

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

кандидата Милене Рашете

-обавезна садржина- свака рубрика мора бити попуњена

(сви подаци уписују се у одговарајућу рубрику, а назив и место рубрике не могу се мењати или изоставити)

<b>I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ</b>
<p>1. Датум и орган који је именовao комисију 08.06.2016. године (12. седница), Наставно-научно веће Природно-математичког факултета у Новом Саду</p> <p>2. Састав комисије са знаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:</p> <p>1. <b>др Неда Мимица-Дукић</b>, редовни професор, ужа научна област биохемија, датум избора: 01.08.2003. године, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, председник</p> <p>2. <b>др Мира Поповић</b>, професор у пензији, ужа научна област општа хемија, датум избора: 25.02.2000. године, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, <b>ментор</b></p> <p>3. <b>др Маја Караман</b>, ванредни професор, ужа научна област микробиологија, датум избора: 15.05.2015. године, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, <b>ментор</b></p> <p>4. <b>др Борис Поповић</b>, ванредни професор, ужа научна област хемија и биохемија, датум избора: 13.02.2014. године, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду, члан</p> <p>5. <b>др Биљана Кауриновић</b>, ванредни професор, ужа научна област општа хемија, датум избора: 03.12.2015. године, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, члан</p>
<b>II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ</b>
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме: Миленa, Јово, Рашета</p> <p>2. Датум рођења, општина, држава: 21.02.1984. године, Бихаћ, Босна и Херцеговина</p> <p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив: Природно-математички факултет Универзитета у Новом Саду, смер: дипломирани хемичар – биохемија, стечени стручни назив: Дипломирани хемичар – биохемија.</p> <p>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија: Година уписа – 2008. година, студијски програм - докторске студије биохемије.</p> <p>5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: /</p> <p>6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: /</p>
<b>III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:</b>

“Детекција биоактивних супстанци одабраних врста гљива рода *Ganoderma* (Basidiomycota) и њихова биолошка активност”

#### IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Докторска дисертација Милене Рашете је написана на 396 страна од којих је 326 у штампаној верзији, а 70 страна у Додатном материјалу приложеном на ЦД-у. Дисертација садржи: 34 слике, 89 табела (50 у Додатном материјалу на ЦД-у), 576 литературна навода, 98 графикана у Додатном материјалу на ЦД-у и 25 хистограма. Текст је подељен у седам поглавља: УВОД, ОПШТИ ДЕО, ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО, РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА, ЗАКЉУЧАК, ЛИТЕРАТУРА, ПРИЛОГ (Додатни материјал на ЦД-у).

#### V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

На почетку докторске дисертације налази се **САДРЖАЈ** (6 страна) који даје преглед основних целина дисертације (поглавља и потпоглавља) ради брзе претраге дисертације, и јасног прегледа свих делова тезе.

У **УВОДНОМ** (10 страна) делу представљен је значај и преглед дугогодишње употребе гљива од најстаријих људских цивилизација. Приказан је кратак осврт на представнике рода *Ganoderma* (Basidiomycota), анализиране у овој дисертацији. Пошто је на основу досадашњих истраживања оправдано очекивати да су представници рода *Ganoderma*, тачније врсте *G. applanatum* и *G. lucidum* значајан извор биоактивних молекула, за истраживања у овој докторској дисертацији одабране су наведене врсте: *G. applanatum* (Pers.) Pat. 1887, *G. lucidum* (Curtis) P. Karst. 1881, као и *G. pfeifferi* (Bres. 1889) и *G. resinaceum* Boud in Pat. 1890. *G. resinaceum* је на основу литературних података до сада недовољно истражена врста.

Дефинисани циљеви истраживања су били (2 стране):

Хемијска карактеризација наведених врста гљива која је подразумевала испитивање садржаја макро- и микроелемената (ААС), одређивање квантитативног садржаја одабраних фенолних једињења (LC-MS/MS анализа) и спектрофотометријско одређивање садржаја протеина, шећера, укупних фенола и флавоноида.

Биолошка испитивања су обухватила одређивање антиоксидантног (*in vitro* и *in vivo*), антимикробног (антибактеријска, антифунгална и антивирална активност), антиинфламаторног (инхибиција метаболита арахидонске киселине), антипролиферативног и антидијабетогеног потенцијала етанолних (EtOH) и водених (H<sub>2</sub>O) екстраката анализираних врста. Антиоксидантни потенцијал *in vivo* је праћен кроз утицај екстраката на активност ензима оксидативног стреса код алоксан-индукованог дијабетеса, при чему је утврђен и ниво хепато- и нефропротективног потенцијала врста *G. pfeifferi* и *G. resinaceum*. Антипролиферативни утицај одабраних екстраката на естроген зависну канцер ћелијску линију (MCF-7) праћен је кроз субкутну (24h) и хроничну (72h) инкубацију.

У **ОПШТЕМ ДЕЛУ** дисертације (113 страна) дат је детаљан опис испитиваних врста и преглед литературних података везаних за хемијски састав, биолошке активности и примену врста које припадају роду *Ganoderma*. Ово поглавље је подељено на 6 делова. У првом делу (ГЉИВЕ) детаљно су дати подаци о пореклу, еволуцији и класификацији гљива раздела Basidiomycota. Дат је преглед литературних података о хемијском саставу и биолошким активностима анализираних врста гљива рода *Ganoderma*. На основу доступне литературе утврђено је да су досадашња истраживања углавном била усмерена на две космополитске врсте: *G. applanatum* и *G. lucidum* (највише истражена врста рода *Ganoderma*), а у знатно мањем обиму на врсту *G. pfeifferi*, док је о врсти *G. resinaceum* доступно веома мало литературних података, те постоји потреба за детаљнијим микохемијским (биохемијским и биолошким) истраживањима наведених врста. Други део (**ОКСИДАТИВНИ СТРЕС И АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ ГЉИВА**) чини преглед реактивних кисеоничних врста, њихови физиолошки ефекти, као и механизми антиоксидантне заштите са акцентом на антиоксидантна својства гљива. Дат је преглед антиоксидантних система

заштите: неензимски системи (GSH и фенолна једињења) и ензимски системи заштите (GSHPx, GSHR, CAT, P<sub>x</sub>, XOD), праћени на хомогенату јетре. Трећи део (АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ) даје увид о антибактеријском, антифунгалном и антивиралном дејству гљива уз детаљнији опис антимикробних супстанци пореклом из гљива. Четврти део (АНТИИНФЛАМАТОРНА АКТИВНОСТ) даје прегледно увид у процес инфламације, метаболизам арахидонске киселине као најзначајнијег метаболичког прекурсора бројних једињења која учествују у процесу инфламације (простагландини, леукотриени, тромбосани, липоксини). Обрађене су гљиве као антиинфламаторни агенси, дат је преглед потенцијаних биолошки активних једињења, као и механизам њиховог антиинфламаторног деловања. Пети део (АНТИПРОЛИФЕРАТИВНА АКТИВНОСТ) прегледно даје увид у коришћене ћелијске линије, МТТ тест, као и литературни преглед досадашњих радова на гљивама као значајним антипролиферативним агенсима. Последњи сегмент (АНТИДИЈАБЕТОГЕНА АКТИВНОСТ), чини преглед све учесталијег обољења *Diabetes mellitus*, као и потенцијалне протективне ефекте гљива, базиране на резултатима за врсту *G. lucidum*, док су подаци о осталим анализираним врстама у овом раду недоступни.

У **ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ ДЕЛУ** (51 страна) дат је преглед коришћених хемикалија и детаљан опис припреме етанолних, водених и хлороформских екстраката. Описане су инструменталне методе примењене у анализи хемијског састава испитиваних гљива: ААС анализа садржаја макро- и микроелемената, квантитативна LC-MS/MS анализа одабраних фенолних компоненти, затим спектрофотометријско одређивање садржаја протеина (Bradford, 1976), укупних шећера (PSA тест) и фенолних и флавоноидних једињења.

Детаљно су описани тестови одређивања биолошке активности:

- *in vitro* тестови за одређивање антиоксидантног капацитета екстраката (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (DPPH<sup>•</sup>), 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) (ABTS<sup>•+</sup>), хидроксил (OH<sup>•</sup>), супероксид ањон (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), азот-моноксид (NO<sup>•</sup>) и FRAP (*ferric reducing ability of plasma*) и АЕАС (*Ascorbate Equivalent Antioxidant Capacity*) тестовима је процењена редукована способност екстраката),
- методе антибактеријске, антифунгалне и антивиралне активности,
- *ex vivo* тест за утврђивање антиинфламаторне активности анализираних екстраката,
- *in vitro* тест одређивања антипролиферативне активности и
- методе за *in vivo* одређивање антидијабетогене активности анализираних екстраката праћењем количине GSH, интензитета липидне пероксидације (LP<sub>x</sub>) и активности антиоксидантних ензима: глутатион-пероксидазе (GSHP<sub>x</sub>), глутатион-редуктазе (GSHR), пероксидазе (P<sub>x</sub>), каталазе (CAT) и ксантин-оксидазе (XOD).
- Утицај анализираних екстраката у циљу процењивања антидијабетогене активности екстраката код алоксан-индукованог *diabetes*-а на експерименталним животињама одређен је кроз фармакодинамијску (индукција трајне хипергликемије алоксаном и тест оралног оптерећења глукозом), морфолошка (хистолошка техника обраде ткива) и биохемијска испитивања (одређивање липидног статуса и параметара бубрежне и јетрене функције).

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА** (95 страна) приказани су и дискутовани добијени резултати, подељени у две области: хемијски састав и биолошке активности.

У оквиру резултата везаних за хемијски састав испитиваних врста обрађени су: резултати ААС садржаја анализираних макро- и микроелемената, табеларно, као и статичка значајност добијених резултата (Tukey тест, ANOVA), али и резултат квантитативне LC-MS/MS анализе одабраних фенолних једињења. Дати су резултати спектрофотометријског одређивања протеина, укупних шећерних компоненти и фенолних и флавоноидних једињења.

У делу биолошке активности, приказани су резултати *in vitro* испитивања антиоксидантног потенцијала EtOH и H<sub>2</sub>O екстраката испитиваних врста гљива, на основу њихове способности да неутралишу реактивне радикалске врсте. Урађена је корелација резултата антиоксидантне активности са укупним садржајем фенола испитиваних екстраката. Одређена је *in vivo* антиоксидантна активност анализираних екстраката на хомогенату јетре алоксан-индукованог *diabetes*-а праћењем параметара оксидативног стреса.

Антимикробна активност EtOH, H<sub>2</sub>O и CHCl<sub>3</sub> екстраката анализираних врста утврђена је на референтним сојевима бактерија, вируса и гљива.

Антиинфламаторни потенцијал EtOH и CHCl<sub>3</sub> екстраката одређен је применом *ex vivo* методе за одређивање потенцијала инхибиције продукције 12-ННТ, TXB<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> и 12-НЕТЕ метаболита, као показатеља инхибиције циклооксигеназног и липоксигеназног пута метаболизма арахидонске киселине. Испитана је антипролиферативна активност EtOH и H<sub>2</sub>O екстраката анализираних врста на MCF-7 ћелијској линији естроген-зависног (ER<sup>+</sup>) карцинома дојке МТТ тестом.

У **ЗАКЉУЧКУ** (15 страна) су сумирани и истакнути најзначајнији резултати дисертације.

**ЛИТЕРАТУРА** (27 страна) цитирана у овој докторској тези обухвата 576 библиографских јединица и указује на значај и актуелност остварених истраживања, али и на недостатак резултата везаних за две од четири анализираних врсте обухваћене овом тезом.

У **ПРИЛОГУ** (70 страна) су дати експериментални резултати у облику табела са резултатима, калибрационе криве и графикони који допуњују поглавље РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.

ПРИЛОГ се налази на крају дисертације као ДОДАТНИ МАТЕРИЈАЛ у електронској форми на ЦД-у и не постоји у штампаној верзији докторске дисертације.

## **VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ**

### **Рад у међународном часопису (M22 и M23):**

1. Rašeta, M., Karaman, M., Jakšić, M., Šibul, F., Kebert, M., Novaković, A., Popović, M. (2016) Mineral composition, antioxidant and cytotoxic biopotentials of wild-growing *Ganoderma* species (Serbia): *G. lucidum* (Curtis) P. Karst versus *G. applanatum* (Pers.) Pat. *International Journal of Food Science and Technology*. Прихваћен 06.07.2016. уз корекције (додат иштампани мејл од едитора IJFST-а уз Извештај о оцени докторске дисертације) (M22)
2. Novaković, A., Karaman, M., Milovanović, I., Belović, M., Rašeta, M., Radusin, T., Plić, N. (2015) Edible mycorrhizal species *Lactarius controversus* Pers. 1800 as a source of antioxidant and cytotoxic agents. *Chemical Industry*, 17-17. DOI: 10.2298/HEMIND141229017N (M23)

### **Саопштења на међународним научним скуповима штампано у целини (M33):**

1. Janjušević Lj., Karaman, M., Pejin, B., Pastor, F., Glumac, M., Rašeta, M., Sužnjević, D. (2014) *In vitro* antioxidant activity of selected autochthonous macrofungi. In: Proceedings, 12th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry – PHYSICAL CHEMISTRY 2014, Belgrade, 2014, pp. 502-505

### **Саопштења на међународним научним скуповима штампано у изводу (M34):**

1. Rašeta, M., Šibul, F., Karaman, M., Popović, M. (2016) Phenolic profile of ethanolic and aqueous extracts of *G. pfeifferi*. *XI Susret mladih kemijskih inženjera*. Zagreb, Hrvatska. 18.-19.02.2016. Book of Abstracts. p. 157
2. Rasete, M., Karaman, M., Kaisarevic, S., Popovic, M., Novakovic, A., Trivic, S. (2014) Antioxidant and antiproliferative activities of *Ganoderma* species from Fruška Gora Mountain (Serbia). *5<sup>th</sup> CASEE conference: "Healthy Food Production and Environmental Preservation - The Role of Agriculture, Forestry and Applied Biology"*. Novi Sad, Serbia. May 25-27.2014. Book of Abstracts. p. 55
3. Šibul, F., Rašeta, M., Karaman, M., Popović, M., Orčić, D., Jakšić, M., Mimica-Dukić, N. (2014) *Ganoderma pfeifferi* and *Ganoderma applanatum* extracts as inhibitors of eicosanoids biosynthesis. *Chemistry Conference for Young Scientists 2014*. Blankenberge, Belgium. February 27-28.2014. Book

of Abstracts p. 103.

4. Rašeta, M., Karaman, M., Popović, M., Vlaisavljević, S., Kebert, M. (2014) Two lignicolous fungi from northern Serbia and their antioxidant and proliferative activities. *X. Susret mladih kemijskih inženjera*. Zagreb, Hrvatska. 20-21.02.2014. Book of Abstracts. p.182
5. Popović, M., Karaman, M., Trivić, S., Rašeta, M. (2012) Antioxidative and antifungal activity of two autochthonous *Ganoderma* species from Balcan region (Serbia). *BIT's 2nd Annual World Congress of Microbes-2012 (WCM-2012)*. Guangzhou, China. 30.07-01.08.2012. Book of Abstracts. p. 309
6. Rašeta, M., Zoranović, M., Karaman, M., Popović, M. (2012) Antioxidative and scavenging activity of three lignicolous fungi (Basidiomycetes) from Serbia. *IX Susret mladih kemijskih inženjera: Nove tehnologije & transfer znanja*. Zagreb, Hrvatska. 16-17.02.2012. Book of Abstracts. p. 166
7. Rašeta, M., Karaman, M., Popović, M. (2011) Spectroscopy analysis in radical scavenging activity examination of *Ganoderma pfeifferi*. *16<sup>th</sup> European Conference on Analytical Chemistry EURO analysis 2011: „Challenges in modern analytical chemistry“*. Beograd, Serbia. 11-15 September 2011. Final program. p. 58
8. Rašeta, M., Karaman, M., Popović, M. (2011) Application of spectroscopy in antioxidative scivity of two inedible *Ganoderma* species from Serbia. *16<sup>th</sup> European Conference on Analytical Chemistry EURO analysis 2011: „Challenges in modern analytical chemistry“*. Beograd, Serbia. 11-15 September 2011. Final program. p. 86

#### Саопштења на домаћим научним скуповима штампано у изводу (M64):

1. Rašeta, M., Karaman, M., Popović, M., Novaković, A., Kaišarević, S. (2014) *In vitro* citotoxic activity of *Ganoderma lucidum* extracts against MCF-7 cell line. *11<sup>th</sup> Serbian Congress of Toxicology „New frontiers and challenges in toxicology“*. Sremski Karlovci, Serbia. June 24-27.2014. Abstract Book. p. 23-24
2. Rašeta, M., Gombarević, V., Popović, M., Karaman, M. (2014) Is the fungus *Ganoderma resinaceum* (Boud. in Pat. 1889) a new source of anti-inflammatory agents? *51. Savetovanje Srpskog hemijskog društva i 2. Konferencija mladih hemicara Srbije*. Niš, Srbija. 5-7. Juni 2014. Program&Book of Abstracts. p. 62
3. Rašeta, M., Ružić, N., Karaman, M., Popović, M., Matavulj, M. (2012) Antioxidant activity and total phenolic (flavonoid) content of two *Ganoderma* species from Serbia. *50. Savetovanje Srpskog hemijskog društva*. Beograd, Srbija. 14.-15. Juni 2012. Knjiga apstrakata, str. 110

## VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

У оквиру ове докторске дисертације изведена је детаљна микохемијска карактеризација четири врсте гљива рода *Ganoderma*: *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. pfeifferi* и *G. resinaceum* и биолошка испитивања екстраката одабраних врста. Из дисертације су произашли следећи резултати и закључци:

- На основу анализе садржаја макро- (јони  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ ) и микроелемената (јони  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ ) у сувим остацима гљива ААС спектрофотометријском техником утврђено је да је у највећој концентрацији присутан јон  $Zn^{2+}$  од 21,09  $\mu g/g$  код врсте *G. applanatum* до 41,70  $\mu g/g$  код врсте *G. pfeifferi*. У доста високој концентрацији су присутни и јони  $Mn^{2+}$  (7,05 до 43,00  $\mu g/g$ ) и  $Cu^{2+}$  (17,31 до 22,22  $\mu g/g$ ), где се по садржају издвајају врсте *G. applanatum* и *G. pfeifferi*. Изненађујуће ниски резултати су добијени при испитивању концентрације јона  $Fe^{2+}$  (0,19 до 0,94  $\mu g/g$ ), који нису у сагласности са доступним литературним наводима.

- **Квантитативном LC-MS/MS анализом** утврђено је присуство 12 фенолних једињења (p-хидроксибензоева киселина, протокатехинска киселина, p-кумаринска киселина, ванилинска

киселина, гална киселина, ескулетин, кафена киселина, хинска киселина, сиригинска киселина, кризоериол, изорамнетин и хлорогенска киселина) од укупно анализираних 45 фенолних једињења у EtOH и H<sub>2</sub>O екстрактима. Дистрибуција фенолних једињења у етанолним екстрактима врста рода *Ganoderma* је била следећа: највећи садржај одређиваних једињења је био у екстрактима врста *G. pfeifferi* (10 од 12 одређених фенолних једињења у опсегу концентрација од 0,0001 до 0,0330 g/kg) и *G. applanatum* (9 од 12 одређених фенолних једињења у опсегу концентрација од 0,000316 до 0,0114 g/kg), док је најмањи садржај одређен код екстракта *G. resinaceum* (5 од 12 одређених фенолних једињења у опсегу концентрација од 0,0002 до 0,002 g/kg).

Код H<sub>2</sub>O екстракта највећи садржај фенолних једињења је идентификован код врсте *G. applanatum* (6 од 12 идентификованих фенолних једињења у опсегу концентрација од 0,0004 до 0,0045 g/kg), док је најмањи садржај утврђен код *G. resinaceum* где је доказана само протокатехинска киселина у доста ниској концентрацији (0,0006 g/kg).

На основу квантитативних резултата испитиваних фенолних једињења запажа се њихов далеко већи садржај у EtOH, у односу на H<sub>2</sub>O екстракте анализираних врста.

- **Спектрофотометријска анализа** укупних фенола показала је да је највећи садржај одређен код EtOH екстракта *G. applanatum*, док је код H<sub>2</sub>O екстракта највећи садржај забележен код врсте *G. pfeifferi*. Најмањи садржај укупних фенола забележен је код H<sub>2</sub>O екстракта врсте *G. lucidum*. Највећи садржај укупних флавоноида код EtOH екстракта забележен је за врсту *G. lucidum*, док је код H<sub>2</sub>O екстракта код врсте *G. applanatum*. Најнижа концентрација флавоноида одређена је код H<sub>2</sub>O екстракта врсте *G. resinaceum*.
- Резултати анализе садржаја протеина у анализираним EtOH и H<sub>2</sub>O екстрактима врста рода *Ganoderma*, указују на далеко већи садржај истих у EtOH екстрактима. По садржају протеина се издвајају врсте *G. applanatum* и *G. lucidum*.
- Резултати одређивања садржаја шећера у EtOH и H<sub>2</sub>O екстрактима за анализираних врста указују такође на далеко већи садржај код EtOH екстракта, где се као најдоминантнији моносахарид издваја глукоза.
- Од анализираних екстракта, водени екстракти су показали најбољи антиоксидантни потенцијал у тестовима неутрализације DPPH<sup>•</sup>, OH<sup>•</sup> и O<sub>2</sub><sup>•-</sup> радикала. Такође водени екстракти су показали и најбољи редуковани потенцијал (FRAP и АЕАС тест). Код већине примењених тестова, активност потентнијих екстракта је била реда величине као код синтетског антиоксиданта (PG). Код ABTS<sup>•+</sup> и NO<sup>•</sup> по антирадикалској активности издвојили су се EtOH екстракти. У циљу испитивања корелације садржаја фенолних једињења и антиоксидантне активности, урађена је регресиона анализа из које су израчунати високи корелациони фактори (R<sup>2</sup>) који указују на значај фенолних једињења као потенцијалних антиоксидантних агенаса за испољене активности. Поређењем активности екстракта анализираних врста, утврђено је да су се као најактивнији показали екстракти врсте *G. applanatum*. Добијени резултати су у складу са резултатима испитивања хемијског састава наведених врста гљива (код *G. applanatum* је одређен и највећи садржај укупних фенола, али и фенолног садржаја LC-MS/MS методом). На основу ових резултата се може закључити да фенолна једињења имају велики значај на испољене активности анализираних екстракта.
- *In vivo* антиоксидантна активност праћена мерењем параметара оксидативног стреса, указује на значајне резултате добијене мерењем смањења интензитета LPx-a, смањењем садржаја GSH, повећањем активности GSHR, P<sub>x</sub>, CAT као и смањењем активности XOD. Као значајни екстракти са антиоксидантном активношћу издвајају се EtOH екстракти врсте *G. pfeifferi*.
- Анализирани екстракти испољили су значајне антибактеријске, антифунгалне и антивиралне активности. Док је антибактеријска активност у већој мери остварена код H<sub>2</sub>O екстракта, код тестова антивиралне и антифунгалне активности утврђена је значајна активност за EtOH и CHCl<sub>3</sub> екстракте, што указује на шири спектар биолошки активних молекула са антимикуробном

активношћу. Значајним резултатом за анализирани екстракте се сматра остварена антивирална активност на модел вирусу фамилије *Siphoviridae* где су DMSO екстракти остварили најбољу антивиралну активност инактивацијом фага што може да укаже на значај неполарних, највероватније терпенских једињења као потенцијалних антивиралних агенаса.

- Већина испитиваних EtOH и CHCl<sub>3</sub> екстраката је показала концентрацијски-зависну инхибицију продукције четири праћена метаболита: 12-ННТ, TXB<sub>2</sub> и PGE<sub>2</sub> за COX пут и 12-НЕТЕ за LOX пут. Снажнију антиинфламаторну активност испољили су CHCl<sub>3</sub> екстракти врсте *G. pfeifferi* и EtOH екстракти врсте *G. applanatum*, нарочито на COX метаболитски пут. Добијени резултати указују на значај употребе *Ganoderma* врста, које до сада нису испитане *ex vivo* методама као потенцијални антиинфламаторни агенси.
- Сви испитивани екстракти су инхибирали раст MCF-7 ћелијске линије у већој или мањој мери (IC<sub>50</sub>=2,44 до 968,30 µg/mL), те је остварена антипролиферативна активност. Уколико се пореде резултати остварени како код субкутне (24h), тако и хроничне (72h) инкубације, издваја се врста *G. pfeifferi*. Добијена корелација остварене биолошке активности са садржајем укупних фенола због високих корелационих фактора указује на значај фенолних једињења при испољавању ове биолошке активности. Уколико се дода чињеница да је код екстракта *G. pfeifferi* LC-MS/MS техником одређен значајан садржај фенолних једињења, од великог значаја би била додатна истраживања механизма деловања са изолованим биоактивним једињењима. Добијени резултати указују на значај ове до сада слабије истражене врсте рода *Ganoderma* и потенцијалну примену код оболелих од карцинома дојке, али и постменопаузалних тегоба.
- Остварена је антидијабетогена активност првенствено екстрактима врсте *G. resinaceum* смањењем нивоа шећера у крви, смањењем серумских концентрација урее, креатинина и ALT-а након претретмана алоксаном, што указује на потенцијални нефро- и хепатопротективни ефекат анализираних екстраката. Хистолошком анализом ткива панкреаса, бубрега и јетре је показано да примена екстраката гљива није довела до оштећења органа, а третман екстрактима након претретмана изразитог прооксиданта алоксана је довео до регенерације ткива панкреаса, што указује на протективни ефекат, с обзиром да је третманом алоксана дошло до селективног оштећења β-ћелија Лангерхансових острваца панкреаса.
- Сумарно, резултати ове докторске тезе показују да поред добро проучене, космополитске гљиве *G. lucidum*, и остале анализираних врста представљају богат извор биолошки активних једињења са широким спектром биолошких активности, те сходно томе имају висок потенцијал примене у прехранбеној и фармацеутској индустрији. Поред тога добијени резултати указују на неопходност даљих истраживања која би обухватила шири спектар узорака, са већег броја локалитета као и испитивања токсичности анализираних врста гљива.

Закључци представљени у дисертацији су произашли из добијених резултата указују на значај и научни допринос спроведених истраживања.

## VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Кандидат је рационално приступио обради и анализи експерименталних података који су успешно подељени у логичке целине. Резултати истраживања су аналитички представљени, статистички обрађени, детаљно дискутовани и критички поређени са резултатима из цитиране литературе. Прегледности резултата значајно су допринели графички прикази (хистограми и шеме) и систематичне табеле. На основу резултата и дискусије изведени су закључци који дају одговоре на постављене циљеве у овој докторској дисертацији.

## IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

2. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме

**Комисија оцењује да је докторска дисертација урађена у складу са образложењима наведеним у пријави теме.**

3. Да ли дисертација садржи све битне елементе

**Дисертација садржи све битне елементе - дефинисање теме истраживања, преглед постојећих истраживања, детаљан приказ експерименталних метода и техника, јасан и прегледан приказ резултата и њихову дискусију, списак литературе и закључак.**

4. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

На основу комплетног увида у докторску дисертацију, постављене циљеве истраживања, прегледа литературе, добијених резултата и њиховог тумачења, Комисија закључује да ова докторска дисертација има све елементе оригиналног научног рада, који карактерише висок степен интердисциплинарности. Првенствено ова докторска дисертација задире у област микологије и биохемије секундарних биомолекула гљива, као и њиховог биолошког деловања. Употребом савремених инструментаних метода прилагођених и модификованих за предвиђена истраживања, добијени су научни резултати, из којих је било могуће извести поуздане и валидне закључке. Иако произишли из многобројних истраживања резултати тезе су представљени јасно и груписани у логичке целине. Чињеница да су по први пут изведена упоредна, хемијска и биохемијска истраживања врсте *G. pfeifferi*, али и врсте *G. resinaceum* (род *Ganoderma*), о којој је до сада било доступно минимално литературних навода, што је од посебног научног значаја и интереса. Треба истаћи да су истраживања ове докторске тезе у сагласности са савременим трендовима са циљем проналажења нових природних производа са израженим антиоксидантним, антимицробним, антиинфламаторним, антипролиферативним и антидијабетогеним деловањем.

5. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања

По мишљењу комисије ова докторска дисертација нема значајнијих недостатака.



**X ПРЕДЛОГ:**

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже да се докторска дисертација под називом: „Детекција биоактивних супстанци одабраних врста гљива рода *Ganoderma* (Basidiomycota) и њихова биолошка активност“, прихвати, а кандидату Милени Рашета одобри одбрана.

У Новом Саду, 13.07.2016.

**ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ**

др Неда Мимица-Дукић, редовни професор,  
Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду,  
председник

др Мира Поповић, професор пензији, Природно-  
математички факултет, Универзитет у Новом Саду, ментор

др Маја Караман, ванредни професор,  
Природно-математички факултет, Универзитет у  
Новом Саду, ментор

др Борис Поповић, ванредни професор,  
Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду,  
члан

др Биљана Кауриновић, ванредни професор,  
Природно-математички факултет, Универзитет у  
Новом Саду, члан