoidima od MeOH ekstrakta. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima koji ističu veći sadržaj flavonoida u EtOH ekstraktima u odnosu na H₂O ekstrakte (Zengin i sar., 2015; Rašeta, 2016).



Slika 48. Uporedni prikaz sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima ispitivanih gljiva



Slika 49. Uporedni prikaz sadržaja ukupnih flavonoida u ekstraktima ispitivanih vrsta

EtOH ekstrakt vrste **B. adusta** analiziran u ovom radu pokazuje znatno bogatiji sastav ukupnih fenola (148,74 mg ekv. GK/g s.m.) u odnosu na EtOH iste vrste sa područja Slovačke (12,46 mg ekv. GK/g s.m.) (Nowacka i sar., 2015).

Vrednosti koje su dobijene za sadržaj ukupnih fenola za EtOH ekstrakt vrste **P. porrigens** iz Nigerije (28,97 mg ekv. GK/g s.m.) (Okoro, 2012) su niže od vrednosti koje su dobijene u ovom radu za EtOH ekstrakt (72,96 mg ekv. GK/g s.m.). Krud ekstrakt vrste **P. porrigens** iz Malezije pokazao je sličan rezultat (28,37 mg ekv. GK/g s.m.) (Yim i sar., 2013) vrsti iz Nigerije. Vodeni ekstrakt iste vrste iz Malezije (4,94 mg ekv. GK/g s.m.) (Yim i sar., 2012), pokazao je niži sadržaj ukupnih fenola u odnosu na H₂O ekstrakt ispitivan u našoj studiji (97,08 mg GK/g s.m.).

U studiji Okoro (2012) EtOH ekstrakt vrste **P. porrigens** pokazao je tri puta veći sadržaj ukupnih flavonoida (20,70± mg ekv. KV/g s.m.) od ispitivanog EtOH u ovoj studiji (6,80± mg ekv. KV/g s.m.).

MeOH ekstrakt vrste **S. hirsutum** pokazuje veći sadržaj ukupni fenola (134,96 mg ekv. GK/g s.m.) u odnosu na jedinke koje su sakupljene na području Šri Lanke (11,6± mg ekv. GK/g s.m.) (Fernando i sar., 2015).

Među ispitivanim ekstraktima vrste **T. versicolor** H₂O ekstrakt je pokazao najveći sadržaj ukupnih fenola (142,17 mg ekv. GK/g s.m.) koji je zapravo dvostruko veći u poređenju sa EtOH i MeOH ekstraktima. Osim toga, ispitivani MeOH ekstrakt je imao dvostruko veći sadržaj ukupnih fenola (64,76 mg ekv. GK/g s.m.) od istog ekstrakta iz Kine (23,28 mg ekv. GK/g s.m.) (Mau i sar., 2002). EtOH ekstrakt **T. versicolor** koji je ovde analiziran (71,55 mg ek. GK/g s.m.) pokazao je mnogo veću vrednost od istog ekstrakta iz Turske (9,58 mg ekv. GK/g s.m.) (Orhan i Üstün, 2011). Najveći sadržaj ukupnih flavonoida je zabeležen u MeOH ekstraktu (5,13 mg ekv. KV/g s.m.).

Vrsta **H. repandum** pokazala se kao najsiromašniji izvor ukupnih fenola. I pored toga, MeOH ekstrakt ove vrste sadrži više ukupnih fenola (13,87 mg ekv. GK/g s.m.) u odnosu na MeOH ekstrakt pomenute vrste poreklom iz Turske (0,4 mg ekv. GK/g s.m.) (Keleş i sar., 2011) i poreklom iz Indije (2,6 mg ek. GK/g s.m.) (Puttaraju i sar., 2006). U našoj studiji H₂O ekstrakt je pokazao veći sadržaj fenola (21, 3 mg ekv. GK/g s.m.) u odnosu na MeOH i EtOH, što je u saglasnosti sa studijom Puttaraju i sar. (2006) (H₂O ekstrakt 7,4 mg ekv. GK/g s.m.).

Sve ovo nam ukazuje da hemijski sastav gljiva veoma zavisi od genetskih predispozicija, da je species specifičan kao i da zavisi od uslova sredine, biljnih vrsta sa kojima su u zajednici kao i od stepena degradacije (kada govorimo o lignikolnim vrstama) lignina kao polifenolnog jedinjenja, jer gljive najvećim delom usvajaju fenolna jedinjenja iz supstrata na kome rastu.

5.2.4. HPLC-MS/MS analiza odabranih fenolnih jedinjenja

Radi utvrđivanja kvalitativnog i kvantitativnog sastava fenolnih jedinjenja u PSH, H₂O, EtOH i MeOH ekstraktima ispitivanih vrsta gljiva korišćeno je ukupno 45 standardnih fenolnih jedinjenja, a identifikovano 40 jedinjenja ukupno u svim vrstama (**Tabele 12 - 18**).

U ispitivanim ekstraktima vrste *B. adusta* detektovano je ukupno 8 fenolnih jedinjenja od kojih 1 biflavonoid, 5 hidroksibenzoevih kiselina, 1 hidroksicimetna kiselina i 1 cikloheksankarboksilna kiselina. Sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima je bio sledeći

EtOH > MeOH > H₂O > PSH (**Tabela 12**). Od četiri analizirana ekstrakta jedino je u EtOH ekstraktu detektovano prisustvo galna kiselina, dok se H₂O ekstrakt izdvaja prema tome što jedini sadrži 2,5-hidroksibenzoevu i kafenu kiselinu. Kod svih ekstrakata veći je sadržaj fenolnih kiselina u odnosu na flavonoide.

Kada je reč o vrsti *P. porrigens* ukupno je detektovano 12 fenolnih jedinjenja, od toga 5 flavona, 1 biflavonoid, 2 hidroksibenzoeve kiseline, 3 hidroksicinamične kiseline i 1 cikloheksankarboksilna kiselina (**Tabela 13**). Ukupan sadržaj u ekstraktima bio je sledeći H₂O > EtOH > MeOH > PSH. H₂O ekstrakt se izdvaja zbog najvećeg sadržaja hinske kiseline, dok je MeOH ekstrakt jedini među ekstraktima pomenute vrste koji sadrži luteolin, krizoeriol, apigenin-7-O-glukozid, cinamičnu i kafenu kiselinu. PSH i H₂O ekstrakt sadrže više flavonoida nego fenolnih kiselina, dok je u EtOH i MeOH ekstraktu obrnut trend.

U ekstraktima vrste *S. hirsutum* detektovano je 7 fenolnih jedinjenja i to 2 flavona, 1 biflavonoid, 3 hidroksibenzoeve kiseline i 1 cikloheksankarboksilna kiselina, sa izuzetkom PSH ekstrakta gde nije detektovano ni jedno jedinjenje (**Tabela 14**). Kod preostala tri ekstrakta sadržaj je išao sledećim redom MeOH > H₂O > EtOH. MeOH ekstrakt jedini sadrži flavonoide, baikalein i krizoeriol. U MeOH i EtOH ekstraktu ima više fenolnih kiselina, dok je kod H₂O ekstrakta obrnut slučaj.

Za vrstu *S. subtomentosum* ustanovljeno je da sadrži ukupno 8 fenolnih jedinjenja (1 flavon, 1 biflavonoid, 3 hidroksibenzoeve kiseline, 1 hidroksicimetna kiselina, 1 kumarin i cikloheksankarboksilnu - hinsku kiselinu) (**Tabela 15**). Ekstrakti se prema sadržaju fenolnih jedinjenja mogu navesti sledećim redom MeOH > H₂O > EtOH, dok u PSH ekstraktu nije detektovano ni jedno jedinjenje. U sva tri ekstrakta znatno su dominantnije fenolne kiseline u odnosu na flavonoide.

Vrsta *T. versicolor* pokazala je najbogatiji sastav fenolnih jedinjenja od svih ispitivanih vrsta. U ekstraktima ove vrste detektovano je čak 38 pomenutih jedinjenja (9 flavona, 8 flavonola, 1 flavonon, 2 flavanola, 1 biflavonoid, 2 izoflavonoida, 6 hidroksibenzoevih kiselina, 4 hidroksicinamične kiseline, 3 kumarina, 1 cikloheksankarboksilna kiselina i 1 hlorogena kiselina) (**Tabela 16**). Što se tiče ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja po

ekstraktima, redosled je sledeći EtOH > MeOH > H₂O > PSH. U PSH i H₂O ekstraktu veći je sadržaj flavonoida u odnosu na fenolne kiseline, dok je u EtOH i MeOH više fenolnih kiselina u odnosu na flavonoide.

Što se tiče terikolne vrste **A. strobiliformis** detektovana su svega 4 fenolna jedinjenja (amentoflavon, *p*-hidroksibenzoeva, katehinska i hininska kiselina) (**Tabela 17**). Sadržaj jedinjenja u ekstraktima je H₂O > MeOH > EtOH > PSH. Generalno, u H₂O, EtOH i MeOH ekstraktu prisutan je veći sadržaj fenolnih kiselina u odnosu na flavonoide, dok u PSH nisu zastupljene pomenute klase fenolnih jedinjenja već samo hininskakiselina.

Za ekstrakti vrste **H. repandum** (Tara) utvrđeno je da sadrže 11 fenolnih jedinjenja (3 flavona, 1 biflavonoid, 2 hidroksibenzoeve, 4 hidroksicinamične i hinsku kiselinu) (**Tabela 18**). Redosled ekstrakata prema ukupnom sadržaju detektovanih jedinjenja je sledeći EtOH > H₂O > MeOH > PSH. PSH ekstrakt sadrži samo hinsku kiselinu, dok su hidroksibenzoeve kiseline prisutne samo u MeOH ekstraktu. S tim u vezi, H₂O i EtOH ekstrakt su imali više flavonoida, dok je MeOH imao više fenolnih kiselina.

Tabela 12. Detektovana fenolna jedinjenja u ekstraktima vrste *B. adusta*

Klasa	Jedinjenje	Ekstrakti ($\mu\text{g/g s.m.}$)			
		PSH	H ₂ O	EtOH	MeOH
Biflavonoid	amentoflavon	n.d.	19,30	22,10	32,10
Ukupno		–	19,30	22,10	32,10
Hidroksibenzoeve kis.	p-hidroksibenzoeva kis.	11,20	13,60	79,40	47,60
	2,5-dihidroksibenzoeva kis.	n.d.	9,06	n.d.	n.d.
	protokatehinska kis.	n.d.	16,10	9,32	5,59
	galna kis.	n.d.	n.d.	46,00	n.d.
	siringiska kis.	n.d.	n.d.	30,60	11,20
Hidroksicimetna kis.	kafena kis.	n.d.	7,92	n.d.	n.d.
Ukupno		11,20	46,68	165,32	64,39
Cikloheksankarboksilna kis.	hininskakis.	n.d.	14,20	265,00	349,00
UKUPNO		11,20	80,18	452,70	445,10

n.d. - nije detektovano

Tabela 13. Detektovana fenolna jedinjenja u ekstraktima vrste *P. porrigens*

Klasa	Jedinjenje	Ekstrakti ($\mu\text{g/g s.m.}$)			
		PSH	H ₂ O	EtOH	MeOH
Flavoni	apigenin	n.d.	n.d.	n.d.	2,54
	baikalein	n.d.	n.d.	1,85	2,46
	luteolin	n.d.	n.d.	n.d.	10,30
	krizoeriol	n.d.	n.d.	n.d.	1,71
	apigenin-7-O-glukozid	n.d.	n.d.	n.d.	5,24
Biflavonoid	amentoflavon	n.d.	20,70	21,10	49,90
Ukupno		–	20,70	22,85	72,15
Hidroksibenzoeva kis.	p-hidroksibenzoeva kis.	4,70	12,10	30,00	14,40
	protokatehinska kis.	n.d.	3,41	3,20	1,54
Hidroksicimetna kis.	cimetna kis.	n.d.	n.d.	n.d.	73,10
	p-kumarinska kis.	n.d.	n.d.	1,92	1,95
	kafena kis.	n.d.	n.d.	n.d.	7,92
Ukupno		4,70	15,51	35,12	98,91
Cikloheksankarboksilna kis.	hininskakis.	2,57	161,00	14,20	13,60
UKUPNO		7,28	197,30	72,28	184,69

n.d. - nije detektovano

Tabela 14. Detektovana fenolna jedinjenja u ekstraktima vrste *S. hirsutum*

Klasa	Jedinjenje	Ekstrakti ($\mu\text{g/g s.m.}$)			
		PSH	H ₂ O	EtOH	MeOH
Flavoni	baikalein	n.d.	n.d.	n.d.	2,65
	krizoeriol	n.d.	n.d.	n.d.	1,31
Biflavonoid	amentoflavon	n.d.	19,70	22,90	26,60
Ukupno		–	19,70	22,90	30,56
Hidroksibenzoeva kis.	p-hidroksibenzoeva kis.	n.d.	n.d.	11,20	6,66
	protokatehinska kis.	n.d.	3,63	13,00	2,85
	galna kis.	n.d.	n.d.	78,70	52,90
Ukupno		–	3,63	102,9	62,41
Cikloheksankarboksilna kis.	hininskakis.	n.d.	391,00	n.d.	378,00
UKUPNO		–	414,33	125,80	470,97

n.d. - nije detektovano

Tabela 15. Detektovana fenolna jedinjenja u ekstraktima vrste *S. subtomentosum*

Klasa	Jedinjenje	Ekstrakti ($\mu\text{g/g s.m.}$)			
		PSH	H ₂ O	EtOH	MeOH
Flavon	kampferol	n.d.	n.d.	n.d.	16,50
Biflavonoid	amentoflavon	n.d.	19,10	19,90	33,20
Ukupno		–	19,10	19,90	49,70
Hidroksibenzoeva kis.	p-hidroksibenzoeva kis.	n.d.	25,10	6,96	15,50
	protokatehinska kis.	n.d.	143,00	74,50	207,00
	galna kis.	n.d.	50,90	73,50	140,00
Hidroksicimetna kis.	kafena kis.	n.d.	11,10	11,20	12,90
Ukupno		–	230,10	166,16	375,40
Kumarin	eskuletin	n.d.	3,32	n.d.	n.d.
Cikloheksankarboksilna kis.	hininskakis.	n.d.	225,00	99,80	322,00
UKUPNO		–	477,52	285,80	747,70

n.d. - nije detektovan

Tabela 16. Detektovana fenolna jedinjenja u ekstraktima vrste *T. versicolor*

Klasa	Jedinjenje	Ekstrakt (µg/g s.m.)			
		PSH	H ₂ O	EtOH	MeOH
Flavoni	apigenin	1,57	1,71	0,93	0,23
	baikalein	43,00	21,60	8,04	3,63
	luteolin	2,01	1,47	1,05	1,19
	krizoeriol	1,68	1,79	1,21	0,74
	viteksin	2,06	1,56	1,98	1,19
	apigenin-7-O-glukozid	2,37	1,41	1,34	0,54
	luteolin-7-O-glukosid	0,78	0,91	0,78	0,26
	apiin	2,86	1,82	2,07	0,86
	baikalin	9,95	10,7	8,88	6,27
Flavonoli	kaempferol	1,69	2,15	1,96	1,58
	kvercetin	33,70	31,20	29,90	29,30
	isoramnetin	21,40	14,60	9,36	8,97
	kvercitrin	0,89	1,62	1,81	1,93
	kaempferol-3-O-glukozide	1,68	1,71	1,86	0,80
	hiperozid	0,85	0,68	0,11	0,43
	kvercetin-3-O-glukosid	0,96	0,31	1,72	0,59
	rutin	1,01	1,11	1,34	0,53
Flavanoni	naringenin	1,82	1,70	1,82	1,06
Flavanoli	katehin	n.d.	17,20	5,91	21,90
	epikatehin	3,92	n.d.	n.d.	n.d.
Biflavonoid	amentoflavon	32,40	17,20	7,79	6,60
Izoflavonoidi	daidzein	0,86	0,53	n.d.	n.d.
	genistein	0,51	0,37	0,30	0,21
Ukupno		167,98	133,35	90,16	88,82
Hidroksibenzoeve kis.	<i>p</i> -hidroksibenzoeva kis.	10,10	141,00	465,00	184,00
	protokatehinska kis.	2,06	1,82	18,20	8,57
	genistinska kis.	n.d.	n.d.	32,10	24,90
	vanilinska acid	n.d.	n.d.	45,60	44,70
	galna kis.	9,30	11,40	16,80	22,00
	siringinska kis.	n.d.	6,02	59,10	30,10
Hidroksicinamične kis.	<i>p</i> -kumarinska kis.	1,56	1,21	1,49	1,28
	<i>o</i> -kumarinska kis.	0,81	1,16	0,79	0,74
	ferulinska kis.	2,12	n.d.	2,66	2,12
	kafena kis.	1,72	1,53	3,26	2,33
Ukupno		27,67	164,14	645,00	320,74
Kumarini	eskuletin	n.d.	0,78	26,20	2,87
	skopoletin	4,22	1,66	0,59	n.d.
	umbeliferon	1,40	1,13	1,37	1,13
Cikloheksankarbonsilna kis.	hininskakis.	2,72	80,40	8,84	98,70
Hlorogena kis.	5-O-kafenohinska kis.	2,29	2,93	4,13	2,41
UKUPNO		206,27	384,39	776,29	514,66

n.d. - nije detektovano

Tabela 17. Detektovana fenolna jedinjenja u ekstraktima vrste *A. strobiliformis*

Klasa	Jedinjenje	Ekstrakti ($\mu\text{g/g s.m.}$)			
		PSH	H ₂ O	EtOH	MeOH
Biflavonoid	amentoflavon	n.d.	19,70	19,70	30,90
Ukupno		–	19,70	19,70	30,90
Hidroksibenzoeve kis.	p-hidroksibenzoeva kis.	n.d.	40,10	56,70	31,30
	protokatehinska kis.	n.d.	2,24	2,67	3,37
Ukupno		–	42,34	59,37	34,67
Cikloheksankarboksilna kis.	hininskakis.	33,50	452,00	n.d.	135,00
UKUPNO		33,50	514,30	79,10	200,60

n.d. - nije detektovano

Tabela 18. Detektovana fenolna jedinjenja u ekstraktima vrste *H. repandum*

Klasa	Jedinjenje	Ekstrakti ($\mu\text{g/g s.m.}$)			
		PSH	H ₂ O	EtOH	MeOH
Flavoni	baikalein	n.d.	n.d.	2,23	2,33
	luteolin	n.d.	n.d.	n.d.	9,65
	apigenin-7-O-glukozid	n.d.	n.d.	n.d.	4,15
Biflavonoid	amentoflavon	n.d.	22,50	22,50	43,6
Ukupno		–	22,50	24,73	59,73
Hidroksibenzoeve kis.	p-hidroksibenzoeva kis.	n.d.	9,64	5,59	16,8
	protokatehinska kis.	n.d.	n.d.	3,89	n.d.
Hidroksicinamične kis.	cimetna kis.	n.d.	n.d.	n.d.	137,00
	p-kumarinska kis.	n.d.	n.d.	n.d.	2,13
	o-kumarinska kis.	n.d.	n.d.	n.d.	0,96
	kafena kis.	n.d.	n.d.	n.d.	8,12
Ukupno		–	9,64	9,48	148,21
Cikloheksankarboksilna kis.	hininskakis.	182,00	542,00	610,00	194,00
UKUPNO		182,00	574,30	643,81	418,92

n.d. - nije detektovano

5.2.5. Korelacije sadržaja UF i UFI sa antiradikalnim i antioksidacionim testovima

U cilju poređenja rezultata, dobijenih spektrofotometrijskim i polarografskom metodom, kao i poređenja sadržaja ukupnih fenola i flavonoida sa ispoljenim antioksidativnim aktivnostima, urađena je korelaciona analiza (**Tabela 19**).

Svi testovi međusobno pokazuju pozitivnu korelaciju (r^2 0,64 - 0,95), a postoji značajna pozitivna korelacija (r^2 , $p < 0,05$) između ukupnog sadržaja fenola i primenjenih testova i kreću se u opsegu od 0,70 do 0,92 u zavisnosti od metode, kao i u slučaju ukupnih flavonoida gde se vrednosti korelacija kreću u opsegu od 0,77 do 0,93. Korelacija između polarografske i spektrofotometrijskih metoda je takođe statistički značajna i kreće se u opsegu 0,64 do 0,94.

HPMC metoda najbolje korelira sa O_2^- i FRAP metodom (0,94 i 0,90, navedenim redosledom).

Tabela 19. Koeficijenti korelacije između OH^\bullet , $O_2^{\bullet-}$, NO^\bullet , ABTS^{•+}, DPPH[•], FRAP, HPMC, UF i UFI

	OH	O_2^-	NO	ABTS	DPPH	FRAP	HPMC	UF	UFI
OH	1	0,83	0,83	0,73	0,81	0,71	0,64	0,70	0,80
O_2^-		1	0,84	0,86	0,95	0,94	0,94	0,92	0,93
NO			1	0,86	0,91	0,92	0,84	0,84	0,80
ABTS				1	0,92	0,81	0,89	0,79	0,77
DPPH					1	0,76	0,87	0,83	0,84
FRAP						1	0,90	0,85	0,83
HPMC							1	0,75	0,84
UF								1	0,94
UFI									1

* Koeficijenti korelacije su statistički značajni na nivou $p < 0,05$.

5.2.6. Organske kiseline

Kod većine analiziranih vrsta gljiva najdominantnije organske kiseline su hininskai ćilibarna, a kod vrste *P. porrigens* u većem sadržaju prisutna je, pored hinske, i buterna kiselina. U uzorku vrste *B. adusta* detektovano je najviše organskih kiselina, ukupno sedam (oksalna, jabučna, hinska, ćilibarna, mravlja, propionska i buterna), a u najvećem sadržaju prisutna je propionska kiselina. Kod vrste *P. porrigens* detektovano je pet kiselina (najveći sadržaj ćilibarne kiseline), u uzorku vrste *S. hirsutum* pet (najdominantnija – hininska kis.), *S. subtomentosum* pet (najveći sadržaj hinske kis.), *T. versicolor* pet (najdominantnija – hininska kis.), *A. strobiliformis* šest (najdominantnija – hininska kis.), *H. repandum* I četiri (najdominantnija – ćilibarna) i *H. repandum* II šest (najdominantnija – hininska kis.). Razlika u sadržaju detektovanih kiselina između vrsta *H. repandum* I i II postoji kako u broju detektovanih kiselina tako i u njihovom sadržaju.

Tabela 20. Sadržaj organskih kiselina u analiziranim vrstama gljiva (mg/g s.m.)

mg/g s.m.	BA	PP	SH	SS	TV	AS	HR I	HR II
oksalna kiselina	0,41	1,88	6,86	4,44	6,36	n.d.	0,76	0,17
limunska kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
vinska kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
jabučna kiselina	3,06	0,50	0,23	n.d.	n.d.	1,88	n.d.	n.d.
askorbinska kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
hininska kiselina	11,27	5,81	77,00	27,86	39,42	33,49	26,36	6,64
ćilibarna kiselina	3,79	20,51	18,25	4,59	20,25	3,04	72,62	1,51
mravlja kiselina	0,77	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,13	n.d.	0,70
sirćetna kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
propionska kiselina	26,89	n.d.	n.d.	7,22	4,02	9,23	n.d.	1,76
buterna kiselina	2,61	2,49	8,71	20,18	16,22	0,84	4,00	0,70

5.2.7. Masne kiseline

Radi definisanja sastava masnih kiselina uzorci su analizirani na gasnom hromatogramu (GC). Rezultati GC analize su pokazali da je od ukupno 36 metil-estara masnih kiselina u ispitivanim vrstama detektovano 30 (**Tabela 21**). Kada su u pitanju lignikolne vrste, 18 masnih kiselina je detektovano u uzorku vrste *B. adusta*, 20 u uzorku vrste *P. porrigens*, 25 u uzorku vrste *S. hirsutum*, 26 u uzorku vrste *S. subtomentosum*, dok je u terikolnim vrstama detektovano 20 masnih kiselina u uzorku vrste *A. strobiliformis*, 26 u uzorku vrste *H. repandum* I i 19 u uzorku *H. repandum* II.

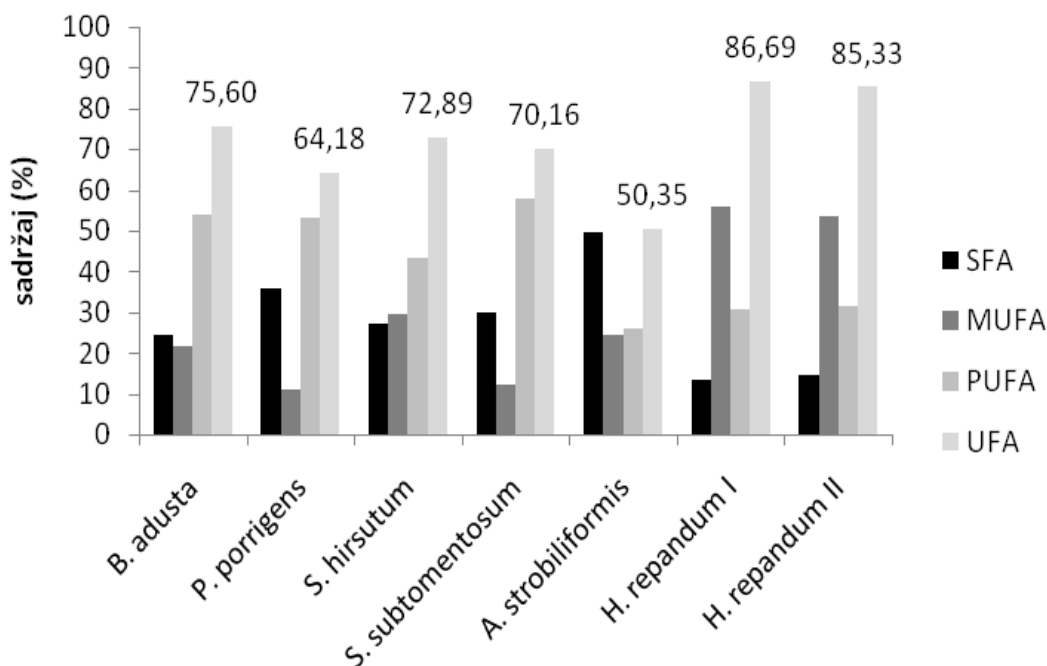
Kod vrsta *B. adusta* i *S. hirsutum* dominantna masna kiselina je linolna (C18:2n6c) sa procentualnim udelom od 50,13 % i 40 %, navedenim redom. Kod vrste *P. porrigens* najzastupljenija je behenska kiselina (C22:06) sa udelom od 30,57 %, a kod vrste *S. subtomentosum* *cis*-5,8,11,14,17 - eikosapenteanska kiselina (C20:5n3) sa udelom od 23,58 %. Što se tiče terikolnih vrsta *A. strobiliformis* u najvećem procentu sadrži palmitoleinsku kiselinu (C16:01), dok je kod vrste *H. repandum* sa oba lokaliteta najzastupljenija oleinska kiselina (C18:1n9c) ali sa različitim udelom *H. repandum* I - 31,81 % i *H. repandum* II sa čak 52,14%.

Tabela 21. Rezultati GC analize metil-estara masnih kiselina (%)

	MK	BA	PP	SH	SS	AS	HR I	HR II
1	C6:0	0,47	1,22	0,81	0,00	0,68	0,07	0,00
2	8:00	0,00	0,47	0,12	0,10	0,47	0,02	0,00
3	10:00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	11:00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00
5	12:00	0,16	0,00	0,07	0,15	0,53	0,00	0,00
6	13:00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	14:00	0,41	1,25	0,59	0,13	6,53	0,04	0,07
8	14:01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	15:00	1,43	5,65	0,91	0,16	4,55	0,18	0,78
10	15:01	0,00	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	16:00	17,75	0,00	14,13	2,24	0,00	8,82	9,97
12	16:01	4,64	6,95	1,73	0,30	21,71	0,18	0,27
13	17:00	0,36	2,41	0,55	0,06	0,80	0,12	0,12
14	17:01	0,49	2,25	0,33	0,16	0,75	0,08	1,15
15	18:00	1,31	12,70	6,60	1,28	0,00	1,97	2,75
16	18:1n9t	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	18:1n9c	16,08	0,00	26,81	4,82	1,33	31,81	52,14
18	18:2n6t	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19	18:2n6c	50,13	0,00	40,00	12,30	1,08	26,71	30,93
20	20:00	0,00	0,00	0,47	1,56	9,83	0,18	0,08
21	18:3n6	0,00	11,20	0,00	2,06	0,98	0,42	0,00
22	20:01	0,50	1,37	0,38	6,83	0,00	0,19	0,10
23	18:3n3	0,00	2,11	0,13	2,77	8,48	0,20	0,10
24	21:00	1,16	0,80	0,11	3,10	0,00	0,19	0,00
25	20:02	0,64	0,00	0,40	11,26	9,25	0,53	0,09
26	22:00	0,43	3,48	1,14	2,60	9,39	0,48	0,10
27	20:3n6	0,00	1,40	0,00	0,65	0,00	0,52	0,00
28	22:1n9	0,00	0,00	0,18	0,00	0,65	23,73	0,05
29	20:3n3	0,00	0,00	0,00	1,34	0,00	0,00	0,00
30	20:4n6	0,00	4,31	0,47	0,16	1,45	0,36	0,00
31	23:00	0,00	6,14	0,17	0,00	0,00	0,61	0,57
32	22:06	2,08	30,57	0,65	3,22	2,84	1,00	0,12
33	24:00:00	0,92	1,70	1,45	18,40	16,87	0,64	0,23
34	20:5n3	1,05	3,61	0,33	23,58	1,82	0,36	0,38
35	24:01:00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
36	22:6n3	0,00	0,00	1,48	0,70	0,57	0,00	0,00

MK - masna kiselina; BA - *B. adusta*; PP - *P. porrigens*; SH - *S. hirsutum*; SS - *S. subtomentosum*; AS - *A. strobiliformis*; HR I - *H. repandum* I; *H. repandum* II

Kod svih ispitivanih lignikolnih gljiva najzastupljenije su polinezasićene masne kiseline (**Slika 50**). Među terikolnim vrstama, kod vrste *A. strobiliformis* najzastupljenije su zasićene masne kiseline, dok je kod vrste *H. repandum* (sa oba lokaliteta) najveći sadržaj mononezasićenih masnih kiselina.



Slika 50. Uporedni prikaz sadržaja zasićenih (SFA), mononezasićenih (MUFA) i polinezasićenih (PUFA) i ukupnih nezasićenih (UFA) masnih kiselina

Na osnovu prikazanih rezultata jasno se uočava da je sadržaj polinezasićenih masnih kiselina veći kog lignikolnih u odnosu na ispitivane terikolne vrste. Takođe, primećujemo i da je sadržaj svih masnih kiselina kod vrsta *H. repandum* sa različitih lokaliteta bio podjednako zastupljen.

Gljive poseduju veoma efikasan mehanizam koji im omogućava da lako preuzmu minerale iz ekosistema u poređenju sa biljkama koje rastu u sličnim uslovima (Svoboda i sar., 2000). Stoga, one se mogu koristiti direktno u ishrani i promociji zdravlja, imajući prednost u smislu aditivnih i sinergističkih efekata svih prisutnih bioaktivnih jedinjenja (Vaz i sar., 2010; Pereira i sar., 2012).

5.2.8. Biogeni elementi

Na osnovu srednjih vrednosti sadržaja makroelemenata (**Tabela 22**) uočava se da su terikolne vrste statistički značajno bolji akumulatori K^+ u odnosu na analizirane lignikolne vrste. Sa druge strane, srednje vrednosti sadržaja Ca^{2+} i Mg^{2+} približno su iste u lignikolnim i terikolnim vrstama. Kada posmatramo sadržaj K^+ u lignikolnim vrstama vidimo da se i tu izdvajaju dve statistički značajne grupe, pa tako prvoj grupi pripadaju vrste *S. subtomentosum* i *T. versicolor* (2,05 i 1,80 mg/g), dok se u drugu grupu svrstavaju vrste *B. adusta*, *P. porrigens* i *S. hirsutum*. Među terikolnim vrstama sadržaj K^+ i Ca^{2+} statistički se značajno ne razlikuje, dok se prema sadržaju Mg^{2+} izdvajaju dve statistički značajne grupe.

Tabela 22. Sadržaj makroelemenata u plodnim telima ispitivanih gljiva

<i>Vrsta</i>	K^+ mg/g	Mg^{2+} mg/g	Ca^{2+} mg/g
<i>B. adusta</i>	0,56±0,01 ^{c*}	0,55±0,03 ^c	2,64±0,13 ^{b*}
<i>P. porrigens</i>	0,005±0,001 ^c	0,59±0,03 ^{c*}	2,51±0,12 ^b
<i>S. hirsutum</i>	0,02±0,01 ^c	0,54±0,02 ^c	2,52±0,13 ^b
<i>S. subtomentosum</i>	2,05±0,10 ^{b*}	0,69±0,04 ^{b*}	3,04±0,15 ^{a*}
<i>T. versicolor</i>	1,80±0,09 ^b	0,57±0,03 ^c	2,06±0,10 ^{c*}
Lignikolne	0,96	0,60	2,53
<i>A. strobiliformis</i>	14,50±0,72 ^a	0,70±0,04 ^a	2,36±0,12 ^b
<i>H. repandum</i> I	14,59±0,73 ^a	0,56±0,03 ^c	2,46±0,12 ^{b*}
<i>H. repandum</i> II	14,55±0,72 ^a	0,54±0,02 ^c	2,39±0,12 ^b
Terikolne	14,48	0,60	2,40
Srednja vr.	7,72	0,60	2,47

^{a,b,c,d,e} vrednosti u kolonama označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju (Tukey HSD test, $p < 0,01$ i $*p < 0,05$)

U ispitivanim lignikolnim gljivama, od makroelemenata najviše je zastupljen Ca^{2+} čije su se koncentracije kretale od 3,04 mg/g kod vrste *S. subtomentosum* do 2,06 mg/g kod vrste *T. versicolor*, dok je kod terikolnih vrsta najzastupljeniji kalcijum (K^+) sa najvećom koncentracijom kod vrste *H. repandum* I i II (14,59 mg/g i 14,55 mg/g) i najmanjom koncentracijom kod vrste *P. porrigens* (0,005 mg/g). Generalno, u ispitivanim lignikolnim vrstama sadržaj Ca^{2+} je skoro pet puta viši u odnosu na sadržaj K^+ i Mg^{2+} , dok je kod terikolnih vrsta sadržaj K^+ čak 24 puta viši u odnosu na sadržaj Mg^{2+} i 6 puta viši u odnosu na sadržaj Ca^{2+} . Ukoliko poredimo sadržaj elemenata u plodnim telima vrste *H. repandum* sa različitim lokaliteta, uočavamo da je sadržaj sva tri analizirana makroelementa približno isti, odnosno ne postoji statistički značajna razlika među zabeleženim vrednostima.

Sadržaj mikroelemenata značajno varira među analiziranim vrstama (**Tabela 23**). Na osnovu srednjih vrednosti za lignikolne i terikolne vrste uočava se bolja sposobnost akumulacije analiziranih elemenata od strane terikolnih vrsta. Konkretno, srednja vrednost sadržaja Fe^{2+} skoro je pet puta veća u terikolnim nego u lignikolnim vrstama, sadržaj Cu^{2+} tri puta veći u terikolnim vrstama, sadržaj Zn^{2+} i Mn^{2+} skoro dva puta veći, dok je sadržaj Cd^{2+} približno isti za ove dve ekološke grupe gljiva. Treba istaći da su sadržaji Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} i Cd^{2+} dosta varirali među analiziranim vrstama pa se na osnovu toga izdvojilo 6 statistički značajnih grupa, dok su se prema sadržaju Mn^{2+} izdvojile tri grupe: prvu grupu čine sve analizirane lignikolne vrste, drugoj grupi pripadaju vrste *H. repandum* I i II, dok se u posebnu grupu izdvojila vrsta *A. strobiliformis* u kojoj je zabeležen najniži sadržaj pomenutog elementa (9,33 mg/kg).

Kada posmatramo pojedinačne vrste, najbogatiji sadržaj Mn^{2+} i Fe^{2+} imale su vrste *H. repandum* I i II, Zn^{2+} i Cu^{2+} imala je vrsta *A. strobiliformis*, dok je Cu^{2+} najviše bilo u vrsti *H. repandum* I. Analizirane vrste *H. repandum* I i II značajnije su se razlikovale samo prema sadržaju Fe^{2+} i Cd^{2+} .

Tabela 23. Sadržaj mikroelemenata u plodnim telima ispitivanih gljiva

Vrsta	Mn^{2+} mg/kg	Fe^{2+} mg/kg	Zn^{2+} mg/kg	Cu^{2+} mg/kg	Cd^{2+} mg/kg
BA	33,25±1,66 ^b	136,54±6,82 ^e	42,12±2,12 ^{d*}	6,36±0,32 ^{de}	1,48±0,07 ^{d*}
PP	35,43±1,78 ^b	129,29±6,43 ^e	65,62±3,28 ^b	19,27±0,96 ^{c*}	2,18±0,11 ^b
SH	34,24±1,13 ^b	194,84±8,13 ^d	34,14±1,71 ^{e*}	4,83±0,24 ^{e*}	0,90±0,04 ^f
SS	31,23±1,56 ^b	164,79±8,24 ^{de}	15,74±0,79 ^f	8,06±0,40 ^{d*}	0,97±0,05 ^{f*}
TV	32,85±1,64 ^b	60,27±3,03 ^f	11,32±0,57 ^f	1,29±0,06 ^f	1,85±0,09 ^c
Lignikolne	33,45	137,30	31,71	8,36	1,47
AS	9,33±0,47 ^c	354,85±7,75 ^c	81,97±4,09 ^a	38,07±1,91 ^a	1,37±0,07 ^{de}
HR I	80,20±3,23 ^a	893,36±23,66 ^a	47,03±2,35 ^c	22,02±1,12 ^{b*}	2,92±0,15 ^a
HR II	81,35±3,78 ^a	745,24±26,73 ^b	46,27±2,31 ^c	21,54±1,08 ^{bc}	1,22±0,06 ^{e*}
Terikolne	56,96	664,48	58,42	27,21	1,83
Srednja vr.	45,20	400,89	45,06	17,79	1,65

BA - *B. adusta*, PP - *P. porrigens*, SH - *S. hirsutum*, SS - *S. subtomentosum*, TV - *T. versicolor*, AS - *A. strobiliformis*, HR I - *H. repandum* I, HR II - *H. repandum* II; L - lignikolne vrste; T - terikolne vrste;

^{a,b,c,d,e,f} vrednosti u kolonama označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju (Tukey HSD test, $p < 0,01$ i $*p < 0,05$)

6. DISKUSIJA

6.1. Biološka aktivnost

Antiradikalna aktivnost u odnosu na fiziološki relevantne radikalske vrste kao što su OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, NO^\bullet i Asc^\bullet koju su ispoljili ekstrakti analiziranih vrsta gljiva veoma je posebno važna sa medicinskog aspekta. Pored toga, antiradikalna aktivnost ispoljena je i prema vestackim radikalskim vrstama DPPH $^\bullet$ i ABTS $^{\bullet+}$.

OH^\bullet predstavlja najrazorniji, a samim tim i najtoksičniji oblik kiseonika u biološkim sistemima i hrani (Pastor i sar., 2000). Zbog veoma kratkog polu-života *in vivo* (10^{-9} s), može izazvati oksidativna oštećenja skoro svih važnih biomolekula, uključujući polinezasićene masne kiseline, amino kiseline, nukleinske kiseline i proteine (Lipinski, 2011). Molekuli koji mogu da heliraju jone metala čineći ih neaktivnim u Fentonovoj reakciji mogu da deluju kao neutralizatori OH^\bullet (Lipinski, 2011).

Među analiziranim ekstraktima kao najaktivniji antiradikalni agensi prema OH^\bullet pokazali su se MeOH ekstrakti većine analiziranih vrsta u odnosu na H_2O i EtOH ekstrakte, a vrsta koja se pokazala kao najbolji antiradikalni agens spram OH^\bullet radikala bila je *P. porrigens*. Visoka korelacija između anti- OH^\bullet aktivnosti sa jedne strane i ukupnog sadržaja fenola i flavonoida sa druge strane (r^2 0,96 i 0,98, navedenim redom) upućuje na fenolna jedinjenja kao odgovorna za ispoljenu aktivnost. Fenolni profil ekstrakata vrste *P. porrigens* ukazuje nam da je veći broj fenolnih jedinjenja detektovan samo u MeOH ekstraktu. Tako su samo u MeOH ekstraktu (u odnosu na PSH, H_2O i EtOH ekstrakte) vrste *P. porrigens* detektovani flavoni - apigenin, luteolin, krizoeriol, apigenin-7-O-glukozid kao i cimetna i kafena kiselina, što upućuje na ispoljenu aktivnost ovog ekstrakta. U poređenju sa ostalim analiziranim vrstama u ovoj disertaciji, apigenin je prisutan još samo u ekstraktima vrste *T. versicolor* ali sa manjim sadržajem, luteolin je prisutan kod vrste *T. versicolor* i *H. repandum* ali u značajno manjim količinama, krizoeriol je prisutan u MeOH ekstraktu vrste *S. hirsutum* i ekstraktima vrste *T. versicolor*, dok je apigenin-7-O glukozid prisutan u MeOH vrste *H. repandum* i ekstraktima vrste *T. versicolor*. S obzirom da je MeOH ekstrakt vrste *P. porrigens* ispoljio značajno bolju aktivnost i od ekstrakata vrsta koja sadrže neka od pomenutih jedinjenja, to nas navodi na zaključak da je najverovatnije sinergizam ovih flavonoida i fenolnih kiselina odgovoran za najbolju ispoljenu aktivnost MeOH ekstrakta vrste *P. porrigens*. Hidroksilacija na prstenu B flavonoida je presudna za neutralizaciju OH^\bullet (Si i sar., 2011; Tremli i Šmejkal, 2016). Naime, pokazano je da luteolin pokazuje dvostruko veću

aktivnost od apigenina, iako ima samo jednu hidroksilnu grupu više na B prstenu (Si i sar., 2011). Visok sadržaj luteolina u MeOH ekstraktu (10,30 $\mu\text{g/g}$ s.m.) i apigenina (2,54 $\mu\text{g/g}$ s.m.) analizirane vrste *P. porrigens* navodi na zaključak da su upravo ova jedinjenja najvećim delom odgovorna za ispoljenu aktivnost neutralizacije OH^\bullet . Kao dobar anti- OH^\bullet agens pokazala se protokatehininska kiselina čija je aktivnost bila jednaka sa aktivnošću troloksa (Li i sar., 2011). Malo je podataka u literaturi koji opisuju anti- OH^\bullet aktivnost gljiva (Mau i sar., 2002; Ribeiro i sar., 2006; Karaman, 2009; Novaković, 2015; Rašeta, 2016), dok podataka o vrstama analiziranim u ovom radu gotovo da i nema, osim za vrstu *T. versicolor* (Karaman, 2009). Pored toga, vrsta *P. porrigens* odlikuje se i najvišim sadržajem proteina (133,46 mg proteina/g s.m.), pored vrste *A. strobiliformis* (135,83 mg proteina/g s.m.).

Analizirane vrste su pokazale veoma dobru sposobnost neutralizacije $\text{O}_2^{\bullet-}$, koji se smatra primarnim ROS, nastao dodavanjem jednog elektrona molekularnom obliku kiseonika (O_2). Najvećim delom generiše se u mitohondrijama u elektron transportnom lancu, ali može nastati i kao proizvod različitih endogenih enzimskih sistema prisutnih u ćeliji (NADPH i ksantin oksidaze) (Ferreira i sar., 2009). Iako se smatra veoma slabim oksidantom, može učestvovati u stvaranju sekundarnih ROS, kao što je OH^\bullet , bilo direktni ili putem enzimski/metal katalizujućih procesa (Valko i sar., 2005). $\text{O}_2^{\bullet-}$ može biti povezan sa mnogim bolestima, kao što su artritis i Alchajmerova bolest (Kovacic i sar., 2005).

Kao i kod prethodno opisanog testa, najjača anti- $\text{O}_2^{\bullet-}$ aktivnost zabeležena je kod *P. porrigens*. H_2O ekstrakt ispoljio je najnižu IC_{50} vrednost (9,81 $\mu\text{g/mL}$). Kao dobri anti- $\text{O}_2^{\bullet-}$ agensi izdvojili su se i MeOH ekstrakt vrste *H. repandum* (IC_{50} 21,41 $\mu\text{g/mL}$), H_2O ekstrakt *S. hirsutum* (26,65 $\mu\text{g/mL}$) i EtOH ekstrakt *T. versicolor* (IC_{50} 29,62 $\mu\text{g/mL}$). U dostupnoj literaturi nema podataka o anti- $\text{O}_2^{\bullet-}$ aktivnosti pomenutih vrsta. Snažna anti- $\text{O}_2^{\bullet-}$ aktivnost H_2O ekstrakta demonstrirana u radu može biti povezana sa visokim sadržajem polisaharida, koji je u visokoj korelaciji sa antioksidativnom aktivnošću prema $\text{O}_2^{\bullet-}$ radikalu (Li i sar., 2011; Kozarski, 2012).

NO^\bullet je mali molekul koji sadrži jedan nesporeni elektron što ga čini slobodnim radikalom. Generiše se u u biološkim sistemima, delovanjem specifičnog sintaza azot oksida, kao produkt metabolizma arginina (Valko i sar., 2005). Predstavlja snažan reaktivni radikal koji ima ulogu sekundarnog glasnika u velikom broju različitih fizioloških procesa uključujući neurotransmisiju, regulaciju krvnog pritiska, odbrambenom mehanizmu, relaksaciji glatkih mišića i imunološkoj reakciji (Valko i sar., 2005). U ekstracelularnoj sredini NO^\bullet reaguje sa O_2 i H_2O i daje nitratne i nitritne anjone. Prekomerna proizvodnja reaktivnih vrsta azota dovodi do nitrozativnog stresa što dovodi do oštećenja strukture i funkcije proteina. $\text{O}_2^{\bullet-}$ i NO^\bullet , koje tokom inflamacije stvaraju ćelije imunog sistema, reaguju zajedno stvarajući veoma oksidativne molekule, preoksinitritne anjone (ONOO^-). Ekstrakti analiziranih vrsta

ispoljili su dobru anti-NO[•] aktivnost. Kao najbolji neutralizator NO[•] pokazao se MeOH ekstrakt vrste *T. versicolor* (IC₅₀ 12,87 µg/mL). Kod većine vrsta najbolju aktivnost su ispoljili MeOH ekstrakti što ukazuje na manje polarna jedinjenja kao odgovorna za ovu aktivnost. MeOH ekstrakti lignikolnih vrsta generalno su pokazali bolju aktivnost u odnosu na EtOH i H₂O ekstrakte, pri čemu su vrednosti antiradikalske aktivnosti prema NO[•] kod H₂O ekstrakata bili bolji od EtOH kod sledećih vrsta: *B. adusta*, *S. hirsutum* i *S. subtomentosum*. Interesantno je da nasuprot lignikolnim vrstama, kod terikolnih vrsta *A. strobiliformis* i *H. repandum* EtOH ekstrakti pokazali su bolju aktivnost ne samo u odnosu na H₂O, već i na MeOH ekstrakte. U studiji Nowacka i sar. (2015), koja opisuje antiradikalnu aktivnost 31 vrste divljih lignikolnih i terikolnih gljiva nije uočena značajna razlika u aktivnostima između ove dve ekološke grupe gljiva, pri čemu su neke od njih analizirane u ovom radu (*B. adusta* i *S. hirsutum*). Budući da su analizirane terikolne vrste bile sa različitih lokaliteta (Fruška gora, Tara), a ipak su imale sličan tip aktivnosti prema NO[•] može se pretpostaviti da je uticaj neposrednog supstrata (drvo, zemljište) kao i ekološka pripadnost gljive, od značajnog uticaja na sam mehanizam njihove antiradikalske aktivnosti i da upravo u ovom pravcu treba nastaviti buduća istraživanja.

Askorbat (redukovana forma vitamina C) je važan antiradikalni agens i antioksidans u ljudskoj plazmi. On može donirati atom vodonika molekulu slobodnog radikala čime se neutrališe slobodni radikal, dok on sam postaje radikal askorbata (Asc[•]). AscH⁻ se lako regeneriše iz Asc[•] sa NADH ili NADPH-zavisnim reduktazama. Prirodni antioksidansi, poput gljiva odnosno njihove bioaktivne supstance, mogu biti dobri neutralizatori Asc[•]. H₂O ekstrakti analiziranih vrsta gljiva su ispoljile određeni procenat neutralizacije Asc[•], pri čemu se H₂O ekstrakt *S. hirsutum* izdvaja kao najpotentniji agens neutrališući 47 % Asc[•], a zatim i H₂O ekstrakt vrste *H. repandum* 41,65 %. Ranija istraživanja su pokazala da hidrodestilatni ekstrakti vrsta *Fomes fomentarii* i *Schizophyllum commune* u znatnoj meri (50,60 % i 70,40 %, navedenim redom) neutrališu Asc[•] (Glumac i sar., 2016). U literaturi ne postoje podaci koji bi ukazali na anti - Asc[•] potencija analiziranih vrsta gljiva u ovoj disertaciji.

Na osnovu sposobnosti neutralizacije fiziološki relevantnih slobodnih radikala ističu se ekstrakti sledećih vrsta:

- MeOH ekstrakt *P. porrigens* i H₂O ekstrakt *T. versicolor* prema OH[•];
- H₂O ekstrakt vrste *P. porrigens* i MeOH ekstrakt *H. repandum* prema O₂^{•-};
- MeOH ekstrakt *T. versicolor* prema NO[•];
- H₂O ekstrakt *S. hirsutum* prema Asc[•].

Na osnovu ispoljenih aktivnosti može se primetiti da su najpotentniji bili H₂O i MeOH ekstrakti što navodi na pretpostavku da su najbolji antiradikalni agensi uglavnom polarna i

manje polarna jedinjenja. Među analiziranim vrstama kao najbolji antiradikalni agens ističu se lignikolne vrste *P. porrigens* i *T. versicolor*.

DPPH[•], protonovani je radikal, koji ima specifičnu maksimalnu apsorbanču na 517 nm, koja se smanjuje neutralisanjem proton radikala. Najbolju anti-DPPH[•] ispoljio je MeOH ekstrakt *S. subtomentosum*. Pozitivna korelacija između anti-DPPH[•] aktivnosti i ukupnog sadržaja fenola potvrđena je u mnogim studijama (Oki i sar., 2002; Singh i sar., 2008). Iako dobijene korelacije anti-DPPH[•] aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola i ukupnih flavonoida kod analiziranih gljiva nisu bile jako visoke (r^2 0,83 i 0,84, navedenim redom), raznovrsnost i sadržaj fenolnih jedinjenja koja su detektovana HPLC/MS-MS analizom u MeOH ekstraktu *S. subtomentosum* pokazuju visoku sposobnost neutralizacije DPPH[•]. MeOH ekstrakt vrste *S. subtomentosum* ima najveći sadržaj fenolnih jedinjenja (747,70 µg/g s.m.) i od toga najveći sadržaj fenolnih kiselina (375,40 µg/g s.m.) među analiziranim ekstraktima. Kampferol koji je detektovan samo u MeOH ekstraktu *S. subtomentosum* (16,50 µg/g s.m.) i prisutan još samo u ekstraktima vrste *T. versicolor* ali sa znatno manjim sadržajem (1,58 - 2,15 µg/g s.m.), pokazao je vrlo visoku aktivnost neutralizacije DPPH[•] (92,61 % pri konc. 25 µg/mL) (Singh i sar., 2008). Pored toga, najveći sadržaj protokatehinske (207,00 µg/g s.m.) i galne kiseline (104,00 µg/g s.m.) u odnosu na analizirane ekstrakte svih ostalih vrsta najverovatnije je odgovoran za postignutu aktivnost. Ranija istraživanja su potvrdila jaku anti-DPPH[•] aktivnost galne kiseline (IC₅₀ 29,5 µM) (Yen i sar., 2002; Sroka i Cisowski, 2003; Badhani i sar., 2015). Protokatehinska kiselina je takođe pokazala veoma dobru anti-DPPH aktivnost sa IC₅₀ 1,18 µg/mL (Li i sar., 2011).

Poredeći lignikolne i terikolne vrste generalno prema ispoljenoj antiradikalnoj aktivnosti, utvrđeno je da ne postoji značajna razlika među ovim ekološkim grupama gljiva. Jedinu dostupni podaci o aktivnosti vrste *B. adusta* dobijeni su u studiji Nowacka i sar. (2015) gde je vrsta *B. adusta* ispoljila antiradikalnu aktivnost pri koncentraciji IC₅₀ 16,87 mg/mg DPPH[•]. U literaturi postoje podaci koji potvrđuju anti-DPPH[•] aktivnost vrste *P. porrigens* poreklom iz Nigerije, sa 63,37 % neutralizacija DPPH radikala (Okoro, 2012). Ebrahimzadeh i sar. (2010) u svojoj studiji beleže aktivnost MeOH ekstrakta vrste *P. porrigens* poreklom iz Irana. Analizirani ekstrakti *S. hirsutum* pokazali su znatno bolju aktivnost neutralizacije DPPH[•] (IC₅₀ H₂O-46,41, MeOH-58,60 i EtOH-216,74 µg/mL) u poređenju sa aktivnošću koja je dobijena za etil-acetatni ekstrakt vrste *S. hirsutum* poreklom iz Čilea (IC₅₀ 768,20 µg/mL) (Torres i sar., 2016). Dobijene vrednosti ukazuju da su H₂O i MeOH bolji rastvarači za jedinjenja sa anti-DPPH[•] aktivnošću. To potvrđuje i MeOH ekstrakt analizirane vrste *S. subtomentosum* koji je postigao anti-DPPH[•] pri veoma niskoj koncentraciji (IC₅₀ 4,60 µg/mL), koji je ujedno i najbolji među analiziranim ekstraktima svih ispitivanih vrsta. Međutim, literaturni podaci ukazuju na slabiju aktivnost MeOH ekstrakt vrste *S.*

subtomentosum (IC₅₀ 239,30 µg/mL) (Karaman i sar., 2010) u odnosu na analiziranu vrstu u ovoj disertaciji. Objašnjenje za ovako različite „odgovore“ istih vrsta svakako može biti razlika u hemijskom sastavu ovih vrsta, a pre svega u njihovom fenolnom profilu koji je posledica različitog porekla samih izolata čija su plodna tela analizirana, a na koja značajno utiču mikroklimatski i drugi ekološki faktori (sastav supstrata, biocenoze, itd.).

ABTS test predstavlja drugu liniju antiradikalne odbrane ekstrakata preko supresije inicijacije ili propagacije lančanih reakcija (Sheena i sar., 2003). Karakteristika ABTS testa je da ekstrakt deluje ili po mehanizmu inhibicije ili „hvatanja“ ABTS^{•+} radikala (Ferreira i sar., 2009). Najbolju anti-ABTS^{•+} ispoljili su H₂O i MeOH ekstrakti, dok su PSH ekstrakti ispoljili najslabiju sposobnost neutralizacije ABTS^{•+}. Na osnovu toga, može se pretpostaviti da polisaharidi nisu u znatnoj meri odgovorni za ispoljene aktivnosti, iako je poznato da oni pokazuju sposobnost neutralizacije ABTS^{•+} (Zhang i sar., 2015). Na osnovu biohemijskog sastava samih ekstrakata odnosno primenjenih rastvarača prilikom njihove pripreme, očekuje se da bi jedinjenja koja su odgovorna za ispoljavanje ove aktivnosti mogla da budu više polarna jedinjenja. Budući da je najbolju aktivnost ispoljio H₂O ekstrakt vrste *B. adusta* odgovorno fenolno jedinjenje mogla bi da bude gentistinska kiselina čija je anti-ABTS^{•+} aktivnost potvrđena ranije (IC₅₀ 15,562 µM) (Biskup i sar., 2013).

Antioksidativna aktivnost ekstrakata analiziranih gljiva, pored antiradikalne aktivnosti (detaljno opisane u prethodnom tekstu), procenjena je i na osnovu njihove sposobnosti da redukuju Fe³⁺ jona, kao i primenom HPMC metode.

U istraživanju sprovedenom od strane Tanaka i sar. (1988) utvrđeno je da je antioksidativna aktivnost u korelaciji sa porastom redukcione sposobnosti. Stoga su sprovedena ispitivanja redukcione sposobnosti svih analiziranih ekstrakata gljiva, na osnovu FRAP testa. Najbolju redukcionu sposobnost ispoljili su PSH ekstrakti analiziranih vrsta. Prema literaturnim podacima, PSH ekstrakti *G. lucidum* i *P. linteus* imaju dobru redukcionu sposobnost pri čemu je zapazena visoka korelacija između dobijenih aktivnosti i ukupnog sadržaja glukana i fenola (Kozarski i sar., 2011). Na osnovu fenolnog profila i FTIR analize utvrđeno je da su u PSH ekstraktima prisutna fenolna jedinjenja. Smatra se da bi upravo polisaharidno-fenolni kompleksi mogli biti odgovorni za dobru redukcionu sposobnost PSH ekstrakata (Kozarski i sar., 2011). To bi mogao da bude slučaj i sa PSH ekstraktima analiziranim u ovom radu. Najbolji redukcionu potencijal ispoljio je PSH ekstrakt *A. strobiliformis*, na osnovu čijeg fenolnog profila uočavamo samo sadržaj hininske kiseline (33,50 µg/g s.m.), kao i na osnovu FTIR spektra na kome se uočavaju trake u oblasti 1410 – 1310 cm⁻¹ specifične za OH grupe fenolnih jedinjenja. Na redukcionu sposobnost PSH ekstrakata utiče i sadržaj monosaharida. PSH ekstrakti sa većim sadržajem glukoze i manjim

sadržajem ksiloze i galaktoze pokazuju bolju redukcionu sposobnost (Zhang i sar., 2015). PSH ekstrakt vrste *A. strobiliformis* kao najdominantniju monosaharidnu komponentu sadrži upravo glukozu, dok je sadržaj galaktoze znatno manji a ksiloza se nalazi samo u tragovima.

EtOH ekstrakt vrste *Polypous squamosus*, koja je prema taksonomskoj pripadnosti (fam. Polyporaceae) slična analiziranoj vrsti *T. versicolor* (Dimitrijević i sar., 2015) pokazao je manju aktivnost (51,94 mg ekv. troloksa/g s.m) u odnosu na ispitivani EtOH ekstrakt *T. versicolor* (94,74 mg ekv. troloksa/g s.m.). Analizirana vrsta *A. strobiliformis* može se uporediti sa vrstom *Amanita caesarea* (fam. Amanitaceae) analiziranom u okviru prethodno pomenute studije, čiji je EtOH ekstrakt ostvario nešto veći potencijal neutralizacije ABTS radikala (74,98 mg ekv. troloksa/g s.m.). Ovakvi rezultati su u suprotnosti s onima dobijenim prilikom ispitivanja različitih lignikolnih i terikolnih vrsta makrogljiva sa područja Istočne Srbije (okolina Zaječara), gde su EtOH ekstrakti ispoljili bolji redoks potencijal u odnosu na H₂O ekstrakte (Novaković, 2015), kao i sa literaturnim podacima za lignikolne vrste poreklom sa Fruške Gore *F. fomentarius* i *M. giganteus* (Karaman, 2009) kod kojih su EtOH ekstrakti pokazali jači redoks potencijal u odnosu na MeOH., što je u skladu sa rezultatima dobijenim u radu koji proučava autohtone lignikolne vrste roda *Ganoderma* (Rašeta, 2016).

Na osnovu merenja antioksidativne aktivnosti, odnosno redukcionne sposobnosti HPMC metodom, najveću aktivnost imaju MeOH i H₂O ekstrakti što ukazuje da su polarna jedinjenja odgovorna za ispoljenu aktivnost. Na osnovu korelacije između rezultata HPMC metode sa jedne strane i ukupnog sadržaja fenola (UF) i flavonoida (Ufl) sa druge strane (0,75 i 0,84, navedenim redom) može se zaključiti da Ufl više od UF doprinose ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti. To je potvrđeno i analizom čistih fenolnih supstanci, gde se aktivnošću ističu flavonoidi u odnosu na fenolne kiseline (Sužnjević i sar., 2015). U pomenutom radu ističe se da hidrosibenzojeve i cimetine kiseline, kao jedinjenja sa jednom slobodnom OH grupom, imaju nisku antioksidantnu aktivnost, što je potvrđeno i MRAP i HPMC metodama. Ono što je dominantno u svim ekstraktima koji su ispoljili visoku antioksidativnu aktivnost jeste hininska kiselina. Hininska kiselina koja ima četiri slobodne OH grupe mogla bi da predstavlja dobar antioksidans, međutim u organizmu se brzo metaboliše, što su pokazale analize različitih seruma u kojima nije bilo pomenute kiseline (Pero, 2009). Pored hininske kiseline, u ekstraktima vrste *A. strobiliformis* prisutan je i biflavonoid amentoflavon, ali i kod većine ekstrakata svih analiziranih vrsta. Fenolni profil H₂O ekstrakta vrste *A. strobiliformis* ne ističe se prema sadržaju ni prema raznovrsnosti detektovanih jedinjenja. Stoga pretpostavka je da pored fenolnih jedinjenja antioksidativnoj aktivnosti doprinose i druga jedinjenja. To bi svakako mogli da budu polisaharidi čija je antioksidativna aktivnost dosta opisivana (Kozarski i sar., 2012; Ren i sar., 2014), ali i proteini na osnovu čijeg se ukupnog sadržaja vrsta *A. strobiliformis* ističe kao najbogatija (135,83 mg

proteina/g s.m.). Pored toga, detektovane organske kiseline - jabučna i propionska mogle bi da doprinesu ispoljenoj aktivnosti.

Antimikrobna aktivnost

Uzrok veće otpornosti Gram-negativnih bakterija koja je potvrđena i našim rezultatima, najverovatnije je složena građa ćelijskog zida koji, za razliku od ćelijskog zida Gram-pozitivnih bakterija, sadrži lipopolisaharidni sloj održavajući površinu ćelije visoko hidrofилnom. Na taj način onemogućava se prodiranje hidrofobnim jedinjenjima kao što su steroli i terpeni koji mogu biti prisutni u analiziranim ekstraktima (Karaman i sar., 2009).

U literaturi se ističe antibakterijska aktivnost EtOH ekstrakta lignikolne vrste *B. adusta*, prema Gram-pozitivnim (*S. epidermidis*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus*) i Gram-negativnim (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*) bakterijama sa rasponom MIC vrednosti od 1,25 do 5 mg/mL (Nowacka i sar., 2015).

U radu Levy i sar. (2000) jedinjenja izolovana iz ekstrakta micelije vrste *B. adusta* u potopljenoj kulturi, potvrđeno je da imaju antibakterijsku aktivnost prema Gram-pozitivnim sojevima. Metaboliti plodnog tela gljiva obično se razlikuju od produkata metabolizma koje micelija proizvodi u tečnom medijumu, s obzirom da hemijski sastav gljiva u znatnoj meri zavisi od sastava supstrata (Kim i sar., 2008; Karaman i sar., 2012). S tim u vezi, ispitivanje potopljenih kultura (rast micelije u kontrolisanim uslovima, sa tačno definisanim hemijskim sastavom podloge) predstavlja korak dalje u sagledavanju njihove bioaktivnosti.

Dva sterola 5 α ,8 α -endoperoxid, izolovana iz vrste *S. hirsutum* (Bu i sar., 2014), ispoljila su aktivnost prema referentnom soju *M. tuberculosis* H37Rv sa MIC-om na 16 μ g/mL (Cateni i sar., 2007). U radu Nowacka i sar. (2015) istaknuto je antibakterijsko delovanje *S. hirsutum* prema Gram-pozitivnim (*S. epidermidis*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus*) i Gram-negativnim (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*) bakterijama čije su se MIC vrednosti kretale od 2,5 do 5 mg/mL. U studiji sprovedenoj od strane Hleba i sar. (2014) MeOH ekstrakt vrste *T. versicolor* ispoljio je aktivnost prema Gram-negativnim sojevima, dok za Gram-pozitivne sojeve antimikrobna aktivnost nije određena u ispitivanom opsegu koncentracija. Međutim, istraživanja sprovedena u studiji Karaman i sar. (2009) ukazuju na veoma dobru antibakterijsku aktivnost MeOH ekstrakta pomenute vrste čije su se vrednosti MIC kretale od < 0,017 do 2,25 mg/mL, kako prema Gram-negativnim tako i prema Gram-pozitivnim sojevima.

MeOH ekstrakt *T. versicolor* inhibiše rast *Bacillus sp.* (Karaman i sar., 2010), dok je *S. aureus* bio osetljiv na MeOH ekstrakte, kao i etil acetatne, dihlormetanske i acetonske ekstrakte (Yamaç i Bilgili, 2006; Karaman i sar., 2010). U studiji Chu i sar. (2002) navodi se da seskviterpen, koriolan, izolovan iz vrste *C. versicolor*, inhibira rast Gram-pozitivnih bakterija. Pored toga, Alves i sar. (2013) testirali su antimikrobnu aktivnost fenolnih jedinjenja

identifikovanih u gljivama, pri čemu su *S. aureus*, *S. epidermidis* i *L. monocitogenes* inhibirani pretpostavlja se, od protokatehinske i kafeinske kiseline koje su detektovane u plodnom telu *C. versicolor* (MIC 1 mg/mL). Rezultati dobijeni u studiji Matijašević i sar. (2016) pokazali su da su Gram-pozitivne bakterije bile osetljive na MeOH ekstrakt *C. versicolor*, dok su utvrđene vrednosti MIC za *Staphylococcus sp.* i *B. cereus* varirale od 0,625 do 5 mg/mL za *C. versicolor* ekstrakt. U pomenutoj studiji, bile su potrebne veće koncentracije MeOH ekstrakta da bi inhibirale rast Gram-negativnih bakterija (MIC vrednosti u 2,5 do 20 mg/mL) (Matijašević i sar., 2016). Prema drugim literaturnim podacima, Gram-negativne bakterije *E. coli*, *S. flexneri* i *P. mirabilis* bile su rezistentne, dok se *S. enteritidis* pokazala veoma osetljivom na isti tip MeOH ekstrakta *C. versicolor* (Karaman i sar., 2010). *P. aeruginosa* inhibira samo acetatni ekstrakt ove gljive, ali utvrđena zone inhibicije (< 10 mm) ukazuje na njegov slab efekat (Yamaç i Bilgili, 2006).

Antibakterijska aktivnost EtOH ekstrakta vrste *H. repandum* potvrđena je primenom disk difuzione metode u radu Yamaç i Bilgili (2006) i to prema soju *B. subtilis*, dok antibakterijsko dejstvo na *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, nije ispoljeno. Sa druge strane, u studiji Ozen i sar. (2011), MeOH ekstrakt vrste *H. repandum* je pokazao najjaču antibakterijsku aktivnost prema *P. aeruginosa* u poređenju sa *Bacillus cereus* i *S. aureus*. Ovakav trend potvrđuju i naša istraživanja gde je upravo soj *P. aeruginosa* bio najosetljiviji kada je u pitanju MeOH ekstrakt (MIC - 1,25 mg/mL). Ekstrakti testiranih gljiva sadrže mnogo jedinjenja koja mogu da deluju sinergistički, tako da nije moguće sa sigurnošću tvrditi koje komponente su odgovorne za uočene efekte različitih ekstrakata. Ipak, pretpostavlja se da antibakterijska aktivnost koju ekstrakti gljiva pokazuju mogu biti povezani sa sveukupnim efektom terpenoida kao i fenolnih jedinjenja (Karaman i sar., 2009). Uočena antibakterijska aktivnost rezultat je razlika u bioaktivnim komponentama nepolarne (hemijske) prirode kako između ekstrakata, tako i između samih vrsta (Karaman i sar., 2009). U revijalnom radu Alves i sar. (2012) dat je pregled brojnih studija koji su u potpunosti fokusirani na ispitivanja antibakterijske aktivnosti ekstrakata gljiva. Zapravo, postoji jaz u identifikaciji pojedinačnih jedinjenja odgovornih za ispoljene aktivnosti, i opisano je samo nekoliko jedinjenja malih molekulskih masa, kao i neki peptidi i proteini. To bi mogla da ukaže na sinergizam prisutnih jedinjenja u samim ekstraktima što se nije dovoljno istraživalo pa bi smernice u daljim istraživanjima njihove antimikrobne aktivnosti trebalo usmeriti u tom pravcu.

Druga istraživanja navode da postoji veza između antimikrobne aktivnosti i sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja koja se nalaze u ekstraktu (Barros i sar., 2007). Takođe je utvrđeno da različite bakterijske kulture pokazuju različitu osetljivost prema fenolima (Puupponen-Pimia i sar., 2001). Ipak, kod nekih vrsta, jedno fenolno jedinjenje ili grupa fenolnih jedinjenja, koja ne moraju nužno biti prisutna u velikoj količini, ili druge grupe

jedinjenja koje uključuju seskviterpenoide i peptide mogu da deluju kao potencijalni antimikrobni agensi (Barros i sar., 2007). Postoje druga jedinjenja, kao što su steroidi, oksalna kiselina, seskviterpenoidi i epipolitiopiperazine-2,5 dioni izolovani iz gljiva, za koje je dokazano da poseduju antimikrobno dejstvo (Lindequist i sar., 2005). Analiziranjem antibakterijske aktivnosti ekstrakata gljiva, generalni zaključak je da su Gram-pozitivne bakterije osetljivije što potvrđuju brojna istraživanja (Barros i sar., 2007; Barros i sar., 2008; Alves i sar., 2012). Nasuprot tome su rezultati koje su dobili Ozen i sar. (2011), a koji navode da je MeOH ekstrakt *H. repandum* imao maksimalnu antibakterijsku aktivnost prema Gram-negativnoj bakteriji (*Pseudomonas aeruginosa*) pri koncentraciji 1,25 mg/ mL što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj studiji.

Antifungalna aktivnost - Prema studiji Aqueveque i sar. (2016) MeOH ekstrakti dve vrste roda *Stereum* su pokazali slabu antifungalnu aktivnost, gde je od 36 sojeva samo 7 ispoljilo veoma slabu antifungalnu aktivnost prema fitopatogenoj gljivi *B. cinerea*. U ovom radu MeOH ekstrakt vrste *S. subtomentosum* ispoljio je dobar antifungalni efekat prema svim analiziranim fitopatogenim gljivama. U radu Yamaç i Bilgili (2006) ističe se visoka antifungalna aktivnost koju je ispoljio EtOH ekstrakt vrste *H. repandum*, što je u saglasnosti sa rezultatima koje smo dobili u ovoj studiji za izolate roda *Fusarium* (MIC/MFC 24,75 mg/mL). U preglednom radu Alves i sar. (2013) navode se proteini i polisaharidi izolovani iz gljiva za jedinjenja koja ispoljavaju antifungalnu aktivnost. Takođe, oni navode aktivnost kako samih ekstrakata, tako i izolovanih jedinjenja poreklom iz gljiva sa antimikrobnom aktivnošću.

Antivirusna aktivnost - Među vrstama koje su analizirane u ovom radu, u dostupnoj literaturi postoji podatak samo o antiviralnoj aktivnosti vrste *T. versicolor*. Naime, ekstrakt micelije pomenute vrste ispoljio je aktivnost na virus influence tipa A (H1N1) i herpes simplex virus (Krupodorava i sar., 2014). Ono po čemu se izdvaja vrsta *T. versicolor* u odnosu na ostale analizirane gljive, svakako je bogat fenolni sadržaj (**Tabela 16**). U prilog tome govore i istraživanja koja su potvrdila antiviralno dejstvo različitih grupa flavonoida (flavona, flavonola, flavanona i flavanola) prema različitim tipovima virusa (Lani i sar., 2016; Zakaryan i sar., 2017).

Iako većina ispitivanih ekstrakata nije ispoljila antiviralnu aktivnost, osim MeOH ekstrakata vrste *T. versicolor* (98,31±0,6 %) i *S. subtomentosum* (50,68±7,66 %), oni bi se eventualno mogli iskoristiti (zajedno sa fagima) kao antibakterijski agensi. Pre toga je naravno neophodno ispitati njihovo eventualno sinergističko delovanje.

B. bronchiseptica fag pokazuje visok stepen otpornosti na nepovoljne uslove sredine. On zadržava infektivnost pri širokom temperaturnom (4 – 65 °C) i pH opsegu (3 - 11) (Petrović-Fabijan, 2017). Zatim, pokazuje visok stepen stabilnosti u veoma širokom opsegu koncentracija NaCl-a (i do 7,5-10 %) i uree (do 7,5 M). S obzirom na visok stepen rezistencije na nepovoljne uslove sredine, ispitivani fag uzet je kao model virus pri ispitivanju virucidnog efekta različitih agenasa, kao i ekstrakata gljiva. Na osnovu iznetih činjenica jasno je da je test organizam bio visoko rezistentan virus, što takođe može da bude uzrok za ispoljene lošije aktivnosti ekstrakata analiziranih gljiva. Na inaktivaciju analiziranog faga, utvrđena je aktivnost EtOH ekstrakta, rastvorenog u DMSO-u, vrste *Ganoderma pfeifferi*, koji je pri koncentraciji od 50 mg/mL inaktivirao 84,01 % viriona (Rašeta, 2016). Pretpostavka autora je da su nepolarna jedinjenja (rastvorena u DMSO-u) odgovorna za ispoljenu aktivnost. Sa druge strane, mnogi autori smatraju da su polarna jedinjenja poput polisaharida odgovorna za ispoljavanje antivirusne aktivnosti (Amaral i sar., 2008; Nie i sar., 2013), koji se rastvaraju u vodi. Međutim, testirani H₂O ekstrakti u ovoj tezi nisu ispoljili antivirusno delovanje. Pretpostavka je da su odgovorna manje polarna jedinjenja poput fenola čiji je sadržaj bio najveći upravo u MeOH i EtOH ekstraktima koji su ispoljili antivirusno delovanje.

Međutim, na osnovu FTIR analize PSH ekstrakata vidimo da su za polisaharide vezana i druga jedinjenja, kao što su proteini i fenoli, pa je pretpostavka da bi kompleksi polisaharidno-proteinski i polisaharidno-fenolni takođe mogli da budu odgovorni za antiviralnu aktivnost.

Anti-AChE aktivnost - Prema najvećem postignutom % inhibicije AChE izdvaja se EtOH ekstrakt vrste *S. hirsutum*, čija je aktivnost veoma bliska aktivnosti donepezila (komercijalnog terapeutika), zatim vrste *B. adusta* i *S. subtomentosum*. Ono što je zanimljivo primetiti jeste da fenolni profili pomenutih vrsta u značajnoj količini sadrže hidroksibenzojeve kiseline. Naime, iz literature je poznato da fenolna jedinjenja ispoljavaju veoma dobru aktivnost inhibicije AChE (Murray i sar., 2013; Zhang i sar., 2014; Balkish i sar., 2015; Szwajgier, 2015). Poznato je da *p*-hidroksibenzojeva kiselina (prisutna u svim ispitivanim ekstraktima) pokazuju pomenutu bioaktivnost (Murray i sar., 2013; Szwajgier, 2015) pri čemu Murray i sar. (2013) pored *p*-hidroksibenzojeve kiseline, ističu i aktivnost galne kiseline (IC₅₀ 5,85 μM). Među ispitivanim vrstama, u literaturi postoji podatak samo za vrstu *T. versicolor* (Orhan i Üstün, 2011), što dobijene rezultate vezane za sve ostale analizirane gljive u ovoj tezi čini novim za nauku i dragoceni putokazima za dalja istraživanja. Analizirani EtOH ekstrakt (44,35 %, na 500 μg/mL) pokazao je dva puta veću AChE inhibitornu aktivnost u poređenju sa *T. versicolor* EtOH ekstraktom prethodne studije (28,35 %, pri istoj koncentraciji). Ispitivanjem AChE

inhibitorne aktivnosti različitih fenolnih jedinjenja, Balkis i sar. (2015) pronašli su flavon - baikalein kao najveći potencijalni inhibitor AChE. Zatim, flavoni - apigenin i baikalein, kao i flavonoli - kampferol i kvercetin ispoljili su izrazio inhibitorni efekat preko 90 % na 100 μ M. Pored toga, izoflavonoid - daidzein je takođe inhibirao odgovarajući enzim, u manjem obimu. U studiji Zhang i sar. (2014) zabeležena je inhibitorna koncentracija kvercetina pri koncentraciji od 40 μ g/mL (58,80 %). Međutim, nisu svi polifenoli aktivni protiv AChE, neki od njih imaju suprotan efekat. Na primer, kafena kiselina povećava AChE aktivnost (Rezg i sar., 2008). Prisustvo ove hidroksibenzojeve kiseline u nekim ekstraktima moglo bi da objasni njihovo slabije delovanje na inhibiciju AChE. Nekoliko prirodnih polifenola, efikasno su smanjili nakupljanje i koncentracije A β proteina u mozgu i serumu, pokazujući obećavajuće anti-amiloidogene efekat (Vislocky i Fernandez, 2010; Ray i sar., 2011). Utičući na formiranje amiloidnih plaka, i mikroelementi, metali, imaju značajno mesto u progresiji AB. S tim u vezi, veoma je važno uzeti u obzir sadržaj bakra u plodnim telima gljiva. Bakar je metalni jon koji ima važnu ulogu u patogenezi AB, a poremećena homeostaza bakra je direktni ili indirektni uzrok oksidativnog stresa. Dva mehanizma su uključena u oksidativni stres posredovan bakrom: poremećaji ceruloplazmina i interakcija bakra sa A β . Naime, kompleks bakra i A β je najvažniji izvor H₂O₂ koji redukujući Cu²⁺ u Cu⁺ dovodi do proizvodnje HO[•] radikala (Jovanović, 2012).

Pored navedenih prednosti analizirane vrste *S. hirsutum*, *B. adusta* i *S. subtomentosum* predstavljaju povoljan izvor potencijalnih agenasa sa anti-AChE aktivnošću, budući da imaju i nizak sadržaj bakra.

Citotoksična aktivnost - Iako većina studija navodi antitumorsko delovanje polisaharida izolovanih iz plodnih tela i micelija gljiva (Wasser, 2002; Moradali i sar., 2007; Zhang i sar., 2007), postoje i druga jedinjenja koja ispoljavaju pomenutu aktivnost. Naime, brojne studije su opisale antiproliferativno delovanje različitih proteina (Ngai i Ng, 2003; Xu i sar., 2011), terpenoida (Harhaji i sar., 2008), kao i fenolnih jedinjenja (Rao i sar., 2012; Badhani i sar., 2015; Sung i sar., 2016).

Kako su brojne studije dokazale citotoksičnu aktivnost fenolnih jedinjenja (Badhani i sar., 2015; Lam i sar., 2016; Sung i sar., 2016), a u analiziranim ekstraktima jesu detektovane raznovrsne grupe fenolnih kiselina i flavonoida (**Tabele 12-18**), pretpostavka je da bi upravo ova jedinjenja mogla biti odgovorna za ispoljenu aktivnost.

Najbolja citotoksična aktivnost dobijena za H₂O ekstrakt vrste *B. adusta* može se dovesti u vezu sa prisustvom gentisinske kiseline (2,5-dihidroksibenzojeve kiseline) koja je detektovana samo u pomenutom ekstraktu, dok u ostalim vrstama nije detektovana (**Tabela 12**). Budući da je dokazano da galna kiselina (trihidroksibenzojeva kiselina) ima snažan citotoksični efekat (Badhani i sar., 2015), možemo pretpostaviti da sličan efekat ima i

dihidroksibenzoeva kiselina detektovana u analiziranom uzorku vrste *B. adusta*. Pored toga i ostale hidroksibenzoeve kiseline (p-hidroksibenzoeva i protokatehinska), prisutne u H₂O ekstraktu ove vrste, poseduju citotoksičnu aktivnost. Tačnije, dokazano je da protokatehinska kiselina, prisutna u svim analiziranim vrstama, indukuje ćelijsku smrt HepG2 ćelija (Yip i sar., 2006). U studiji Yeh i Yen (2006) podržavaju hipotezu da dijetetski polifenoli povećavaju ekspresiju enzima koji mogu efikasno inhibirati razne oblike kancerogeneze kao i hemijski indukovana oštećenja ćelija.

Pored mogućeg citotoksičnog efekta fenolnih jedinjenja, na ispoljavanje ove aktivnosti pretpostavljamo da utiču i masne kiseline. Naime, *B. adusta* ima najveći sadržaj palmitinske kiseline (**Tabela 21**), za koju je dokazano da indukuje ćelijsku smrt humanih hepatoma ćelija - SMMC 7721 i HepG2 (Tu i sar., 2014). U ovoj tezi je po prvi put opisana citotoksična aktivnost ekstrakata vrste *B. adusta* prema ćelijskoj liniji HepG2. Naime, do sada je ispitivan citotoksični efekat EtOH ekstrakta pomenute vrste prema drugim ćelijskim linijama - ćelijama epitela creva HT-29 i Caco-2 (Dokocil i sar., 2016).

Prema najnižoj dobijenoj vrednosti IC₅₀ izdvojio se MeOH ekstrakt vrste *P. porrigens* (nakon 72 h tretmana), čiji je fenolni profil dokazao prisustvo flavona - apigenina i luteolina za koje pretpostavljamo da su odgovorna jedinjenja za ispoljenu aktivnost na osnovu literaturnih podataka. Luteolin je prisutan u MeOH ekstraktu vrste *H. repandum* (9,65 µg/g s.m.) koji je pri najvišim koncentracijama ekstrakta (900 µg/mL) ispoljio visoku citotoksičnost > 90 %, kao i u ekstraktima vrste *T. vericolor* ali u znatno nižoj koncentraciji (1,05-2,01 µg/g s.m.) što se odrazilo i na manje izraženu citotoksičnost (**Slika 38**).

Pored navedenih jedinjenja, prisustvo hidroksibenzoeve **galne kiseline**, u ekstraktima vrsta *B. adusta*, *S. hirsutum*, *S. subtomentosum* i *T. versicolor*, mogla bi da bude odgovorna za ispoljenu citotoksičnu aktivnost pomenutih vrsta (Badhani i sar., 2015).

Ekstrakti ispitivanih gljiva su pokazala znatnu citotoksičnu aktivnost, dok su na bakterije pokazala selektivno delovanje. S toga smatramo da bi delovanje ekstrakata gljiva koji ispoljavaju citotoksičnu aktivnost sa jedne strane, a ne utiču na bakterijsku floru crevnog trakta sa druge strane, bili povoljni u dizajniranju novih antitumorskih agenasa.

Antibakterijska i citotoksična aktivnost - Poslednjih nekoliko godina velika pažnja se posvećuje proučavanju mogućnosti modulacije bakterijske zajednice crevnog trakta ljudi, kao strategije za poboljšanje kliničke efikasnosti hemijske, radio i imunoterapije antikancerogena (Karin i sar., 2014; Zitvogel i sar., 2015; Alexander i sar., 2017). Zapravo, promene u interakcijama između crevnog mikrobioma, crevnog epitela i imunološkog sistema domaćina, povezane su sa mnogim bolestima uključujući i kancer. Manipulacija

mikroorganizmima može poboljšati kliničku aktivnost antikancerogenih agenasa (Zitvogel i sar., 2015).

Poznato je da su bakterije crevnog trakta u ravnoteži sa domaćinom. S jedne strane, creva bakterijama nude zaštićeno i toplo mikrostanište, bogato hranljivim materijama, dok bakterije sa druge strane, pomažu domaćinu u varenju složenih ugljenih hidrata, obezbeđuju esencijalne faktore i zauzimaju ekološke niše, sprečavajući na taj način da ih nasele patogeni mikroorganizmi (Schwabe i Jobin, 2013). Za normalan rad imunog sistema neophodne su bakterije (Maynard i sar., 2012). Narušavanje ravnoteže mikrobionta - domaćin utiče na onkogenezu, progresiju tumora i reakciju na terapiju. Prema tome, selektivno manipulisanje mikrobiontima predstavlja način na koji se može ograničiti učestalost specifičnih tumora, ali i poboljšati aktivnost (efikasnost) različitih antikancerogenih agenasa (Holmes i sar., 2012). Postoje pretpostavke da se upotreba hemoterapeutika u kliničke svrhe može poboljšati kombinovanom upotrebom jednog ili više antibiotika, prebiotika, probiotika i postbiotika (Zitvogel i sar., 2015). U pomenutom smislu, mogli bi se iskoristiti ekstrakti vrsta koji nisu ispoljili antibakterijsku aktivnost, a pokazali su određeni procenta citotoksičnosti.

6.2. Hemijski sastav gljiva

Sadržaj proteina u gljivama zavisi od više faktora kao što su vrsta gljive, stepen razvoja, mesto uzorkovanja, nivo raspoloživog N i lokacija (Kozarski, 2012). Dobijene vrednosti za azot ukazuju na prisustvo proteina, ali i na azot neproteinske prirode, zbog čega je kod gljiva određivanje sadržaja proteina na osnovu sadržaja ukupnog azota vezano za konverzioni faktor 4,38 prema Kjeldahl metodi (Obodai i sar., 2014).

Gljive proizvode razne **proteine**, kao što su lektini, ribonukleaze, ubikvitinu slični proteini, hemolizini, kao i peptide koji pokazuju različite biološke aktivnosti, uključujući antimikrobnu, antiparazitsku, antiproliferativnu, antitumorsku, imunomodulatornu i ribozom-inaktivirajuću aktivnost (Erjavec i sar., 2012). Najviše opisanu grupu proteina iz gljiva čine lektini. Lektini su ugljenohidrat – vezujući proteini neimunološkog porekla koji aglutiniraju ćelije ili precipitiraju polisaharide ili glikokonjugate (Kawagishi i sar., 1997). Ranije studije su pokazale da lektini ispoljavaju veliku hemijsku raznovrsnost, odnosno mogu biti monomerni, dimerni, trimerni ili tetramerni sa molekulskom težinom od 12 do 190 kDa, dok sadržaj polisaharida u njima može da se kreće u opsegu od 0 do 18 % (Wang i sar., 1998).

Dobijeni rezultati pokazuju nešto niži sadržaj proteina u plodnom telu vrste *H. repandum* u odnosu na sadržaj proteina u istoj vrsti poreklom iz Turske (34,14 g/100 g s.m.) (Colak i sar., 2009), dok su u skladu sa vrednostima ukupnih proteina vrste *H. repandum* iz Portugala (14,01 g/100 g s.m.) (Fernandes i sar., 2013).

Fenolni profil - Poznato je da gljive poseduju ogroman biohemijski potencijal i proizvode niz sekundarnih metabolita, prvenstveno fenolnih jedinjenja (Ferreira i sar., 2009; Karaman, 2009; Karaman i sar., 2010; Karaman i sar., 2014; Glumac i sar., 2016), kao što su fenolne kiseline (Mau i sar., 2002; Kim i sar., 2008; Ferreira i sar., 2009; Karaman i sar., 2010; Khatua i sar., 2013; Karaman i sar., 2014), flavonoidi (Ferreira i sar., 2009) i terpenoidi (Karaman i sar., 2010; Hsu i sar., 2013; Pejlin i sar., 2013), zahvaljujući svom sesilnom načinu života. Prisustvo i sastav ovih jedinjenja u gljivama uglavnom zavise od genetskih determinanti, ali i od ekoloških faktora, uključujući posebne uslove životne sredine u specifičnim staništima kao i načinu života (saprotrofni, parazitski i simbiotski/npr. mikoriza) (Chaumonton i sar., 1993).

Hininsku kiselinu sadrže skoro svi ekstrakti ispitivanih vrsta, dok nije detektovana u EtOH ekstraktu *A. strobiliformis*, PSH ekstraktima *B. adusta* i *S. subtomentosum* i PSH i EtOH ekstraktu *S. hirsutum*. Zapravo, hininska kiselina je najdominantnija kod 14 od 28 analiziranih ekstrakata, a odmah iza nje prema zastupljenosti sledi *p*-hidroksibenzoeva kiselina.

Zanimljivo je primetiti da cimetnu kiselinu sadrže samo dve vrste lignikolna - *P. porrigens* (MeOH - 73,10 µg/mL) i terikolna - *H. repandum* (MeOH - 137,00 µg/mL), obe uzorkovane na istom mestu (lokalitet Mitrovac na Tari) i u isto vreme. Prisustvo cimetnekiseline u ekstraktima *H. repandum* je potvrđeno i u pomenutim studijama (Puttaraju i sar., 2006; Vaz i sar., 2011).

Razlike između fenolnih profila koji su dobijeni u ovoj studiji u poređenju sa drugim studijama, može se objasniti nestabilnošću fenola tokom vremena (od momenta sakupljanja materijala) usled enzimskih i oksidativnih razlaganja. Pored toga, različiti uslovi stresa životne sredine, različiti načini ekstrakcije, kao i moguća genetička varijabilnost mogu takođe uticati na različit fenolni profil i sadržaj (Vaz i sar., 2011).

Iako neki autori tvrde da gljive ne sadrže flavonoide, jer nisu biljke i ne mogu ih sintetisati (Gil-Ramírez i sar., 2016), u plodnim telima ispitivanih vrsta otkriveno je dosta različitih flavonoida. Mogućnost akumulacije ovih jedinjenja iz supstrata može biti strain – specifična i pod uticajem specifičnih uslova životne sredine u kojima gljiva raste (zemljište i drvo) (Karaman i Matavulj, 2005).

Bogat fenolni profil svakako utiče na različit spektar bioloških aktivnosti. Međutim, ne znači nužno da vrste koje imaju najbogatiji fenolni profil ispoljavaju i najbolje aktivnosti (primer, *T. versicolor*). U zavisnosti od njihove strukture neki fenoli ispoljavaju neke manje neke veće efekte odnosno aktivnosti. Upravo zbog toga, kvantitativno i kvalitativno

ispitivanje istih u uzorku od ogromnog je značaja za svaku vrstu radi utvrđivanja njene biološke aktivnosti i dalje u dizajniranju terapeutika i preporuke iste kao funkcionalne hrane.

Gljive su izvor antioksidativnih jedinjenja kao što su tokoferoli (Barros i sar. 2008; Heleno i sar. 2010), askorbinska kiselina, karotenoidi (Ferreira i sar., 2009), fenolna jedinjenja (Barros i sar., 2009; Vaz i sar., 2011) i organske kiseline (Valentão i sar., 2005; Ribeiro i sar., 2006). Naročito, organske kiseline igraju odlučujuću ulogu u održavanju kvaliteta voća i povrća i organoleptičkih karakteristika i koriste se u njihovoj kontroli kvaliteta (Cámara i sar., 1994). Priroda i koncentracija ovih jedinjenja su takođe važni faktori koji gljivama daju ukus (Valentão i sar., 2005; Ribeiro i sar., 2006). Kiseline imaju manju osetljivost na promenu tokom obrade i skladištenja od drugih komponenti kao što su pigmenti i jedinjenja ukusa (Cámara i sar., 1994).

Ribeiro i sar. (2006) ističe da razlika koja postoji u smislu sadržaja organskih kiselina za iste vrste varira u zavisnosti od porekla, vremena sakupljanja, kao i razvojne faze gljive. Ovo bi mogao da bude odgovor na ispoljenu slabiju antiradikalnu i antioksidativnu aktivnost vrste *H. repandum* II u odnosu na *H. repandum* I.

Sadržaj masnih kiselina bio je različit u svim ispitivanim vrstama. Sadržaj nezasićenih masnih kiselina veći je od sadržaja zasićenih masnih kiselina što je u saglasnosti sa ranije objavljivanim rezultatima za gljive (Senatore, 1988; Ergönül i sar., 2013)

Sadržaji masnih kiselina imaju korisne efekte na profil lipida u krvi. Zamena zasićenih masnih kiselina (engl. **Saturated Fatty Acids** - SFA) sa mononezasićenim masnim kiselinama (engl. **Mono Unsaturated Fatty Acids** - MUFA) dovodi do povećanja lipoproteina visoke gustine (HDL) holesterola i smanjenja lipoproteina niske gustine (LDL) holesterola, triacilglicerola, lipidne oksidacije i LDL osetljivosti na oksidaciju (Kanu i sar., 2007). Zapravo, uključivanje jestivih gljiva u ishranu kod hiperholesterolemije i antisklerotomije praksa je u Orijentalnoj medicini od davnina (Sun i sar., 1984).

Kod većine ispitivanih vrsta među najdominantnijim **masnim kiselinama** su linolna i oleinska, što je potvrđeno ranijim istraživanjima na drugim vrstama gljiva (Senatore, 1988; Longvah i Deosthale, 1998; Barros i sar., 2007; Kalač, 2009; Novaković, 2015), dok vrsta *P. porrigens* ne sadrži ni jednu od pomenute dve masne kiseline. Poznato je da je linolna kiselina prekurzor gljivičnog alkohola 1-okten-3-ola, koji predstavlja glavno aromatično jedinjenje koje gljivama daje poseban ukus (Maga, 1981).

U radu Olennikov i sar. (2014) sastav i sadržaj masnih kiselina za vrstu *B. adusta* se razlikuje od naših rezultata. Ono što je vazno istaći jeste da su u datoj studiji u pomenutoj vrsti najzastupljenije linolna (28,2 %) i oleinska kiselina (12,5 %) s tim da su kod nas prisutne u većoj količini (50,3 % i 16,8 %, respektivno). Ista studija navodi da ekstremni uslovi rasta

(npr. niske temperature) dovode do brojnih promena u profilima masnih kiselina, navodeći da je relativna dominacija nezasićenih masnih kiselina nad zasićenim, znak adaptacije na uslove stresa. Zapravo, vrste koje pokazuju najveći procenat nezasićenih masnih kiselina imaju najbolji adaptivni karakter. Naime, proces biohemijske adaptacije lipidnog kompleksa gljiva na stresne uslove u životnoj sredini se zasniva na promeni stepena nezasićenosti masnih kiselina (Olennikov i sar., 2014).

U literaturi postoje podaci da su iz vrste *P. porrigens* izolovane oleinska, linolna, palmitinska i stearinska kiselina, kao i α -eleostearinska kiselina (Amakura i sar., 2006), što nije u skladu sa našim rezultatima gde većina pomenutih masnih kiselina nije detektovana, sem stearinske koja je zastupljena sa 12,70 %.

Iz dostupnih podataka u literaturi navodi se da *S. hirsutum* vrsta iz Čilea sadrži palmitinsku (7,2 %), linolnu (4,7 %), oleinsku (1,0 %) i stearinsku (7 %) (Torres i sar., 2016), što su mnogo niže vrednosti u odnosu na rezultate koje smo mi dobili za pomenutu vrstu (14,30 %, 40,00 %, 26,81 % i 6,6 %, respektivno).

U uzorku vrste *S. subtomentosum* identifikovano je 26 estara masnih kiselina, što je najveći do sada zabeležen broj i znatno premašuje objavljene podatke za pomenutu vrstu. U literaturi postoje podaci koji beleže da je kod vrste *S. subtomentosum* iz Češke detektovano svega osam masnih kiselina (laurinska, palmitoleinska, palmitinska, linoleinska, stearinska i oleinska) ali je njihov sadržaj znatno viši u odnosu na sadržaj koji smo mi dobili za pomenute kiseline, kao i detekcija miristinske kiseline (2,7 %) koja nije pronađena u našem uzorku (Hybelbauerová i sar., 2008). Sa druge strane, procenat lignocerinke kiseline je deset puta viši u našem uzorku u odnosu na uzorak iste vrste iz Češke (18,4 % i 1,8 %, respektivno) (Hybelbauerová i sar., 2008).

Što se tiče vrste *H. repandum* u literaturi postoje podaci da je kod ove vrste identifikovano ukupno 12 masnih kiselina, od čega je zasićenih 24,6 %, mononezasićenih, 27,9 % i polinezasićenih 47,5 %. a odnos UFA:SFA je 3,06 % (Kavishree i sar., 2008). Odnos UFA: SFA kod naših vrsta *H. repandum* I i II je 6,51 i 5,82, navedenim redom. To ukazuje na veći sadržaj nezasićenih u odnosu na zasićene masne kiseline, što ih čini nutritivno vrednim.

Na sreću, trans izomeri nezasićenih masnih kiselina nisu uočeni u ispitivanim gljivama. Veoma je važno dokumentovati ovakvu vrstu podataka jer trans masne kiseline negativno utiču na ljudsko zdravlje povećavajući rizik od kardiovaskularnih bolesti (u negativnoj je korelaciji sa koncentracijom HDL-holesterola u plazmi i pozitivno korelira sa LDL-holesterolom) (Minamide i Hammond, 1985).

Biogeni elementi - Gljive igraju važnu ulogu u agregaciji i stabilizaciji strukture zemljišta. One mogu mehanički i hemijski razložiti minerale zemljišta i druge različite materije. U stanju su da dezintegrišu konsolidovanu stensku masu u šljunak i minerale, zatim razlažu biljne ostatke i drvenu masu i tako doprinose formiranju zemljišta. U terestričnim ekosistemima, koji su opterećeni zagađivačima iz vazduha, makrogljive igraju važnu ulogu zbog njihove sposobnosti da akumuliraju hranljive materije u svojoj biomasi i da ove nutrijente vrata u tlo stvarajući humus u toku bio-geohemijskog ciklusa (Leake i sar., 2002; De Vries i Posch, 2011). Razgranate micelije gljiva igraju ključnu ulogu u akumulaciji, mobilizaciji i transportu makroelemenata (Watkinson i sar., 2005).

Ovakav odnos makroelemenata u ispitivanim lignikolnim i terikolnim vrstama je u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima (Karaman i Matavulj, 2005; Novaković, 2015; Rašeta, 2016).

Polisaharidi se u ćelijskom zidu gljiva mogu povezivati kovalentnim (estarskim) vezama sa proteinima preko ostataka tirozina i sa ferulinskom kiselinom nastalom u toku procesa degradacije lignina (Fry i sar., 2004; Wong, 2006). Navedeni polisaharidni ekstrakti su dobijeni iz plodnih tela lignokolnih gljiva, što ukazuje na prisustvo enzimskih sistema koji učestvuju u procesima degradacije lignina. *Cis*-ferulinska kiselina je žuto obojena supstanca koja u FTIR spektrima ima traku na oko 1600 cm^{-1} (Agarwal i Atalla, 1990) koja je takođe indikativna za aromatične C=C grupe koje su konjugovane sa C=O i/ili COO⁻ grupama (MacCarthy i Rice, 1985). U toku vrele vodene ekstrakcije polisaharidnih ekstrakata dolazi do narušavanja native strukture proteina, ali je postupak nedovoljan za raskidanje kovalentnih interakcija između ostataka tirozina i polisaharida, kao i ferulinske kiseline i polisaharida (Fry, 1982; Fry, 2004).

Fenolna jedinjenja su sposobna da vrše heliranje metala, inhibiciju lipooksigenaze i neutralisanje slobodnih radikala (Ferreira i sar., 2009). U literaturi postoje podaci da su u EtOH ekstraktu vrste *B. adusta* poreklom iz Poljske detektovane protokatehinska (2,56 µg/g s.m.), 4-OH-benzoeva (0,94 µg/g s.m.), vanilinska (0,90 µg/g s.m.) i salicilna kiselina (u tragovima) (Nowacka i sar., 2015). Od navedenih jedinjenja u našem uzorku detektovana je samo protokatehinska kiselina.

Zabeleženo je da *S. hirsutum* poreklom iz Poljske sadrži 4-OH-benzoevu, p-kumarinsku i salicilnu kiselinu (Nowacka i sar., 2015). U literaturi postoje podaci da H₂O ekstrakt vrste *H. repandum* sadrži taninsku, galnu, protokatehinsku i cimetnu kiselinu, dok EtOH ekstrakt pored pomenutih sadrži još i gentističnu, vanilinsku i siringinsku kiselinu

(Puttaraju i sar., 2006). Prisustvo cinamične kiseline kod vrste *H. repandum* je potvrđeno i u studiji Vaz i sar. (2011).

7. ZAKLJUČAK

U ovom radu analizirane su autohtone divlje rastuće vrste gljiva sa planina Fruške gore, Tare i Vršačkog brega, od kojih je pet lignikolnih vrsta: *Bjerkandera adusta* (Willd.) P. Karst 1879 (fam. Meruliaceae), *Pleurocybella porrigens* (Pers.) Singer 1947 (fam. Marasmiaceae), *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. 1800 (fam. Stereaceae), *Stereum subtomentosum* Pouzar 1964 (fam. Stereaceae), *Trametes versicolor* (L.) Lloyd 1921 (fam. Poriaceae) i dve terikolne vrste *Amanita strobiliformis* (Paulet ex Vittad.) Bertill. 1866 (fam. Amanitaceae) i vrsta *Hydnum repandum* L. 1753 (fam. Hydnaceae) (sa dva različita lokaliteta).

Prvi put su zabeleženi podaci o biološkoj aktivnosti (antiradikalska, antioksidativna, antimikrobna, anti-acetilholinesterazna i citotoksična) i hemijskom sastavu (fenolni profil, sadržaj organskih i masnih kiselina i sadržaj biogenih elemenata) svih analiziranih autohtonih vrsta sa područja Srbije osim za vrstu *T. versicolor*.

Na osnovu dobijenih rezultata i u skladu sa postavljenim ciljevima mogu se izvesti sledeći zaključci:

- ✓ Najbolju antiradikalisku aktivnost prema OH[•] ispoljio je MeOH ekstrakt lignikolne vrste
P. porrigens. Na osnovu visoke korelacije između ukupnog sadržaja fenola i na osnovu fenolnog profila zaključujemo da bi za ispoljenu aktivnost mogli da budu odgovorni flavoni-apigenin i luteolin;
- ✓ Kao najbolji anti-O2^{•-} agens istakao se H₂O ekstrakt lignikolne vrste *P. porrigens*, a jedinjenja koja bi mogla da budu odgovorna za ispoljenu aktivnost su fenolne kiseline hininska i protokatehinska i ćilibarna kiselina;
- ✓ Kao najjači anti-NO[•] agens istakao se MeOH ekstrakt vrste *T. versicolor*, kod koga je detektovan najveći broj fenolnih jedinjenja (ukupno 38) što bi mogao da bude odgovor za ispoljenu aktivnost.
- ✓ Generalno, anti-Asc[•] aktivnost analiziranih H₂O ekstrakata nije bila jako visoka. Najveći procenat neutralizacije Asc[•] radikala ispoljio je H₂O ekstrakt lignikolne vrste *S. hirsutum*.
- ✓ Najjaču sposobnost neutralizacije DPPH[•] ispoljio je MeOH ekstrakt lignikolne vrste *S. subtomentosum*, dok se kao aktivna jedinjenja nameću protokatehinska i galna kiselina.
- ✓ Prema sposobnosti neutralizacije ABTS^{•+} istakao se H₂O ekstrakt vrste *B. adusta*, a genistinska kiselina koja je detektovana samo kod ove vrste mogla bi da bude odgovorna za ispoljenu aktivnost;

- ✓ Najjaču antioksidativnu aktivnost ispoljila je terikolna vrsta **A. strobiliformis**. PSH ekstrakt ove vrste ispoljio je najjaču sposobnost redukcije Fe³⁺ jona, dok je H₂O ekstrakt ispoljio najjaču antioksidativnu aktivnost prema polarografskoj HPMC metodi. Zaključujemo da su polisaharidi, koji su rastvorljivi u vodi, ove vrste u najvećoj meri zaslužni za postignutu antioksidativnu aktivnost. Pored ovih jedinjenja, FTIR spektar pokazuje i druga jedinjenja, fenole i proteine, čija aktivnost doprinosi antioksidativnosti ove vrste. Za ispoljeni redukcionni potencijal najverovatnije su odgovorni polisaharidno-fenolni kompleksi kao i visok sadržaj glukoze, a nizak sadržaj galaktoze i ksiloze u H₂O ekstraktu vrste *A. strobiliformis*;
- ✓ Predpostavka je da su najveći ukupan sadržaj **proteina i fenola**, koji su dobijeni za vrstu **A. strobiliformis** (135,83±7,19 mg proteina/g s.m.) usloveli najbolje ispoljenu antioksidativnu aktivnost ove vrste;
- ✓ Antimikrobna aktivnost analiziranih vrsta zavisila je od vrste, ekstrakcionog sredstva, ali i od testiranog organizma. Najbolju antibakterijsku aktivnost ispoljio je EtOH ekstrakt vrste **H. repandum**, delujući i na Gr-negativne i na Gr-pozitivne bakterijske sojeve, pri čemu je najjače delovanje ispoljeno na atestirane sojeve: *S. aureus* (ATCC 6538), *B. subtilis* (ATCC 6633) i *P. aeruginosa* (ATCC 35554), dok su humani izolati bili neosetljivi na primenjene ekstrakte. Generalno, Gr- pozitivni sojevi i humani izolati pokazali su se kao rezistentniji;
- ✓ Izuzetna antifungalna aktivnost (MIC 24,75 mg/mL; MBC 24,75/49,95 mg/mL) koju je EtOH ekstrakt vrste **H. repandum** ispoljio prema svim ispitivanim fitopatogenim plesnima (*F. proliferatum* - BL1, *F. verticillioides* - BL4, *F. proliferatum* - BL5, *F. graminearum* - S1 i *A. padwicki* - ALT) ukazuje na njegov veliki potencijal i ogroman značaj u poljoprivredi u smislu biokontrole fitopatogena.
- ✓ Najbolje antiviralno delovanje ispoljio je MeOH ekstrakt vrste **T. versicolor**, a jedinjenje koje bi moglo da bude odgovorno za ispoljenu aktivnost je flavanol-katehin, koji je detektovan samo u ovaj vrsti i u najvećoj koncentraciji u pomenutom ekstraktu (21,90 µg/g s.m.). Pored toga, flavonol-kampferol (16,50 µg/g s.m.) i biflavonoid-amentoflavon (33,20 µg/g s.m.) sadržani u MeOH ekstraktu vrste *S. subtomentosum* i EtOH ekstraktu *H. repandum*, koji su takođe pokazali antivirusna aktivnost, upućuje na njih kao potencijalna odgovorna jedinjenja za ispoljenu aktivnost.
- ✓ Većina ispitivanih gljiva zavrednuje pažnju daljih ispitivanja jer predstavljaju potencijalni izvor prirodnih inhibitora AChE. Međutim, posebno treba istaći anti-AChE aktivnost koju su ispoljili EtOH ekstrakti lignikolnih vrsta *S. hirsutum*, *B. adusta*, *S. subtomentosum* i *T. versicolor*. Fenolna jedinjenja koja bi mogla da budu

odgovorna za ispoljenu aktivnost su apigenin, baikalein, *p*-hidroksibenzoeva i galna kiselina. Svesni činjenice o neminovnosti brzog širenja neurodegenerativnih oboljenja a posebno Alchajmerove bolesti, ispitivanja koja su učinjena na polju iznalaženja potencijalnih terapeutika, konkretno inhibitora AChE, daju veliki doprinos nauci. Pored toga, nizak sadržaj bakra u pomenutim vrstama (4,83, 6,36, 8,06 i 1,29 mg/kg, navedenim redom), koji utiče na stvaranje senilnih plaka u mozgu (akumulaciju A β), dodatno ih čini pogodnim za upotrebu u prevenciji AB.

Na osnovu hemijskog sastava analiziranih vrsta gljiva i njihovih ekstrakata zaključujemo sledeće:

- ✓ Na osnovu planarne hromatografije polisaharidnih frakcija gljiva ustanovljeno je da su najdominantniji šećeri svih ispitivanih vrsta bili D-galaktoza i D-glukoza.
- ✓ Pored polisaharida u FTIR spektrima uočeno je i prisustvo proteina, polifenolnih jedinjenja i pigmenata. Takođe, potvrđeno je i da polisaharidni uzorci ne sadrže uronske kiseline.
- ✓ Najveći ukupan sadržaj **flavonoida** zabeležen je u etanolnom ekstraktu vrste ***S. subtomentosum***
- ✓ Na osnovu HPLC/MS-MS tehnike u svim analiziranim vrstama gljiva detektovana su fenolna jedinjenja (flavonoidi i fenolne kiseline). Sadržaj pojedinih grupa fenolnih jedinjenja zavisio je od tipa ekstrakta, odnosno primenjenog rastvarača. Najveći broj detektovanih fenolnih jedinjenja, ukupno 38, zabeleženo je za vrstu *T. versicolor*, dok je u ostalim vrstama uočena značajno manja raznovrsnost fenolnih jedinjenja (8-12), ali ne i ukupan sadržaj. Ukupan sadržaj detektovanih fenolnih jedinjenja zavisio je kako od ekstrakcionog sredstva tako i od same vrste gljive, pri čemu su svi ekstrakti sadržali najviše amentoflavona, *p*-hidroksibenzoeve i hinske kiseline kod skoro svih analiziranih vrsta.
- ✓ Među organskim kiselinama hinska, ćilibarna i buterna bile su prisutne u svim ispitivanim vrstama. Na osnovu model organizma *H. repandum* i i II utvrđeno je da se sastav organskih kiselina razlikuje i u okviru iste vrste sa različitih lokaliteta, što znači da je uticaj faktora sredine od presudnog značaja za biohemijski sastav gljive. Pored sastava organskih i masnih kiselina nalika je primećena i u ispoljenoj biološkoj aktivnosti ove vrste.
- ✓ Veći sadržaj K⁺ kao makroelementa zabeležen u ektomikoriznoj vrsti *A. strobiliformis* i *H. repandum*, u odnosu na analizirane lignikolne gljive, najverovatnije je rezultat simbiotskih odnosa micelije gljiva i korenovog sistema biljaka. Među analiziranim mikroelementima gljive su najviše akumulirale Fe (400,89 mg/kg), a zatim Mn (45,20 mg/kg) i Zn (45,06 mg/kg), pri čemu su terikolne (664,48; 56,96; 58,42 mg/kg,

navedenim redom) bile bolji akumulatori od lignikolnih vrsta (137,30; 33,45; 31,71 mg/kg, navedenim redom).

- ✓ Sadržaj makro i mikroelemenata i masnih kiselina određuje nutritivni značaj analiziranih vrsta, dok sadržaj fenolnih jedinjenja određuje njihovu lekovitost, što ukazuje na značaj svih analiziranih vrsta kao funkcionalne hrane.

8. LITERATURA

- Agarwal, U.P., Atalla, R.H. (1990).** Formation and identification of cis/trans ferulic acid in photoyellowed white spruce mechanical pulp. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 10: 169-190.
- Alexander, J.L., Wilson, I.D., Teare, J., Marchesi, J.R., Nicholson, J.K., Kinross J.M. (2017).** Gut microbiota modulation of chemotherapy efficacy and toxicity. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 14: 356-365.
- Alves, M.J., Ferreira, I.C.F.R., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., Pintado, M. (2013).** A Review on antifungal activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Current Topics in Medical Chemistry*. 13: 2648-265.
- Alves, M.J., Ferreira, I.C.F.R., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., Pintado, M.A. (2012).** Review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Medica*. 78: 1707-1718.
- Amakura, Y., Kondo, K., Akiyama, H., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T., Maitani, T. (2006).** Conjugated Ketonic Fatty Acids from *Pleurocybella porrigens*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 54: 1213-1215.
- 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
- Aqueveque, P., Cespedes, C.L., Alarcon, J., Schmeda-Hirschmann, G., Canumir, J.A., Becerra, J., Silva, M., Sterner, O., Rrigan, R., Aranda, M. (2016).** Antifungal activities of extracts produced by liquid fermentations of Chilean *Stereum* species against *Botrytis cinerea* (grey mould agent). *Crop Protection*. 89: 95-100.
- Arsenijević-Maksimović, I., Pajević, S. (2002).** Praktikum iz fiziologije biljaka. Poljoprivredni fakultet, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.
- Badhani, B., Sharma, N., Kakkar, R. (2015).** Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Adv*. 5: 27540-27557.
- Balkis, A., Tran, K., Lee, Y.Z. (2015).** Screening flavonoids for inhibition acetylcholinesterase identified baicalein as the most potent inhibitor. *J Agr Sci*. 7: 26-35.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D.M., Casal, S., Oliveira, B., Ferreira, I.C.F.R. (2007).** Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry*. 105: 140-145.
- Barros, L., Correia, D.M., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Santos-Buelga, C. (2008).** Optimization of the determination of tocopherols in *Agaricus* sp. edible mushrooms by a normal phase liquid chromatographic method. *Food Chemistry*. 110: 1046-1050.
- Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Santos-Buelga, C. (2009).** Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology*. 47: 1076-1079.
- Baumann, M., Baxendale, I.R. (2013).** An overview of the synthetic routes to the best selling drugs containing 6-membered heterocycles. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 9: 2265-2319.
- Bemani E., Ghanati F., Boroujeni L. Y., Khatami F. (2012).** Antioxidant activity, total phenolics and taxol contents response of hazel (*Corylus avellana* L.) cells to benzoic acid and cinnamic acid. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 40(1): 69-73.
- 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.
- Blackwell, M. (2011).** The fungi: 1, 2, 3...5.1 million species? *American Journal of Botany*. 98(3): 426-438.
- Bohn, J.A., Be Miller, J.N. (1995).** (1-3)- β -D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers* 28: 3-14.
- Bonda, D.J., Lee, H.G., Blair, J.A., Zhu, X., Perry, G., Smith, M.A. (2011).** Role of metal dyshomeostasis in Alzheimer's disease. *Metallomics*. 3(3): 267-70.
- Brandt, C.R., Piraino, F. (2000).** Mushroom antivirals. *Recent Res Dev Antimicrob Agents Chemother* 4: 11-26.
- Brigida, P., Ferreras, F., Valentão, P., Andrade, P. (2013).** Nature as a source of metabolites with acetylcholinesterase activity: an approach to Alzheimer's disease treatment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 65: 1681-1700.
- Bryne, G.J.A. (1998).** Treatment of cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Australian Journal of Hospital Pharmacy*. 28: 261-266.
- Bu, M., Yang, B.B., Hu, L. (2014).** Natural Bioactive Sterol 5 α ,8 α -endoperoxides as drug lead compounds. *Medicinal chemistry*. 4(10): 709-716.
- Cámara, M.M., Díez, C., Torija, M.E., Cano, M.P. (1994).** HPLC determination of organic acids in pineapple juices and nectars. *Z Lebensm-Unters-Forsch*. 198: 52-56.
- Carey, P.R. (1992).** Biochemical application of Raman and resonance Raman spectroscopies. New York: Academic Press.
- Carlson, K. (2005).** Working with bacteriophages: common techniques and methodological approaches. In: Kutter, E., Sulakvelidze, A. (ur.), *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press. Boca Raton. Florida.
- Cassels, B.K., Asencio, M. (2011).** Anti-HIV activity of natural triterpenoids and hemisynthetic derivatives 2004-2009. *Phytochemistry Reviews*. 10: 545-564.
- Cateni, F., Doljak, B., Zaccogna, M., Anderlüh, M., Piltaver, A., Scialino, G., Banfi, E. (2007).** New biologically active epidioxysterols from *Stereum hirsutum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 17(22): 6330-4.
- Cederbaum, A.I., Lu, Y., Wu, D. (2009).** Role of oxidative stress in alcohol induced liver injury. *Archives of Toxicology*. 83(6): 519-48.
- 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.
- Chang, S.T., Miles, P.G. (2004).** Mushrooms - cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. Drugo izdanje. CRC press, p. 451
- Chaumonton, J.P., Chauveau, C., Chavant, L. (1993).** Water-soluble polysaccharides excreted by mycelium of higher fungi: relationship with taxonomy and physiology. *Biochemical Systematic and Ecology*. 21: 227-239.
- Chen, X., Guo, C., Kong, J. (2012).** Oxidative stress in neurodegenerative disease. *Neural Regeneration Research*. 7(5): 376-385.
- Cheung, L.M., Cheung, P.C.K. (2005).** Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry*. 89: 403-409.

- Cheung, L.M., Cheung, P.C.K., Ooi, V.E.C.** (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*. 81: 249–255.
- Cheung, P.C.K.** (2008). *Mushrooms as functional foods*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey. ISBN 978-0-470-05406-2.
- Chu, K.K., Ho, S.S., Chow, A.H.** (2002). *Coriolus versicolor*: a medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values. *Journal of Clinical Pharmacology*. 42: 976–984.
- Chu, K.T., Xia, L., Ng, T.B.** (2005). Pleurostrin, an antifungal peptide from the oyster mushroom. *Peptides*. 26: 2098–2103.
- Clinical and Laboratory Standards Institute.** *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. CLSI document M07-A9 (ISBN 1-56238-783-9 [Print]; ISBN 1-56238-784-7 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.
- CLSI** (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition; CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.**CLSI** (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- Colak, A., Faiz, Ö., Sesli, E.** (2009). Nutritional Composition of Some Wild Edible Mushrooms. *Turkish Journal of Biochemistry*. 34: 25–31.
- Connor, J.R., Milward, E.A., Moalem, S., Sampietro, M., Boyer, P., Percy, M.E., et al.** (2001). Is hemochromatosis a risk factor for Alzheimer's disease? *Journal of Alzheimer's Disease*. 3: 471–7.
- Dai, Y.C.** (2010). Hymenochaetaceae (Basidiomycota) in China. *Fungal Diversity*. 45: 131–343.
- De Clercq, E., Field, H.J.** (2006). Antiviral prodrugs — the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. *British Journal of Pharmacology*. 147: 1–11.
- De Vries, W., Posch, M.** (2011). Modelling the impact of nitrogen deposition, climate change and nutrient limitations on tree carbon sequestration in Europe for the period 1900–2050. *Environmental Pollution*. 159: 2289–2299.
- DeChristopher, B.A., Loy, B.A., Marsden, M.D., Schrier, A.J., Zack, J.A., Wender, P.A.** (2012). Designed, synthetically accessible bryostatin analogues potently induce activation of latent HIV reservoirs *in vitro*. *Nature Chemistry*. 4: 705–710.
- Diaz-Godínez, G.** (2015). Fungal bioactive compounds: An overview. In: Dr. Vijai Kumar Gupta and Dr. Maria G. Tuohy, editors. *Biotechnology of bioactive compounds sources and applications*. by UK: John Wiley & Sons, Ltd. 195–223.
- Dimitrijević, M., Jovanović, V., Cvetković, J., Stojanović, G. and Mitić, V.** (2015). Screening of antioxidant, antimicrobial activities of twelve selected Serbian wild mushrooms. *The Royal Society of Chemistry*. 7: 418–419.
- Doskocil, I., Havlik, J., Verlotta, R., Tauchen, J., Vesela, L., Macakova, K., Opletal, L., Kokoska, L., Rada, V.** (2016). *In vitro* immunomodulatory activity, cytotoxicity and chemistry of some central European polypores. *Pharmaceutical Biology*. 54(11): 2369–2376.
- Dundar, A., Acay, H., Yildiz, A.** (2008). Yield performance and nutritional contents of three oyster mushroom species cultivated on wheat stalk. *African Journal of Biotechnology*. 7: 3497–501.
- Duraković, S.** (1996). *Primenjena mikrobiologija. Prehrambeno tehnološki inženjering. Udžbenici sveučilišta u Zagrebu*. Zagreb. 35–58.
- Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.M., Nabavi, S.F., Eslami, S.** (2010). Antioxidant and free radical scavenging activities of culinary-medicinal mushrooms, golden chanterelle *Cantharellus cibarius* and angel's wings *Pleurotus porrigens*. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 12: 265–272.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M.** (1961). A new and rapid colorimetric determination of AChE activity. *Biochemical Pharmacology*. 7: 88–95.
- 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.
- Ergönül, P.G., Akata, I., Kalyoncu, F., Ergönül, B.** (2013). Fatty acid compositions of six wild edible mushroom species. *The Scientific World Journal Article*. doi.org/10.1155/2013/163964
- Erjavec, J., Kos, J., Ravnikar, M., Dreo, T., Sabotič, J.** (2012). Proteins of higher fungi – from forest to application. *Trends in Biotechnology*. 30: 259–273.
- 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. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 648–656.
- Faccin, L.C., Benati, F., Rincão, V.P., Mantovani, M.S., Soares, S.A. Gonzaga, M.L. Nozawa, C., Linhares R.E.C.** (2007). Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. *Letters in Applied Microbiology*. 45: 24–28.
- Falandysz, J., Borovička, J.** (2013). Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: health benefits and risks. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97: 477–501.
- Falandysz, J., Frankowska, A., Jarzyńska, G., Dryżałowska, A., Kojta, A.K., Zhang, D.** (2011). Survey on composition and bioconcentration potential of 12 metallic elements in King Bolete (*Boletus edulis*) mushroom that emerged at 11 spatially distant sites. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 46: 231–246.
- Fernandes, Â., Barreira, J.C.M., Antonio, A.L., Santos, M.P., Martins, A., Beatriz, M., P.P. Oliveira, P.P., Ferreira, I.C.F.R.** (2013). Study of chemical changes and antioxidant activity variation induced by gamma-irradiation on wild mushrooms: comparative study through principal component analysis.
- Fernando, D., Wijesundera, R., Preethi, S., De Silva, D., Nanayakkara, C.** (2015). Strong radical scavenging macrofungi from the Dry Zone Forest Reserves in Sri Lanka. *Frontiers in Environmental Microbiology*. 1(2): 32–38.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Abreu, R.M.V.** (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*. 16: 1543–1560.
- Filho, J.M.B., Medeiros, K.C.P., Diniz, M.F.F.M., Batista, L.M., Filho, P.F.A., Silva, M.S., da-Cunha, E.V.L., Almeida, J.R.G.S., Quintans-Júnior, L.J.** (2006). Natural products inhibitors of the enzyme AChE. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 16: 258–285.
- Fry, S.C.** (1982). Phenolic components of the primary cell wall. Feruloylated disaccharides of D-galactose and L-arabinose from spinach polysaccharide. *Biochemistry*. 203: 4493–44504.
- Fry, S.C.** (2004). Oxidative coupling of tyrosine and ferulic acid residues: Intraand extra-protoplasmic occurrence, predominance of trimers and larger products, and possible role in inter-polymeric cross-linking. *Phytochemistry Reviews*. 3: 97–111.
- Fujihara, S., Kasuga, A., Aoyagi, Y., Sugahara, T.** (1995). Nitrogen-toprotein conversion factors for some common edible mushrooms. *Journal of Food Science*. 60: 1045–1047.

- Gadd, G.M. (2007). Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*. 111: 3–49.
- Gil-Ramírez, A., Pavo-Caballero, C., Baeza, E., Baenas, N., García-Viguera, C., Marín, F.R., Soler-Rivas, C. (2016). Mushrooms do not contain flavonoids. *Journal of Functional Foods*. 25: 1–13.
- Glumac, M., Pejin, B., Karaman, M., Mojović, M., Matavulj, M. (2016). Lignicolous fungi hydrodistilled extracts may represent a promising source of natural phenolics. *Natural Product Research*. doi: 10.1080/14786419.2016.1212036.
- 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.
- Guterres, Z.D., Mantovani, M.S., da Eira, A.F., Ribeiro, L.R., Jordao, B.Q. (2005). Genotoxic and antigeotoxic effects of organic extracts of mushroom *Agaricus blazei* Murril on V79 cells. *Genetics and Molecular Biology*. 28: 458–163.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 344: 721e4.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Aruoma, O.I. (1987). *Analytical Biochemistry*. 165: 215–219.
- Harhaji, L., Mijatović, S., Maksimović-Ivanić, D., Stojanović, I., Momčilović, M., Maksimović, V., Tufegdžić, S., Marjanović, Ž., Mostarica-Stojković, M., Vučinić Ž., Stošić Grujičić, S. (2008). Anti-tumor effect of *Coriolus versicolor* methanol extract against mouse B16 melanoma cells: *In vitro* and *in vivo* study. *Food Chemical Toxicology*. 46: 1825–1833.
- Hasnat, M.A., Pervin, M., Lim, B.O. (2013). Acetylcholinesterase inhibition and *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* grown on germinated brown rice. *Molecules*. 18: 6663–6678.
- Heleno, S.A., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A., Ferreira, I.C.F.R. (2010). Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry*. 119: 1443–1450.
- Heleno, S.A., Ferreira, I.C.F.R., Esteves, A.P., Ćirić, A., Glamočlija, J., Martins, A., Soković, M., Queiroz, M.J.R.P. (2013). Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, *p*-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. *Food and Chemical Toxicology*. doi: 10.1016/j.fct.2013.04.02
- Hilszczańska, D. (2012). Medicinal properties of macrofungi. *Forest Research Papers*. 73(4): 347–353.
- Hleba, L., Vuković, N., Petrová, J., Kačániová, M. (2014). Antimicrobial activity of crude methanolic extracts from *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor*. *Animal Science and Biotechnologies*. 47(2).
- Hobbs, C. (1995). *Medicinal mushrooms*, Botanica press, Empire Grade, Santa Cruz, CA.
- Holmes, E., Kinross, J., Gibson, G.R., Burcelin, R., Jia, W., Pettersson, S., Nicholson, J.K. (2012). Therapeutic modulation of microbiota-host metabolic interactions. *Science Translational Medicine*. 4: 137rv6.
- Hsu, W.K., Hsu, T.H., Lin, F.Y., Cheng, Y.K., Yang J.P.W. (2013). Separation, purification, and α -glucosidase inhibition of polysaccharides from *Coriolus versicolor* LH1 mycelia. *Carbohydrate Polymers*. 92: 297–306.
- Hybelbauerová, S., Sejbala, J., Dračinský, M., Hahnová, A., Koutek, B. (2008). Chemical constituents of *Stereum subtmentosum* and two other birch-associated *Basidiomycetes*: an interspecies comparative study. *Chemistry & Biodiversity*. 5(5): 743–750.
- Hyde, K.D. (2001). Where are the missing fungi; does Hong Kong have any answers. *Mycological Research*. 105:1514–1518.
- Ingkaninan, K., Temkithawon, P., Chuenchom, K., et al. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology*. 89: 261–4.
- Jiang, Y., Wong, J.H., Fu, M., Ng, T.B., Liu, Z.K., Wang, C.R., Li, N., Qiao, W.T., Wen, T.Y., Liu, F. (2011). Isolation of adenosine, isosinensetin and dimethylguanosine with antioxidant and HIV-1 protease inhibiting activities from fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *Phytomedicine*. 18 (2–3): 189–193.
- Jones, P.S. (1998). Strategies for antiviral drug discovery. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. 9: 283–302.
- Jovanović, Z. (2012). Mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Medicinski Pregled*. LXV (7-8): 301–307.
- Kabanov, A.S., Kosogova, T.A., Shishkina, L.N., Tepliakova, T.V., Skarnovich, M.O., Mazurkova, N.A., Puchkova, L.I., Malkova, E.M., Stavskii, E.A., Drozdov, I.G. (2011). Study of antiviral activity of extracts obtained from basidial fungi against influenza viruses of different subtypes in experiments *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1: 40–43.
- Kalač, P. (2012). A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93: 209–218.
- Kalač, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*. 113: 9–16.
- Kanu, P.J., Zhu, K., Kanu, J.B., Zhou, H., Qian, H., et al. (2007). Biologically active components and nutraceuticals in sesame and related products: a review and prospect. *Trends Food Science Technology*. 18: 599–608.
- 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. (2012). 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. (2012). Antibacterial agents from lignicolous macrofungi. In the book: "Antimicrobial agents", ed. By Varaprasad Bobbarala, InTech. 18: 361–386.
- Karaman, M., Mimica-Dukić, N., Knežević, P., Svirčev, Z., Matavulj, M. (2009a). Antibacterial properties of selected lignicolous mushrooms and fungi from Northern Serbia. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 11(3): 269–279.
- 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., Matavulj, M. (2012a). Bioactive properties of wild-growing mushroom species *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. from Fruška Gora Forest (Serbia). *RPMP Ethnomedicine and Therapeutic Validation*. 32: 361–377.
- Karaman, M., Stahl, M., Vulić, J., Vesić, M., Čanadanović-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.
- Karin, M., Jobin, C. (2014). Chemotherapy, immunity and microbiota—a new triumvirate? *Nature Medicine*. 20(2): 126–127.
- Karmakar, A., Zhang, Q.L., Zhang, Y.B. (2014). Neurotoxicity of nanoscale materials. *Journal of Food and Drug Analysis*. 22: 147–60.
- Kavishree, S., Hemavathy, J., Lokesh B.R., Shashirekha, M.N., Rajarathnam, S. (2008). Fat and fatty acids of Indian edible mushrooms. *Food Chemistry*. 106: 597–602.

- Kawagishi**, H., Mitsunaga, S., Yamawaki, M. (1997). A lectin from mycelia of the fungus *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*. 44: 7–10.
- Keleş**, A., Koca, İ., Gençcelep, H. (2011). Antioxidant Properties of Wild Edible Mushrooms. *Journal of Food Process Technology*. 2: 130.
- Khatua**, S., Roy, T., Acharya, K. (2013). Antioxidant and free radical scavenging capacity of phenolic extract from *Russula laurocerasi*. *Asian Journal Pharmaceutical and Clinical Research*. 6(4): 156e60.
- Kim**, M.Y., Seguin, P., Ahn, J.K., Kim, J.J., Chun, S.C., Kim, E.H., Seo, S.H., Kang, 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.
- Kovacic**, P., Pozos, R.S., Somanathan, R., Shangari, N., O'Brien, P.J. (2005). Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: Focus on electron transfer, free radicals, and structure–activity relationships. *Current Medicinal Chemistry*. 12: 2601–2623.
- Kozarski**, M. (2012). Hemijska karakterizacija, antioksidativna i antimikrobna svojstva polisaharidnih ekstrakata odabranih vrste gljiva. Doktorska disertacija. Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Kozarski**, M., Klaus, A., Jakovljević, D., Todorović, N., Vunduk, J., Petrović, P., Niksić, M., Vrvic, M.M., van Griensven, L. (2015). Antioxidants of Edible Mushrooms. *Molecules*. 20: 19489-19525.
- Kozarski**, M., Klaus, A., Niksić, M., Vrvic, M.M., Todorović, N., Jakovljević, D., Van Griensven, Leo J.L.D. (2012). *Journal of Food Composition and Analysis*. 26: 144–153.
- Kuiken**, T., Fouchier, R., Rimmelzwaan, G., Osterhaus, A. (2003). Emerging viral infections in a rapidly changing world. *Current Opinion Biotechnology*. 14(6): 641–646.
- Lam**, A.H.C., Sandoval, N., Wadhwa, R., Gilkes, J., Do, T.Q., Ernst, W., Chiang, S.M., Kosina, S., Xu, H.H., Fujii, G., Porter, E. (2016). Assessment of free fatty acids and cholesteryl esters delivered in liposomes as novel class of antibiotic. *BMC Res Notes*. 9: 337.
- Lani**, R., Hassandarvish, P., Shu, M.H., Phoon, W.H., Chu, J.J.H., Higgs, S., Vanlandingham, D., Bakar, S.A., Zandi, K. (2016). Antiviral activity of selected avonoids against Chikungunya virus. *Antiviral Research*. 133: 51-60.
- Lau**, C.B.S., Ho, C.Y., Kim, C.F., Leung, K.N., Fung, K.P., Tse, T.F., Chan, H.H.L., Chow, M.S.S. (2004). Cytotoxic activities of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extract on human leukemia and lymphoma cells by induction of apoptosis. *Life Sciences*. 75: 797–808.
- Leake**, J.R., Donnelly, D.P., Body, L. (2002). In: Van der Heijden M.G.A., Sanders I.R., eds., *Mycorrhizal ecology*. *Ecological Studies* 157: 345–372, Springer-Verlag, Berlin.
- Lee**, H.J., Lee, H.J., Lim E.S., Ahn, K.S., Shim, B.S., Kim, H. M. et al. (2005). Cambodian *Phellinus linteus* inhibits experimental metastasis of melanoma cells in mice via regulation of urokinase type plasminogen activator. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 28: 27–31.
- Leung**, M.Y.K., Liu, C., Koon, J.C.M., Fung, K.P. (2006). Polysaccharide biological response modifiers. *Immunol Lett* 105: 101–111.
- Levy**, L.M. Cabrera, G.M., Wright, J.E., Seldes, A.M. (2000). Bioactive Metabolites Produced by Fungi Cultures. *Molecules*. 5: 354-355.
- Li**, X., Wang, X., Chen, D., Chen, S. (2011). Antioxidant activity and mechanism of protocatechuic acid *in vitro*. *Functional Foods in Health and Diseases*. 1(7): 232-244.
- Lindequist**, U., Niedermeyer, T.H.J., Jülich, W.D. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*. 2: 285–299.
- Lipinski**, B. (2011). Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Article ID 809696, 9 pages. doi:10.1155/2011/809696
- Liu**, J. (2002). Biologically active substances from mushrooms in Yunnan China. *Heterocycles*. 57:157–167.
- Liu**, J., Yang, F., Ye, L.B., Yang, X.J., Timani, K.A., Zheng, Y. and Wang, Y.H. (2004). Possible mode of action of antihyperlipidemic activities of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*. 95: 265–272.
- Longvah**, T., Deosthale, Y. G. (1998). Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. *Food Chemistry*. 63: 331–334.
- López-Bucio**, J., Nieto-Jacobo, M.F., Ramírez-Rodríguez, V., Herrera- Estrella, L. (2000). Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science*. 160: 1–13.
- Lösel**, D. M. (1988). Fungal lipids, In: *Microbial lipids*, eds: C. Ratledge and S. G. Wilkinson, Academic Press, New York, USA, pp. 699–805.
- Lowry**, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265.
- MacCarthy**, P., Rice, J.A. (1985). Spectroscopic methods (other than NMR) for determining functionality in humic substances. In *Humic substances in soil, sediment, and water*, Aiken, G.R., McKnight, G.R., Wershaw, R.L. & P. MacCarthy, P. (Eds.), Wiley-Interscience, New York, NY, USA, pp. 527–560.
- Maga**, A. (1981). Mushroom flavor. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 29(1): 1–4.
- Mallavadhani** U., Sudhakar A., Sathyanarayana K.V.S., Mahapatra A., Li W., Richard B. (2006). Chemical and analytical screening of some edible mushrooms. *Food Chemistry*. 95: 58–64.
- Marston**, A., Kissling, J., & Hostettmann, K. (2002). A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis*. 13: 51–54.
- Mathlouthi**, M., Koenig, J.L. (1987). Vibrational spectra of carbohydrates. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. 44:7–89.
- Matijašević**, D., Pantić, M., Rašković, B., Pavlović, V., Duvnjak, D., Sknepnek, A., Nikšić, M. (2016). The antibacterial activity of *Coriolus versicolor* methanol extract and its effect on ultrastructural changes of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis*. *Frontiers in Microbiology*. 7: 11226. doi: 10.3389/fmicb.2016.01226
- Mau**, J.L., Lin, H.C., Song, S.F. (2002). Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Research International*. 35: 519–526.
- Maynard**, C.L., Elson, C.O., Hatton, R.D., Weaver, C.T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*. 489: 231–241.
- Merican**, I., Guan, R., Amarapura, D., Alexander, M.J., Chutaputti, A., Chien, R.N., Hasnain, S.S., Leung, N., Lesmana, L., Phiet, P.H., Sjalfoellah Noer, H.M., Sollano, J., Sun, H.S., Xu, D.Z. (2000). Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 15(12): 1356–1361.

- Milovanović, I.**, Misan, A., Sarić, B., Kos, J., Mandić, A., Simeunović, J., Kovač, D. (2012). Evaluation of protein and lipid content and determination of fatty acid profile in selected species of cyanobacteria. In Proceedings of the 6th Central European Congress on Food, CEFood2012.
- Minamide, T.**, Hammond, J.B.W. (1985). The influence of the periodic fruiting (flushing) cycle on the biochemical development of *Agaricus bisporus* sporophores. *New Phytologist*. 100: 571–578.
- Mizuno, T.**, Saito, H., Nishitoba, T., Kawagashi, H. (1995). Antitumoractive substances from mushrooms. *Food Reviews International*. 11: 23–61.
- 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
- Moradali, M.F.**, Mostafavi, H., Ghods, S., Hedjaroude, G.A. (2007). Immunomodulating and anticancer agents in realm of macromycetes fungi (macrofungi). *International Immunopharmacology*. 7: 701–724.
- Mosmann, T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55–63.
- Mulac, D.**, Huwel, S., Galla, H.J., Humpf, H.U. (2012). Permeability of ergot alkaloids across the blood–brain barrier in vitro and influence on the barrier integrity. *Molecular Nutrition & Food Research*. 56(3): 475–485.
- Murray, A.P.**, Faraoni, M.B., Castro, M.J. (2013). Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy. *Current Neuropharmacology*. 11: 388–413.
- Ng, T.B.**, Huang, B., Fong, W.P., Yeung, H.W. (1997). Anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors. *Life Science*. 61: 933–949.
- Ngai, P.H.**, Ng, T.B. (2003). Lentin, a novel antifungal protein from shitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. *Life Science*. 73: 3363–3374.
- Nguyen, T.K.**, Im, K.H., Choi, J., Shin, P.G., Lee, T.S. (2016). Evaluation of antioxidant, anti-cholinesterase, and anti-inflammatory effects of culinary mushroom *Pleurotus pulmonarius*. *Mycobiology*. 44(4): 291–301.
- 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.
- 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.
- Novaković, A.** (2015). Biopotencijal autohtonih gljiva u funkciji nutraceutika. Doktorska disertacija. Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Nowacka, N.**, Nowak, R., Drozd, M., Olech, M., Los, R., Malm, A. (2015). Antibacterial, antiradical potential and phenolic compounds of thirty-one Polish mushrooms. *PLoS ONE* 10(10): e0140355. doi:10.1371/journal.pone.0140355.
- Obodai, M.**, Ferreira, I.C.F.R, Fernandes, Â., Barros, L., Mensah, D.L.N., Dzomeku, M., Urben, A.F., Prempeh, J., Takli, R.K. (2014). Evaluation of the chemical and antioxidant properties of wild and cultivated mushrooms of Ghana. *Molecules*. 19: 19532–19548.
- Oki, T.**, Masuda, M., Furuta, S., Nishibia, Y., Terahara, N., Suda, I. (2002). Involvement of anthocyanins and other phenolic compounds in radical-scavenging activity of purple-fleshed sweet potato cultivars. *Food and Chemical Toxicology*. 67: 1752–1756.
- Okoro, I.O.** (2012). Antioxidant activities and phenolic contents of three mushroom species, *Lentinus squarrosulus* Mont., *Volvariella esculenta* (Masse) Singer and *Pleurocybella porrigens* (Pers.) Singer. *International Journal of Nutrition and Metabolism*. 4(5): 72–76.
- Olennikov, D.N.**, Agafonova, S.V., Penzina, T.A., Borovski, G.B. (2014). Fatty acid composition of fourteen wood-decaying Basidiomycete species growing in permafrost conditions. *Records of Nature Products*. 8(2): 184–188.
- Ooi, V.E.**, Liu E. (2000). Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current Medicinal Chemistry*. 7: 715–729.
- Orčić, D.**, Francšković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., & Mimica-Dukić, N. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chemistry*. 143: 48–53.
- Orhan, I.**, Üstün, O. (2011). Determination of total phenol content, antioxidant activity and AChE inhibition in selected mushrooms from Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24: 386–390.
- Ozen, T.**, Darcan, C., Aktop, O., Turkekel, I. (2011). Screening of antioxidant, antimicrobial activities and chemical contents of edible mushrooms wildy grown in the Black Sea region of Turkey. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 14: 72–84.
- Öztürk, M.**, Duru, M.E., Kivrak, S., Mercan-Doğan, N., Türkoğlu, A., Özler, M.A. (2011). *In vitro* antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology*. 49: 1353–1360.
- Pastor, N.**, Weinstein, H., Jamison, E., Brenowitz, M. (2000). A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBPDNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequencespecific binding. *Journal of Molecular Biology*. 304: 55–68.
- Patel, R.M.** (2014). Comparative antioxidant activity evaluation and HPTLC phytochemical fingerprinting of some Indian medicinal plant extracts. *CIB Tech Journal of Bio-Protocols*. 3(1): 19e34.
- Patel, S.**, Goyal, A. (2012). Recent developments in mushrooms as anticancer therapeutics: a review. *3 Biotech*. 2(1):1e15.
- Patric, G.L.** (2005). An introduction to medicinal chemistry. Oxford University Press, p. 432–482.
- Pejin, B.**, Karaman, M. (2017). Antitumor natural products from marine-derived fungi. In: *Reference Series in Phytochemistry: Fungal Metabolites*, Kishan Ramawat, Jean-Michel Mérillon (eds.) Springer Publishing Inc., Switzerland, ISBN: 978-3-319-19456-1. doi: 10.1007/978-3-319-19456-1_25-1.
- Pejin, B.**, Tommonaro, G., Iodice, C., Tesevic, V., Vajs, V., De Rosa, S. (2012). A new lichen depsidone from *Lobaria pulmonaria*. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 7: 1663–1666.
- Pejin, B.**, Iodice, C., Stanimirovic, B., Vajs, V., Tesevic, V. (2014). A novel β -orcinol depsidone of the lichen *Lobaria pulmonaria*. *Asian Journal of Chemistry*. 26 (23): 8257–8258.
- Pejin, B.**, Jovanovic, K., Mojovic, M., Savic, A. (2013). New and highly potent antitumor natural products from marine-derived fungi: covering the period from 2003 to 2012. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 13: 2745–2766.
- Pejin, B.**, Tommonaro, G., Iodice, C., Tesevic, V., Vajs, V. (2012). Acetylcholinesterase inhibition activity of acetylated depsidones from *Lobaria pulmonaria*. *Natural Product Research*. 26: 1634–1637.
- Pejin, B.**, Tommonaro, G., Iodice, C., Tesevic, V., Vajs, V., Rosa (de Salvatore). (2013). A new depsidone from *Lobaria pulmonaria* with acetylcholinesterase inhibition activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry*. 28: 876–878.

- Pejin, B., Tommonaro, G., Iodice, C., Tesevic, V., Vajs, V. (2012). Acetylcholinesterase inhibition activity of acetylated depsidones from *Lobaria pulmonaria*. *Natural Product Research*. 26: 1634-1637.
- Pero, R.W., Lund, H., Leanderson, T. (2009). Antioxidant metabolism induced by quinic acid. Increased urinary excretion of tryptophan and nicotinamide. *Phytotherapy Research*. 23(3): 335-46.
- Peterson, R.L., Massicotte, H.B., Melville, L.H. (2004). *Mycorrhizas: Anatomy and cell biology*. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Petrović, O., Knežević, P., Simeunović, J. (2007). Mikologija – Skripta za studente biologije. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Petrović-Fabijan, A. (2017). Doktorska disertacija. Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Poucheret, P., Fons, F., Rapior, S. (2006). Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-Year retrospective analysis. *Mycologie*. 27: 311-333.
- Puttaraju, N.G., Venkateshaiah, S.U., Dharmesh, S.M., Urs, S.M., Somasundaram, R. (2006). Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 9764-9772.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman-Caldentey, K.M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*. 90(4): 494-507.
- Radnović, D., Matavulj, M., Karaman, M. (2008). Mikologija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Rao, P.S., Satelli, A., Moridani, M., Jenkins, M., Rao U.S. (2012). Luteolin induces apoptosis in multidrug resistant cancer cells without affecting the drug transporter function: involvement of cell line-specific apoptotic mechanisms. *International Journal of Cancer*. 130(11): 2703-2714.
- Rašeta, M. (2016). Detekcija bioaktivnih supstanci vrsta gljiva roda *Ganoderma* (Basidiomycota) i njihova biološka aktivnost. Doktorska disertacija. Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Rathee, S., Rathee, D., Rathee, D., Kumar, V., Rathee, P. (2012). Mushrooms as therapeutic agents. *Brazilian Journal of Pharmacology*. 22(2): 459e74.
- Ravichandran, S., Veerasamy, R., Raman, S., Krishnan, P.N., Agrawala, R.K. (2008). An overview on HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 3(4): 171-187.
- Ray, B., Bisht, S., Maitra, A., Lahiri, D.K. (2011). Neuroprotective and neurorescue effects of a novel polymeric nanoparticle formulation of curcumin (NanoCurc) in the neuronal cell culture and animal model: implications for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Disease*. 23: 61-77.
- 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.
- 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.
- Rezg, R., Mornagui, B., El-Fazaa, S., Gharbi, N. (2008). Caffeic acid attenuates malathion induced metabolic disruption in rat liver, involvement of acetylcholinesterase activity. *Toxicology*. 250: 27-31.
- Ribeiro, B., Rangel, J., Valentão, P., Baptista, P., Seabra, R.M., Andrade, P.B. (2006). Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried Portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 8530-8537.
- Rincão, V.P., Yamamoto, K.A., Ricardo, N.M.P.S., Soares, S.A., Meirelles, L.D.P., Nozawa, C., Linhares, R.E.C. (2012). Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity. *Virology Journal*. 9: 37
- Rosa, L.H., Machado, K.M.G., Jacob, C.C., Capelari, M., Rosa, C.A., Zani, C.L. (2003). Screening of Brazilian Basidiomycetes for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98: 967-974.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3. izdanje. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA
- Sánchez, C. (2004). Modern aspects of mushroom culture technology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64(6): 756e62.
- Sánchez, C. (2010). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85(5):1321e37.
- Sánchez, C. (2017). Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and Systems Biotechnology* .2: 13e22
- Schwabe, R.F., Jobin, C. (2013). The microbiome and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 13: 800-812.
- Schwarze, F.W.M.R. (2007). Wood decay under the microscope. *Fungal Biology Reviews*. 1-38.
- Seabra, R.M., Andrade, P.B., Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Bastos, M.L. (2006). Anti-oxidant compounds extracted from several plant materials. In: *Biomaterials from aquatic and terrestrial organisms*. Science Publishers-Enfield (NH) Jersey Plymouth, New Hampshire.
- Senatore, F., Dini, A., Marino, A. (1988). Chemical constituents of some basidiomycetes. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 45: 337-345.
- Sheena, N., Ajith, T.A., Mathew, A.T., Janardhanan, K.K. (2003). Antibacterial activity of three macrofungi, *Ganoderma lucidum*, *Navesporus floccosa* and *Phellinus rimosus* occurring in South India. *Pharm Biol*. 41: 564-567. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. doi: 10.1111/1541-4337.12255.
- Shepard, C.W., Finelli, L., Alter, M.J. (2005). Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *The Lancet Infectious Diseases*. 5(9): 558-567.
- Si, C.L., Lu, Y.Y., Zhang, Y., Xu, J., Qin, P.P., Sun, R.C., Ni, Y.H. (2011). Antioxidative low molecular weight extractives from triploid *Populus tomentosa* xylem. *Bioresources*. 6: 232-42.
- Singh, R., Singh, B., Singh, S., Kumar, N., Kumar, S., Arora, S. (2008). Anti-free radical activities of kaempferol isolated from *Acacia nilotica* (L.) Willd. Ex. Del. *Toxicology in Vitro*. 22: 1965-1970.
- Singleton, V.L., Orthofer, R.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.
- Smaili, S., Hirata, H., Ureshino, R., Monteforte, P.T., Morales, A.P., Muler, M.L., et al. (2009). Calcium and cell death signaling in neurodegeneration and aging. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 81: 467-75.

- Sorimachi, K.,** Ikehara, Y., Maezato, G., Okubo, A., Yamazaki, S., Akimoto, K. and Niwa, A. (2001). Inhibition by *Agaricus blazei* Murrill fractions of cytopathic effect induced by Western Equine Encephalitis (WEE) Virus on VERO Cells in vitro. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 65: 1645–1647.
- Sroka, Z.,** Cisowski, W. (2003) Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*. 41(6): 753-8.
- Su, X.Y.,** Wu, W.H., Huang, Z.P., Hu, J., Lei, P., Yu, C.H. (2007). Hydrogen peroxide can be generated by tau in the presence of Cu(II). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 358: 661-5.
- Sun, M.T.,** Xiao, J.T., Zhang, S.Q., Liu, Y.J., Li, S.T. (1984). Therapeutic effect of some foods on hyperlipidemia in man. *Acta Nutrition Sinica*. 6: 127-133.
- Sung, B.,** Chung, H.Y., Kim, N.D. (2016). Role of Apigenin in Cancer Prevention via the Induction of Apoptosis and Autophagy. *Journal of Cancer Prevention*. 21(4): 216–226.
- Sužnjević, D.,** M. Petrović, F. Pastor, M. Veljović, S. Zlatanović, M. Antić and S. Gorjanović. (2015). Reduction of Hg²⁺ by individual phenolics and complex samples and its application in polarographic antioxidant assay. *Journal of The Electrochemical Society*. 162 (7): H1-H6.
- Sužnjević, D.Ž.,** Pastor, F.T., Gorjanović, S. (2011). Polarographic study of hydrogen peroxide anodic current and its application to antioxidant activity determination. *Talanta*. 85: 1398-1403.
- Svoboda, L.,** Chrástný, V. (2008). Levels of eight trace elements in edible mushrooms from a rural area. *Food Additives and Contaminants*. 25: 51–58.
- Syad, A.N.,** Shunmugiah, K.P., Kasi, P.D. (2012). Assessment of anticholinesterase activity of *Gelidiella acerosa*: Implications for its therapeutic potential against Alzheimer's disease. *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*. 497242.
- Szwajgier, D.** (2015). Anticholinesterase activity of selected phenolic acids and flavonoids – interaction testing in model solutions. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 22: 690–694.
- Szwajgier, D.** (2015). Anticholinesterase activity of selected phenolic acids and flavonoids –interaction testing in model solutions. *Ann Agr Env Med*. 22: 690–694.
- Tanaka, M.,** Kuie, C.W., Nagashima, Y., Taguchi, T. (1988). Applications of antioxidative Maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 54: 1409–1414.
- Teplyakova, T.V.,** Psurtseva, N.V., Kosogova, T.A., Mazurkova, N.A., Khanin, V.A., Vlasenko, V.A. (2012). Antiviral activity of polyporoid mushrooms (higher Basidiomycetes) from Altai Mountains (Russia). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 14(1): 37–45.
- Torres, S.,** Cabrera-Pardo, R.J., Alonso, F., Bustos, E., Pérez, C., Palfner, G., Hernández, V Uriarte, E., Becerra, J. (2016). Changes in secondary metabolites profiles and biological activity of the fresh fruiting bodies of *Stereum hirsutum* exposed to high-dose uv-b radiation. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 61(4).
- Tremli, J.,** Šmejkal, K. (2016). Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 15: doi: 10.1111/1541-4337.12204.
- Tu, Q.,** Zheng, R., Li, J., Hu, L., Chang, Y., Li, L., Li, M., Wang, R., Huang, D., Wu, M.C., Hu, H., Chen, L., Wang, H. (2014). Palmitic acid induces autophagy in hepatocytes via JNK2 activation. *Acta Pharmacologica Sinica*. 35: 504–512.
- Valentão, P.,** Lopes, G., Valente, M., Barbosa, P., Andrade, P.B., Silva, B.M., Baptista, P., Seabra, R.M. (2005). Quantification of nine organic acids in wild mushrooms. *Journal of Agric Food Chemistry*. 53: 3626–3630.
- Valko, M.,** Morris, H., Cronin, M.T.D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*. 12: 1161–1208.
- Vaz, J.A.,** Barros, L., Martins, A., Sá Morais, J., Vasconcelos, M.H., Ferreira, I.C.F.R. (2011). Phenolic profile of seventeen Portuguese wild mushrooms. *LWT- Food Science and Technology*. 44(1): 343-346.
- Vislocky, L.M.,** Fernandez, M.L. (2010). Biomedical effects of grape products. *Nutrition Reviews*. 68: 656–670.
- Wang, J.,** Wang, H.X., Ng, T.B. (2007). A peptide with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the medicinal mushroom *Russula paludosa*. *Peptides*. 28(3): 560–565.
- Wang, H.,** Ng, T.B., Ooi, V.E.C. (1998). Lectins from mushrooms. *Mycological Research*. 102: 897–906.
- Wang, H.X.,** Ng, T.B. (2000). Isolation of a novel ubiquitin- like protein from *Pleurotus ostreatus* mushroom with anti-human immunodeficiency virus, translation-inhibitory, and ribonuclease activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 276: 587–593.
- Wang, Y.,** Bao, L., Yang, X., Li, L., Li, S., Gao, H., Yao, X-S., Wen, H., Liu, HW. (2012). Bioactive sesquiterpenoids from the solid culture of the edible mushroom *Flammulina velutipes* growing on cooked rice. *Food Chemistry*. 132: 1346-1353.
- Wasser, S.P.** (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60: 258–274.
- 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.
- Watkinson, S.C.,** Body, L., Burton, K., Darrahr, P.R., Eastwood, D., Fricker, M.D., Tlalka, M. (2005). New approaches to investigating the function of mycelial networks. *Mycologist*. 19: 11–17.
- Weil, J.A.,** Bolton, J.R. (2007). *Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*. New York: Wiley and Sons.
- Wong, D.W.S.** (2006). Feruloyl esterase: a key enzyme in biomass degradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 133: 87-112.
- Wong, J.H.,** Ng, T.B., Cheung, R.C.F., Ye, X.J., Wang, H.X., Lam, S.K., Lin, P., Chan, Y.S., Fang, E.F., Ngai, P.H.K., Lia, L.X., Ye, X.Y., Jiang, Y., Liu, F. (2010). Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87: 1221-1235.
- Xia, M.,** Huang, R., Witt, K. L., Southall, N., Fostel, J., Cho, M., Austin, C. P. (2008). Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening. *Environmental health perspectives*. 116(3): 284.
- Xu, X.,** Yan, H., Chen, J., Zhang, X. (2011). Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology Advances*. 29: 667–74.
- Yamaç, M.,** Bilgili, F. (2006). Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial 587 cultures of some mushroom isolates. *Pharmaceutical Biology*. 44: 660–667.
- Yeh, C.T.,** Yen, G.C. (2006). Involvement of p38 MAPK and Nrf2 in phenolic acid-induced P-form phenol sulfotransferase expression in human hepatoma HepG2 cells. *Carcinogenesis*. 27 (5): 1008–1017.
- Yen, G.C.,** Duh, P.D., Tsai, H.L. (2002). Antioxidant and Pro-Oxidant Properties of Ascorbic Acid and Gallic Acid. *Food Chemistry*. 79 (3): 307-313.

- Yip**, E.C.H., Chan, A.S.L., Pang, H., Tam, Y.K., Wong, Y.H. (2006). Protocatechuic acid induces cell death in HepG2 hepatocellular carcinoma cells through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Cell Biology and Toxicology*. 22: 293-302.
- Young**, S.N. (2013). Single treatments that have lasting effects: some thoughts on the antidepressant effects of ketamine and botulinum toxin and the anxiolytic effect of psilocybin. *J Psychiatry Neurosci* 38(2): 78–83.
- Zakaryan**, H., Arabyan, E., Oo, A., Zandi, K. (2017). Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Archives of Virology*. doi 10.1007/s00705-017-3417-y.
- 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**, M., Cui, S.W., Cheung, P.C.K., Wang, Q. (2007). Polysaccharides from mushrooms: A review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology*, 18: 4–19.
- Zhang**, S., Liu, X., Yan, L., Zhang, Q., Huang, J.Z.N., Wang, Z. (2015). Chemical compositions and antioxidant activities of polysaccharides from the sporophores and cultured products of *Armillaria mellea*. *Molecules*. 20: 5680-5697.
- Zhang**, X.D., Liu, X.Q., Kim, Y.H., et al. (2014). Chemical constituents and their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities from leaves of *Acanthopanax henryi*: potential complementary source against Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacol Research*. 37: 606–616.
- Zhu**, Y.C., Wang, G., Yang, X.L., Luo, D.Q., Zhu, Q.C., Peng, T., Liu, J.K. (2010). Agrocybone, a novel bis-sesquiterpene with a spirodienone structure from basidiomycete *Agrocybe salicicola*. *Tetrahedron Letters*. 51: 3443–3445.
- Zitvogel**, L., Galluzzi, L., Viaud, S., Marie Vétizou, M., Daillère, R., Merad, M., Kroemer, G. (2015). Cancer and the gut microbiota: An unexpected link. *Science Translational Medicine*. 7(271): 271 ps 1. doi:10.1126/scitranslmed.3010473
- Zjawiony**, J.K. (2004). Biologically active compounds from Aphyllophorales (Polypore) fungi. *Journal of Natural Product*. 67:300–10.

Internet izvori:

- http://db.39kf.com/jjzj/Show_21.shtml
- https://etc.usf.edu/clipart/82200/82226/82226_hydnum_repan.htm
- <https://www.studyblue.com/notes/note/n/pharma-antifungal-and-antiviral-drugs/deck/14098182>
- <https://i0.wp.com/globalmedicaldiscovery.com/wp-content/uploads/2014/10/Anticancer-substances-of-mushroom-origin.jpg>
- [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2009-11-11_Bjerkandera_adusta_\(Willd.\)_P._Karst_64486.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2009-11-11_Bjerkandera_adusta_(Willd.)_P._Karst_64486.jpg)
- <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Bjerkandera+adusta>
- <http://www.planetdeadly.com/nature/poisonous-mushrooms>
- <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Pleurocybella+porrigens>
- <http://www.first-nature.com/fungi/stereum-hirsutum.php>
- <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Stereum+hirsutum>
- http://www.pilz-pilz.de/index.php?cmd=suche&genre=latein&the_gattung=Stereum&the_art=subtomentosum
- <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Stereum+subtomentosum>
- <http://www.panoramio.com/photo/78747326>
- <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Trametes+versicolor>
- <http://wikigrub.ru/muxomor-shishkovidnyj/>
- <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Amanita+strobiliformis>
- http://www.wikiwand.com/en/Hydnum_repandum
- <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Hydnum+repandum>

9. BIOGRAFIJA

Ljiljana Janjušević (rođ. Janjić) rođena je 27. avgusta 1984. godine u Prnjavoru u Bosni i Hercegovini. Završila je osnovnu školu „22 avgust“ u Bukovcu i opšti smer Gimnazije „Svetozar Marković“ u Novom Sadu. Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu upisala je 2003. godine. Na Departmanu za biologiju i ekologiju diplomirala je u oktobru 2009. godine i stekla zvanje Diplomirani biolog. Iste godine upisala je drugi stepen diplomskih akademskih studija takođe na Departmanu za biologiju i ekologiju, smer Mikrobiologija i izabrana je u zvanje istraživača pripravnika na Katedri za mikrobiologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. Master akademske studije završila je 2010. godine i iste godine je upisala Doktorske akademske studije, smer Doktor bioloških nauka.



Od 2011. godine kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja angažovana je na projektu Prirodno-matematičkog fakulteta pod nazivom „Biološki aktivni prirodni proizvodi kao potencijalni izvor novih lekova i dijetetskih suplemenata“ broj OI 172058 Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, čiji je rukovodilac prof. dr Neda Mimica-Dukić. Godine 2012. izabrana je u zvanje Istraživača saradnika za užu naučnu oblast Mikrobiologija na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, a u julu 2017. godine reizabrana je u isto zvanje.

U toku doktorskih studija učestvovala je u izvođenju praktične nastave na Katedri za mikrobiologiju u okviru predmeta Sistematika algi i gljiva, za studente osnovnih akademskih studija, kao i na predmetima Bioaktivni metaboliti mikroorganizama i Eksperimentalna mikrobiologija za studente master akademskih studija.

Koautor je rada u vodećem međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti kategorije M21a, (objavljeni rezultati ove disertacije), tri rada kategorije M22, jednog rada kategorije M23, a takođe je koautor preko 20 saopštenja na međunarodnim skupovima i skupovima nacionalnog značaja.

Član je Društva mikrobiologa Srbije i Evropskog društva mikrobiologa (*The Federation of European Microbiological Societies - FEMS*).

Udata je i ima dve ćerke, Jovanu i Ninu.

Novi Sad, jul 2017. godine.

Ljiljana Janjušević, MSc

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

Redni broj, RBR:	
Identifikacioni broj, IBR:	
Tip dokumentacije, TD:	Monografska dokumentacija
Tip zapisa, TZ:	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada, VR:	Doktorska disertacija
Autor, AU:	Ljiljana Janjušević, MSc
Mentor, MN:	dr Maja Karaman, vanredni profesor dr Boris Pejin, naučni saradnik
Naslov rada, NR:	Biološka aktivnost i hemijski sastav ekstrakata odabranih autohtonih makrogljiva
Jezik publikacije, JP:	Srpski (latinica)
Jezik izvoda, JI:	Srpski / engleski
Zemlja publikovanja, ZP:	Republika Srbija
Uže geografsko područje, UGP:	AP Vojvodina
Godina, GO:	2017.
Izdavač, IZ:	Autorski reprint
Mesto i adresa, MA:	Novi Sad, Departman za biologiju i ekologiju, PMF, Trg Dositeja Obradovića 2
Fizički opis rada, FO:	Poglavlja (8), strana (131), literaturnih citata (251), tabela (23), slika (50)
Naučna oblast, NO:	Biologija
Naučna disciplina, ND:	Mikrobiologija
Ključne reči, KR:	lignikolne gljive, terikolne gljive, antiradikalska aktivnost, antioksidantna aktivnost, antifungalna aktivnost, anti-acetilholinesterazna aktivnost, citotoksična aktivnost, fenolna jedinjenja, polisaharidi, funkcionalna hrana, biokontrolni agensi
Univerzalna decimalna klasifikacija, UDK:	
Čuva se, ČU:	Biblioteka Departmana za biologiju i ekologiju, PMF Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Srbija
Važna napomena, VN:	

Izvod, IZ:	<p>Prema postavljenim ciljevima u ovoj doktorskoj disertaciji sakupljeno je i determinisano ukupno sedam vrsta autohtonih gljiva sa područja Fruške gore, Tare i Vršačkog brega, pet lignikolnih - <i>Bjerkandera adusta</i>, <i>Pleurocybella porrigens</i>, <i>Stereum hirsutum</i>, <i>Stereum subtomentosum</i> i <i>Trametes versicolor</i>, i dve terikolne - <i>Amanita strobiliformis</i> i <i>Hydnum repandum</i>. Utvrđena je njihova biološka aktivnost (antiradikalska, antioksidativna, antimikrobna, anti-acetilholinesterazna i citotoksična) spram hemijskog sastava njihovih vodenih (H₂O), etanolnih (EtOH), metanolnih (MeOH) i polisaharidnih (PSH) ekstrakata. Analiza hemijskog sastava odabranih vrsta uključila je određivanje hemijske karakterizacije PSH ekstrakata - FTIR analizom, određivanje fenolnog profila - HPMC/MS-MS, sadržaja organskih kiselina - HPLC, sadržaja masnih kiselina - GC-FID i sadržaja biogenih elemenata - AAS. Spektrofotometrijskim metodama određen je ukupan sadržaj proteina i ukupan sadržaj fenola i flavonoida. Prema antiradikalnoj aktivnosti OH[•], O₂^{•-}, OH[•], Asc[•], DPPH[•] i ABTS^{•+} izdvojili su se ekstrakti lignikolnih vrsta: MeOH ekstrakt vrste <i>P. porrigens</i>, H₂O ekstrakt <i>P. porrigens</i>, MeOH ekstrakt <i>T. versicolor</i>, H₂O ekstrakt <i>S. hirsutum</i>, MeOH ekstrakt <i>S. subtomentosum</i> i H₂O ekstrakt <i>B. adusta</i>, navedenim redom. Najjaču antioksidativnu aktivnost dobijenu FRAP i polarografskom HPMC metodom ispoljili su PSH i H₂O ekstrakti terikolne vrste <i>A. strobiliformis</i>. Antimikrobna aktivnost analiziranih ekstrakata određena je ispitivanjem antibakterijskog, antifungalnog i antiviralnog potencijala, pri čemu se izdvojila vrsta <i>H. repandum</i> ispoljavajući najbolji efekat na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije i na sve analizirane fitopatogene izolate (<i>Fusarium</i> i <i>Alternaria</i>) i <i>T. versicolor</i> na analizirani bakteriofag. Anti-acetilholinesterazna aktivnost određena je testovima <i>in solid</i> i <i>in liquid</i>, a najbolji procenat inhibicije AChE ispoljili su EtOH ekstrakti vrsta <i>S. hirsutum</i>, <i>B. adusta</i>, <i>S. subtomentosum</i> i <i>T. versicolor</i>. Citotoksična aktivnost ekstrakata određena je MTT testom, a prema najboljoj ispoljenoj aktivnosti izdvojili su se MeOH ekstrakt <i>P. porrigens</i> i ekstrakti <i>B. adusta</i>, H₂O i EtOH. Citotoksična aktivnost ovih lignikolnih vrsta naročito je izražena nakon 72 h. Na osnovu dobijenih rezultata, gde su se istakle različite vrste i njihovi različiti ekstrakti u primenjenim testovima, jasno je da biološka aktivnost i hemijski sastav zavise od porekla, vrste i tipa ekstrakta analiziranih gljiva. Na osnovu tipa rastvarača odnosno ekstrakata vrsta, koje su pokazale najbolju aktivnost spram pomenutih testova i na osnovu dobijenih korelacija kao i na osnovu detektovanih jedinjenja, pretpostavljamo da su za ispoljene aktivnosti u najvećoj meri odgovorna fenolna jedinjenja i polisaharidi.</p> <p>Ispoljeni biopotencijal analiziranih vrsta gljiva upućuje na njihovu potencijalnu upotrebu kao funkcionalne hrane i nutraceutika, kao i u biokontroli fitopatogena.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća, DP:	28.05.2015.
Datum odbrane, DO:	

Članovi komisije, KO:	
Predsednik:	dr Petar Knežević, vanredni profesor, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu
Mentor:	dr Maja Karaman, vanredni profesor, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu
Mentor:	dr Boris Pejin, naučni saradnik, Instituta za multidisciplinarna istraživanja (IMSI) - Odsek za nauke o živim sistemima Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
Član:	dr Stanislava Gorjanović, naučni savetnik, Instituta za opštu i fizičku hemiju, Beograd
Član:	dr Sonja Kaišarević, vanredni profesor, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu
Član:	dr Aleksandra Novaković, naučni saradnik Instituta za prehrambene tehnologije Univerziteta u Novom Sadu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number, ANO:	
Identification number, INO:	
Document type, DT:	Monograph type
Type of record, TR:	Printed text
Contents code, CC:	PhD thesis
Author, AU:	Ljiljana Janjušević, MSc
Mentor, MN:	Dr Maja Karaman, asisstant professor
Mentor, MN:	Dr Boris Pejin, research assistant professor
Title, TL:	Biological activity and chemical characteristics of selected extracts of autochtonous macrofungi
Language of text, LT:	Serbian (Latin alphabet)
Language of abstract, LA:	Serbian/English
Contry of publication, CP:	Republic of Serbia
Locality of publication, LP:	Vojvodina
Publication year, PY:	2017
Publisher, PU:	Author's reprint
Publ. place, PP:	Novi Sad, Faculty of Sciences, Department of Biology and Ecology, Trg Dositeja Obradovića 2
Physical description, PD:	Chapters (8), pages (131), references (251), figures (50), tables (23)
Scientific field, SF:	Biology
Scientific discipline, SD:	Microbiology
Key words, KW:	lignicolous fungi, terricolous fungi, antiradical activity, antioxidant activity, antimicrobial activity, anti-acetylcholinesterase activity, cytotoxic activity, phenol compounds, polysaccharides, functional foods, biocontrol agents
Universal decimal classification, UDC:	
Holding data, HD:	The Library of Dept. of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Serbia
Note, N:	

Abstract: AB	<p>According to the set aims of the presented PhD thesis, seven autochthonous fungal species from the region of Fruska Gora, Tara and Vršac Mountains were collected and determined: five lignicolous - <i>Bjerkandera adusta</i>, <i>Pleurocybella porrigens</i>, <i>Stereum hirsutum</i>, <i>Stereum subtomentosum</i> and <i>Trametes versicolor</i>, and two terricolous - <i>Amanita strobiliformis</i> and <i>Hydnum repandum</i>. Biological activity of these species (antiradical, antioxidant, antimicrobial, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic) was determined in relation to the chemical composition of the extracts, aqueous (H₂O), ethanolic (EtOH), methanolic (MeOH) and polysaccharide (PSH). Analysis of the chemical content of analyzed species included chemical characterization of PSH extracts – by FTIR analysis, determination of phenolic profile - by HPMC/MS-MS, content of organic acids - by HPLC, fatty acid content - by GC-FID and content of biogenic elements - by AAS. Spectrophotometric methods were applied for determination of the content of total proteins, polyphenols and flavonoids. According to the antiradical activity obtained towards OH[•], O₂^{•-}, OH[•], Asc[•], DPPH[•] and ABTS^{•+} extracts of lignicolous species were singled out: <i>P. porrigens</i> (MeOH extract), <i>P. porrigens</i> (H₂O extract), <i>T. versicolor</i> (MeOH extract), <i>S. hirsutum</i> (H₂O extract), <i>S. subtomentosum</i> (MeOH extract) and <i>B. austa</i> (H₂O extract), respectively. The highest antioxidant activity obtained by FRAP and the polarographic HPMC method was exhibited for PSH and H₂O extracts of the terricolous species <i>A. strobiliformis</i>. The antimicrobial activity of analyzed extracts was determined by examination of antibacterial, antifungal and antiviral potentials, whereby the species <i>H. repandum</i> was separated by exhibiting the best effect on Gram-positive and Gram-negative bacteria, and all the analyzed phytopathogenic isolates (<i>Fusarium</i>, <i>Alternaria</i>) and <i>T. versicolor</i> against analyzed bacteriophage. Anti-acetylcholinesterase activity was determined by tests <i>in solid</i> and <i>in liquid</i>, while the best percent of AChE inhibition was showed by EtOH extracts of the species <i>S. hirsutum</i>, <i>B. adusta</i>, <i>S. subtomentosum</i> and <i>T. versicolor</i>. The cytotoxic activity of extracts was determined by MTT assay, and according to the best activity, the MeOH extract of <i>P. porrigens</i>, and H₂O and EtOH extracts of <i>B. adusta</i> were distinguished particularly after 72 h. Based on the results obtained, favoring different species and their different extracts in the applied tests, it is clear that the biological activity and chemical composition depend on the origin, species and type of extract of the analyzed fungi. Based on the type of solvent or extract of the species that showed the best activity in relation to the above tests and on the basis of the obtained correlations as well as on the basis of the detected compounds, we assume that the phenol compounds and polysaccharides are responsible for the activities performed.</p> <p>Demonstrated bio-potential of analyzed fungal species indicates their potential use as functional foods and nutraceuticals, as well as in the</p>
-----------------	---

	biocontrol of phytopathogens.
Accepted by the Scientific Board on, ASB:	28.05.2015.
Defended on, DE:	
Thesis defend board, DB: Chairperson:	Dr. Petar Knežević, associate professor, Faculty of Sciences, Novi Sad
Mentor:	Dr. Maja Karaman, associate professor, Faculty of Sciences, Novi Sad
Mentor:	Dr. Boris Pejin, research assistant professor, Institute for Multidisciplinary Research - IMSI, University of Belgrade
Member:	Dr. Stanislava Gorjanović, full research professor, Institute of General and Physical Chemistry
Member:	Dr. Sonja Kaišarević, associate professor, Faculty of Sciences, Novi Sad
Member:	Dr. Aleksandra Novaković, research assistant professor, Institute of Food Technology, Novi Sad