

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Marina Z. Kostić

**Hemijski sastav ekstrakata makromiceta i
etarskih ulja divljeg origana i korijandera i
njihov *in vitro* potencijal u tretmanu uzročnika
hroničnog tonzilitisa**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

University of Belgrade

Faculty of Biology

Marina Z. Kostić

**Chemical composition of macromycetes
extracts, wild oregano and coriander
essential oils and their *in vitro* potential in the
treatment of chronic tonsillitis causative
agents**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2021

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

Mentori:

dr Ana Ćirić, naučni savetnik,
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”,
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

dr Jelena Vukojević, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Jasmina Glamočlija, naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”,
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

dr Biljana Nikolić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Snežana Sanković Babić, docent,
Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo doktorske disertacije realizovan je u Mikološkoj laboratoriji, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” u okviru projekta OII73032 „Karakterizacija i primena metabolita gljiva i utvrđivanje potencijala novih biofungicida“ koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja.

Srdačno se zahvaljujem mentoru dr Ani Ćirić na ukazanom poverenju, usmeravanju mog istraživanja, posvećenom vremenu i konstruktivnim diskusijama prilikom pisanja disertacije.

Prof. dr Jeleni Vukojević veliko hvala na svim korisnim sugestijama i ispravkama prilikom pisanja teze kao i na prenetom znanju iz oblasti mikologije.

Hvala i članovima komisije dr Jasmini Glamočliji i prof. dr Biljani Nikolić na sugestijama i ispravkama disertacije.

Zahvaljujem se članu komisije dr Snežani Sanković Babić na obezbeđenim uzorcima tkiva i sugestijama iz oblasti Otorinolarinologije.

Hvala dr Oliveru Radanoviću i prof. dr Zvezdani Tepavčević na pomoći oko identifikacije bakterija i histološke analize.

Hvala dr Isabel C.F.R. Ferreira i dr Lillian Barros na gostoprimstvu i ukazanom poverenju da deo istraživanja koji se odnosio na hemijsku karakterizaciju makromiceta uradim na Politehničkom Institutu u Braganči, Portugal.

Hvala firmi Probotanic i direktoru Marku Kusovac na datim etarskim uljima i dr Tanji Marković na hemijskoj analizi etarskih ulja.

Veliko hvala dr Mariji Ivanov na pomoći u eksperimentalnom radu, motivaciji, korisnim savetima i podršci. Hvala i dr Marini Soković, dr Jovani Petrović i Dejanu Stojkoviću na dragocenoj pomoći i veseloj atmosferi u svakodnevnom radu.

Milošu, Jasmini i Zoranu veliko hvala na iskrenoj podršci i razumevanju.

Mojoj majci neizmerno hvala na svemu, ovaj doktorat je posvećen njoj.

Sažetak

Hemijski sastav ekstrakata makromiceta i etarskih ulja divljeg origana i korijandera i njihov *in vitro* potencijal u tretmanu uzročnika hroničnog tonzilitisa

Za ispitivanje potencijala prirodnih proizvoda u tretmanu hroničnog tonzilitisa odabrano je 7 vrsta makromiceta (*Armillaria mellea*, *Lactarius piperatus*, *L. quietus*, *L. vellereus*, *Russula integra*, *R. nigricans* i *R. rosea*) i 2 komercijalna etarska ulja (*Origanum minutiflorum* i *Coriandrum sativum*). U disertaciji je analiziran hemijski sastav i biološka aktivnost ekstrakata plodonosnih tela makromiceta i etarskih ulja. Hemijska analiza ekstrakata makromiceta je pokazala da imaju povoljan nutritivni profil (visok sadržaj uljenih hidrata i proteina, nizak sadržaj masti). Najzastupljeniji šećer je manitol, dok su izoforme tokoferola različito zastupljene zavisno od testirane vrste. Analiza masnih kiselina je pokazala visoku zastupljenost linolne, oleinske i stearinske kiseline, dok je među organskim najzastupljenija jabučna, među fenolnim *p*-hidroksibenzoeva kiselina. Hemijska analiza etarskih ulja je pokazala da je karvakrol najzastupljenije jedinjenje divljeg origana, dok je u slučaju etarskog ulja korijandera to linalol. Antibakterijska aktivnost je testirana na 16 različitih vrsta bakterija izolovanih iz uzoraka nepčanih tonzila i adenoida pacijenata sa dijagnostifikovanim hroničnim tonzilitisom i identifikovanih. Ekstrakti makromiceta su pokazali umerenu antibakterijsku aktivnost, dok su etarska ulja pokazala znatno bolju aktivnost. Antioksidativna aktivnost određena TBARS metodom je pokazala da ekstrakti testiranih makromiceta, kao i etarsko ulje divljeg origana poseduju dobru antioksidativnu aktivnost u *in vitro* uslovima; aktivnost merena OxHLIA metodom je pokazala visok antioksidativni potencijal ali samo za vrste *L. vellereus*, *R. integra* i *R. nigricans*. Dobar citotoksični potencijal na tumorsku ćelijsku liniju NCI-H460 pokazao je etanolni ekstrakt *L. vellereus* kao i oba testirana etarska ulja.

Ključne reči: *Lactarius*, *Russula*, etarska ulja, antibakterijski efekat, antioksidativna aktivnost, citotoksična aktivnost, hronični tonzilitis

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Algologija i mikologija

Abstract

Chemical composition of macromycetes extracts, wild oregano and coriander essential oils and their *in vitro* potential in the treatment of chronic tonsillitis causative agents

For the investigation of natural products potential in the treatment of chronic tonsillitis, 7 species of macromycetes (*Armillaria mellea*, *Lactarius piperatus*, *L. quietus*, *L. vellereus*, *Russula integra*, *R. nigricans* i *R. rosea*) and 2 commercial essential oils (*Origanum minutiflorum* and *Coriandrum sativum*) were selected. Their chemical composition and biological activity were evaluated. Chemical analysis of extracts from fruiting bodies has shown they have a favorable nutritional profile (high content of carbohydrates and proteins, with low lipids content). The most common sugar was mannitol, while content of tocopherol isoforms was varied on the tested macromycetes species. The fatty acids analysis revealed high presence of linoleic, oleic and stearic acid, among the organic acids, malic acid was the most abundant, whereas *p*-hydroxybenzoic acid was the most predominant among phenolic acids. Regarding chemical analysis of essential oils, analysis showed that carvacrol was the most common compound in the wild growing oregano oil, while in case of coriander that was linalool. Antibacterial activity was evaluated on 16 different strains isolated from tissue samples of palatine tonsils and adenoids from patients diagnosed with chronic tonsillitis and identified. Macromycetes extracts showed moderate antibacterial activity, while tested essential oils exerted significantly better activity. Antioxidant activity determined by TBARS method showed that the tested extracts, as well as wild oregano essential oil possess good *in vitro* antioxidant activity; while activity measured by OxHLIA method showed high antioxidant potential but only for *L. vellereus*, *R. integra* and *R. nigricans* samples. As for the cytotoxic potential towards tumor cell line NCI – H460 *L. vellereus* ethanolic extract as well as both tested essential oils demonstrated promising activity.

Keywords: *Lactarius*, *Russula*, essential oils, antibacterial activity, antioxidative activity, cytotoxic activity, chronic tonsillitis

Scientific field: Biology

Specific subfield: Algology and mycology

LISTA SKRAĆENICA

AAPH – 2,2'-azobis-2-metil-propanimidamid dihidrohlorid
AOAC – zvanična Asocijacija analitičkih hemičara (association of official analytical chemists)
ATP – adenzin-3-fosfat
A549 – adenokarcinom pluća
BHA – butil-hidroksianisol
BHT – butil-hidroksitoluen
CAT – katalaza
E – energetska vrednost
EE – etanolni ekstrakt
FAME – metil-estri masnih kiselina (fatty acids methyl esters)
FAO/WHO – Food and Agriculture Organization of the United Nations
FID – plameno jonizujući detektor (flame ionisation detector)
FIKI – frakcioni inhibitorski koncentracijski indeks
G (-) – Gram negativne bakterije
G (+) – Gram pozitivne bakterije
GC-FID – gasna tečna hromatografija sa plameno jonizujućim detektorom (gas chromatography/flame ionization detector)
GC-MS – gasna hromatografija/masena spektrometrija
GI – gastrointestinalni trakt
GI₅₀ – koncentracija ekstrakta koja inhibira preživljavanje ćelija za 50%
GP_x – glutation peroksidaza
G_{red} – glutation reduktaza
GRT – gornji respiratorni trakt
HepG2 – tumorska ćelijska linija hepatocelularnog karcinoma
HPLC – tečna hromatografija pod visokim pritiskom (high pressure liquid chromatography)
HT – hronični tonzilitis
H&E- hematoksilin-eozin
IH – interfolikularna hiperplazija
KBC – Kliničko bolnički centar
LDL – lipoprotein male gustine
MALDI – TOF– (matrix assisted laser desorption and ionization time-of-flight)
MBK – minimalna bakterijska koncentracija
MCF-7 – tumorska ćelijska linija karcinoma dojke
ME – metanolni ekstrakt
MIK – minimalna inhibitorska koncentracija
MRSA – meticilin rezistentna *S. aureus*
NCI – H460 – tumorska ćelijska linija humanog porekla (karcinom nemalih ćelija pluća)
OG – optička gustina
ORL – otorinolaringologija
OxHLIA – test inhibicije oksidativne hemolize (oxidative haemolysis inhibition assay)
PAS – periodic acid-schiff
PBS – fosfatni pufer
PLP2 – netumorske ćelije svinjske jetre
QS – detekcija kvoruma (quorum sensing)
RI – refrakcioni indeks
RONS – reaktivne kiseonične i azotne vrste (reactive oxygen and nitrogen species)
RSS – reaktivne sulfurne vrste (reactive sulphur species)
RT – retenciono vreme (retention time)
SD – standardna devijacija
SOD – superoksid dizmutaza

SR – slobodni radikal

TBARS – reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (thiobarbituric acid reactive substances)

TBHQ – *tert*-butilhidrohinon (tert-butylhydroquinone)

TSA – hranljiva podloga za gajenje bakterija (tryptic soy agar)

TSB – hranljiva podloga za gajenje bakterija (tryptic soy broth)

UFCL-PDA – ultrabrza tečna hromatografija sa nizom fotodioda (ultrafast liquid chromatography photodiode array)

VLDL – lipoprotein veoma male gustine

WHO – Svetska zdravstvena organizacija (world health organisation)

Sadržaj

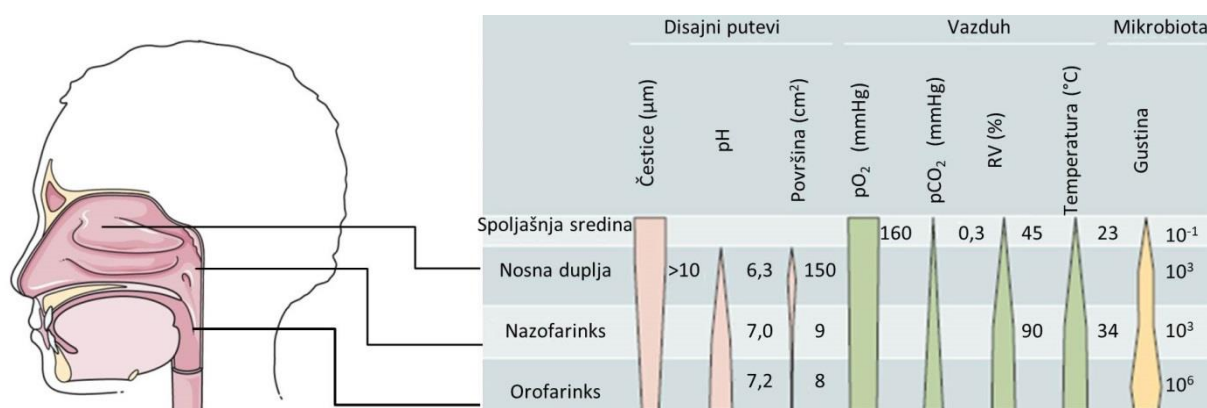
1. UVOD.....	1
1.1. Hronični tonzilitis.....	1
1.2. Značaj prirodnih produkta.....	4
1.3. Makromicete i njihov potencijal za dobijanje novih, biološki aktivnih supstanci.....	4
1.3.1. Hemijski sastav plodonosnih tela makromiceta.....	4
1.3.2. Medicinski značaj makromiceta.....	6
1.3.2.1. Antimikrobna aktivnost.....	6
1.3.2.2. Antibiofilm aktivnost.....	6
1.3.2.3. Antioksidativna aktivnost.....	7
1.3.2.4. Antitumorska aktivnost.....	9
1.3.2.5. Ostale biološke aktivnosti makromiceta.....	10
1.4. Etarska ulja, njihovo poreklo i biološka aktivnost.....	10
1.4.1. Hemijski sastav etarskih ulja.....	12
1.4.2. Medicinski značaj etarskih ulja.....	13
1.4.2.1. Antimikrobna i antibiofilm aktivnost etarskih ulja.....	13
1.4.2.2. Antioksidativna aktivnost etarskih ulja.....	14
1.4.2.3. Antitumorska aktivnost etarskih ulja.....	15
1.4.2.4. Ostale aktivnosti etarskih ulja.....	15
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	17
3. MATERIJAL I METODE.....	18
3.1. Metodologija istraživanja.....	18
3.2. Selekcija ispitanika.....	18
3.2.1. Mikrobiološka analiza.....	20
3.2.2. Hranljive podloge.....	20
3.2.3. Obrada tkiva i izolacija bakterija.....	20
3.2.4. Identifikacija bakterija korišćenjem MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight) masene spektrometrije.....	21
3.2.5. Histološka analiza.....	21
3.3. Sakupljanje makromiceta.....	21
3.3.1. Priprema ekstrakata.....	21
3.3.1.1. Priprema metanolnog ekstrakta.....	21
3.3.1.2. Priprema etanolnog ekstrakta.....	22
3.4. Hemijska analiza bazidiokarpa testiranih makromiceta.....	22
3.4.1. Određivanje nutritivne vrednosti.....	22

3.4.2.	Priprema uzoraka i HPLC analiza šećera.....	23
3.4.3.	Priprema uzoraka i HPLC analiza tokoferola	23
3.4.4.	Priprema uzoraka i HPLC analiza organskih kiselina	24
3.4.5.	Priprema uzoraka i HPLC analiza fenolnih kiselina.....	24
3.4.6.	Priprema uzoraka i HPLC analiza masnih kiselina.....	24
3.5.	Hemijska analiza etarskih ulja.....	25
3.6.	<i>In vitro</i> ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakta makromiceta i etarskih ulja	25
3.6.1.	Antibakterijska aktivnost – mikrodiluciona metoda	25
3.6.2.	Inhibiranje formiranja biofilma <i>Staphylococcus aureus</i>	26
3.6.3.	Inhibiranje formiranog biofilma <i>Staphylococcus aureus</i>	26
3.6.4.	Ispitivanja međusobne interakcije etarskih ulja metodom šahovske table (eng. “checkerboard assay”)	26
3.6.5.	Ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakta makromiceta i etarskih ulja	27
3.6.5.1.	Test reaktivne supstance tiobarbituricne kiseline (Thiobarbituric acid reactive substances – TBARS)	27
3.6.5.2.	Test inhibicije oksidativne hemolize (Oxidative haemolysis inhibition assay – OxHLIA)	27
3.6.6.	Ispitivanje citotoksične aktivnosti ekstrakta makromiceta i etarskih ulja.....	28
3.7.	Statistička analiza	29
4.	REZULTATI I DISKUSIJA.....	30
4.1.	Demografsko-epidemiološke i kliničke karakteristike operisanih pacijenata sa hroničnim tonzilitisom.....	30
4.2.	Analiza uzorkovanih tonzila.....	36
4.2.1.	Bakterije izolovane iz tkiva tonzila.....	36
4.2.2.	Prikaz histološke analize tkiva tonzila	40
4.3.	Sakupljanje makromiceta	43
4.3.1.	Identifikacija vrsta.....	43
4.3.2.	Opšte karakteristike plodonosnih tela odabranih vrsta i njihova taksonomska pripadnost	43
4.4.	Nutritivne karakteristike testiranih makromiceta	46
4.4.1.	Sadržaj šećera u bazidiokarpima testiranih vrsta	50
4.4.2.	Sadržaj tokoferola u bazidiokarpima testiranih vrsta.....	53
4.4.3.	Sadržaj organskih kiselina u bazidiokarpima testiranih vrsta	55
4.4.4.	Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktima bazidiokarpa testiranih vrsta	58
4.4.5.	Sadržaj masnih kiselina u bazidiokarpima testiranih vrsta	60
4.5.	Hemijski sastav odabranih komercijalnih etarskih ulja.....	63

4.6.	Biološke aktivnosti ekstrakata testiranih makromiceta	66
4.6.1.	Antibakterijska aktivnost ekstrakata testiranih makromiceta	66
4.6.2.	Antibiofilm aktivnost ekstrakata testiranih makromiceta	72
4.6.2.1.	Efekat ekstrakata na formiranje biofilma <i>Staphylococcus aureus</i>	72
4.6.2.2.	Efekat ekstrakata na formirani biofilm <i>Staphylococcus aureus</i>	74
4.6.3.	Antioksidativna aktivnost ekstrakata testiranih makromiceta	74
4.6.4.	Citotoksična aktivnost ekstrakata testiranih makromiceta.....	77
4.7.	Biološke aktivnosti testiranih etarskih ulja	78
4.7.1.	Antibakterijska aktivnost testiranih etarskih ulja.....	78
4.7.2.	Antibiofilm aktivnost testiranih etarskih ulja.....	80
4.7.3.	Antibakterijska aktivnost smeše etarskih ulja i antibiotika.....	82
4.7.4.	Antioksidativna aktivnost testiranih etarskih ulja.....	83
4.7.5.	Citotoksična aktivnost testiranih etarskih ulja	84
5.	OPŠTA DISKUSIJA	86
6.	ZAKLJUČCI.....	88
7.	LITERATURA	90
8.	PRILOG.....	110

1. UVOD

Gornji respiratorni trakt (GRT) obuhvata nos, nosnu duplju, sinuse, gornji deo ždrela (*nazofarinks*), Eustahijeve tube, srednje uho, usnu duplju, usni deo ždrela (*orofarinks*) i grkljan (*larinks*) (Kumpitsch i dr., 2019). Zdrava osoba dnevno udahne više od 7000 L vazduha i sa njim unese $10^4 - 10^6$ bakterija po kubnom metru vazduha. Pored bioloških čestica, na mikrobiotu GRT-a utiču i drugi faktori, kao što su relativna vlažnost vazduha, promena temperature, promene nivoa kiseonika i ugljen dioksida. Zajedno sa anatomijom GRT-a, ovi faktori utiču na formiranje specifičnih mikrosredina u nosnoj šupljini, sinusima, nazo- i orofarinksu, koje su pogodne za rast i razvoj različitih vrsta bakterija (Slika 1) (Man i dr., 2017; Kumpitsh i dr., 2019).



Slika 1. Fizološki i mikrobiološki faktori koji utiču na formiranje mikrosredina u gornjem respiratornom traktu. Slika je preuzeta i modifikovana iz Man i dr., 2017.

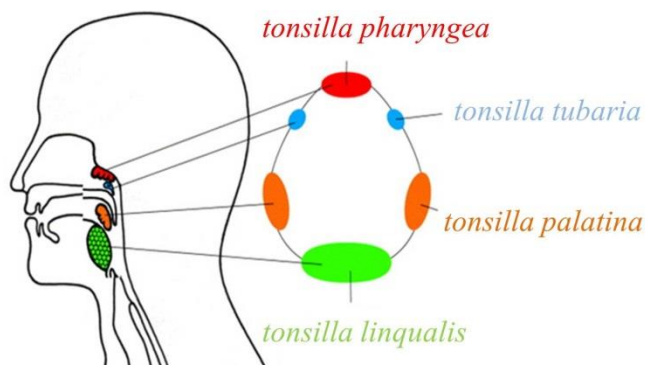
Mikrobiotu različitih regija GRT-a čini veliki broj raznovrsnih bakterija, virusa (adeno virus, virus gripa, virus parainfluence, rinovirus) i kvasnica (*Candida* spp.). Najčešće izolovane bakterije su vrste rodova: *Streptococcus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Prevotella* i *Porphyromonas* (Wilson, 2010; Bellussi i dr., 2019; Clark, 2020). Među njima, najčešći uzročnici infekcija su: *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* i *Staphylococcus aureus* (García-Rodríguez i dr., 2002; Clark, 2020). Infekcije GRT-a uključuju zapaljenje nosa (*rinitis*), sinusa (*sinuzitis*), srednjeg uha (*otitis media*), ždrela (*faringitis*), tonzila (*tonzilitis*) i grkljana (*laringitis*).

Disbalans mikrobiote GRT-a povećava broj invazivnih patogenih bakterija, izazivajući upalni proces i infekciju. Do infekcije i razvoja bolesti dolazi nakon kolonizacije sluznice gornjih disajnih puteva patogenim bakterijama. Kolonizacija je kompleksan, dinamičan proces koji zavisi od interakcije između samih mikroorganizama, između mikroorganizama i domaćina i faktora životne sredine (Bellussi i dr., 2019). *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus* i *M. catarrhalis* su najčešće identifikovane bakterije u akutnim i hroničnim upalama GRT-a. Kolonizacija od strane ovih vrsta je kontinuirani proces na sluznici nosa i ždrela kod dece i odraslih. Mikroorganizmi se nadmeću za nutrijente i prostor svakodnevno, a kada patogeni prevladaju native mikroorganizme tada dolazi do kolonizacije i infekcije (Bellussi i dr., 2019). Takođe, kolonizacija GRT-a od strane patogenih bakterija zavisi i od njihove interakcije sa domaćinom. Mikroorganizam mora biti u stanju da preživi lokalne odrambene odgovore domaćina (npr. povećano lučenje mukusa), da se pričvrsti za epitel i prevaziđe odgovor imunskog sistema domaćina.

1.1. Hronični tonzilitis

Vilhelm Von Valdejer (Waldeyer, 1884) je prvi opisao specifičnu strukturu limfoidnog tkiva koja se nalazi u sluznici faringealne duplje. Njemu u čast limfne strukture međusobno povezane limfnim sudovima se nazivaju Valdejerov limfatični prsten (Waldeyer's ring). Prsten obuhvata: ždrelni krajnik (*tonsilla pharyngea*) ili adenoid koji je pričvršćen za gornji zid nosnog dela ždrela;

tubarne krajnike (*tonsilla tubaria*) koji se nalaze u neposrednoj blizini ždrelnih otvora Eustahijevih tuba; nepčane krajnike (*tonsilla palatina*) postavljene u usnom delu ždretna, orofarinksu, na bočnim zidovima između prednjeg i zadnjeg nepčanog luka i jezični krajnik (*tonsilla lingualis*) koji se nalazi na poslednjoj trećini jezika (Slika 2) (Perry i Whyte, 1998).



Slika 2. Valdejerov limfni prsten. Slika je preuzeta i modifikovana iz Perry i White, 1998.

Valdejerov limfatični prsten predstavlja barijeru za prodor patogena u respiratorni i digestivni trakt. Ima ulogu u humoralnom (sinteza velikog broja imunoglobulina) i ćelijskom imunitetu (aktivacija T i B limfocita) (Mogoantă i dr., 2008). Nepčane tonzile imaju ulogu u inicijaciji imunskog odgovora protiv antigena koji ulaze u organizam kroz usnu duplju, dok adenoid štiti sluznicu nazofarinksa od patogena unesenih vazduhom kroz nos. Najveću imunsku aktivnost navedene strukture imaju kod dece uzrasta 3 – 10 godina. Poznato je da nepčane tonzile produkuju 5 izotipova imunoglobulina (IgA, IgM, IgE, IgD, IgG), od kojih se IgA smatra najznačajnijim jer je sekretorni IgA (SIgA) ključna komponenta imunskog sistema sluzokože GRT-a (Mitchell i dr., 2019). Tonzile imaju zaštitnu ulogu dok su intaktne, tj. dok je njihov epitel intaktan, jer je njegova uloga zaštita tonzila i GRT-a od mikrobioloških, alergoloških i drugih agensa. Kada dođe do narušavanja epitela, dolazi i do narušavanja funkcije tonzila i pojave lezija koje su često ispunjene gnojnim sadržajem. Kod bolesnih tonzila, može doći do širenja infekcije limfnim putem u regionalne limfne čvorove.

Upala tonzila (tonzilitis) može biti akutna ili hronična. Akutni tonzilitis, poznatiji kao angina, predstavlja infekciju tonzila izazvanu različitim vrstama bakterija (*Streptococcus pyogenes*, *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*), gljiva (*Candida albicans*) ili virusa (adenovirus, rinovirus, koronavirus, virus gripa) (Bakar i dr., 2018; Kalaiarasi i dr., 2018).

Hronični tonzilitis (HT) je dugotrajna infekcija koja nastaje kao posledica više ponovljenih infekcija tonzila. Patogeneza bolesti je različita i može nastati kao posledica više ponovljenih epizoda akutnog tonzilitisa ili kao posledica persistentne infekcije koja vodi ka hroničnoj upali koja je dugotrajna i polako napredujuća. Upalom mogu biti zahvaćene sve limfne strukture koje pripadaju Valdejerevom prstenu. Najčešće su upalom zahvaćene nepčane tonzile i adenoid (Plank, 2016). Postoji nekoliko načina kategorizacije ove infekcije: a) HT može biti: bakterijske, virusne i gljivične etiologije zavisno od infektivnog agensa koji se nalazi u osnovi hronične inflamacije; b) prema makroskopskim i mikroskopskim karakteristikama HT može biti hipertrofični ili atrofični i c) u odnosu na starosno doba HT se može podeliti na HT kod dece i HT kod odraslih.

Uzroci nastanka bolesti su višestruki. Različiti etiološki faktori dovode do pojave hroničnog tonzilitisa. Jedan od mehanizama koji dovodi do inicijacije hroničnog toka bolesti je dvostruka infekcija (virusna infekcija zajedno sa pojavom bakterijske infekcije). Takođe, faktori sredine, posebno upotreba antibiotika i ishrana mogu imati uticaja na pojavu i tok bolesti. U praksi je pokazano da je HT skoro uvek povezan sa perzistentnom infekcijom beta hemolitičkim streptokokama grupe A (Plank, 2016).

Dijagnoza HT–a se postavlja na osnovu detaljne anamneze, ponovljenih kliničkih otorinolaringoloških (ORL) pregleda, bakterioloških i biohemijskih nalaza. Prema važećim kliničkim vodičima za dijagnozu i praćenje bolesti znaci HT–a uključuju sledeće simptome: tri ili više upala godišnje, bol u grlu, otežano gutanje (disfagija), opstrukcija disajnih puteva, kašalj, prisustvo gustog sekreta u nosu i grlu, neprijatan zadah (halitoza) i hrkanje koji traju duže od tri meseca (Lescanne i dr., 2012; Bellussi i dr., 2019).

Imajući u vidu etiologiju i progresiju bolesti, HT ima veliki uticaj na kvalitet života obolelih (i dece i odraslih). HT koji se primarno javlja u dečijem uzrastu predstavlja ozbiljan zdravstveni problem, jer može izazvati višestruke komplikacije koje mogu biti: lokalne (peritonzilarni apsces, upala srednjeg uha, upala sinusa, česti bronhitis) i sistemske (IgA nefropatija, artropatija i reaktivni artritis, endokarditis, enteritis i dr.) (Perry i Whyte, 1998; Mogoantă i dr., 2008; Bakar i dr., 2018).

Lečenje infekcije podrazumeva tretiranje uzročnika antimikrobnim lekovima (antibioticima), koji su jako delotvorni kod akutnih, ali ne i kod hroničnih infekcija. Usled prekomerne i neadekvatne upotrebe antibiotika, uzročnici infekcija mogu razviti rezistenciju što dodatno otežava njihovu eradikaciju, a posledično i lečenje hroničnih upala. Takođe, otežanom lečenju HT doprinosi i sposobnost mikroorganizama da formiraju biofilm u kriptama tonzila, zbog čega se infekcija često ponavlja (Bakar i dr., 2018). Neki autori recidive objašnjavaju upravo prisustvom struktura biofilma i njihovom rezistencijom na primenjene lekove (Mogoantă i dr., 2008). Kania i dr. (2007) su utvrdili da 70,8% izolovanih bakterija kod pacijenata sa HT formira biofilm u tkivu tonzila, dok su Al-Mazrou i dr. (2008) dokazali prisustvo biofilma u epitelu tonzila kod pacijenata koji će biti podvrgnuti tonsilektomiji, što je hiruško odstranjivanje tonzila (tonsilektomija/adenotonsilektomija). Prema Lescanne i dr. (2012) i Mitchell i dr. (2019) indikacije za tonsilektomiju su:

- tonzilarna hipertrofija udružena sa poremećajem disanja tokom spavanja (*sleep apnea*);
- tonzilarna hipertrofija koja dovodi do orofaringealne opstrukcije, koja se ispoljava poremećajima gutanja i/ili govora;
- rekurentni akutni tonsilitis (3 ili više infekcija godišnje u periodu od 3 godine ili 5 infekcija godišnje u periodu od 2 godine);
- hronični tonsilitis sa lokalnim (bol u grlu, neprijatan zadah, tonzile pod upalom) i regionalnim (cervikalna adenopatija) znacima inflamacije koji traju duže od 3 meseca i koji su rezistenti na medikamentoznu terapiju;
- rekurentni peri-tonzilarni apsces;
- ostale infektivne bolesti: Maršalov sindrom (periodična groznica, afte, faringitis, adenitis), sindrom post streptokoknog akutnog tonsilitisa izazvanog streptokokama grupe A i akutni tonsilitis uzrokovan mononukleozom.

Lečenje HT–a je skupo i dugo traje, prvenstveno zbog pojave neefikasnosti antibiotika koji se primenjuju u lečenju. Takođe, operacija koja sa sobom nosi i moguće postoperativne komplikacije (krvarenje, bolnu disfagiju i respiratornu opstrukciju) povećava troškove lečenja i dodatno izlaže pacijente stresu, prvenstveno kod osoba dečijeg uzrasta. Zbog toga se poslednjih godina vrše različita istraživanja u cilju pronalazaženja supstanci prirodnog porekla koje mogu uticati na rast patogenih bakterija uzročnika HT–a.

1.2. Značaj prirodnih produkta

Procenjuje se da gotovo 80% svetske populacije za lečenje različitih oboljenja koristi produkte prirodnog porekla u vidu čajeva, ekstrakata i etarskih ulja. Ono što su iskustvena znanja različitih naroda, danas je potvrđeno brojnim hemijskim i biološkim analizama. Veliki broj prirodnih produkata poseduje niz bioloških aktivnosti koje su najčešće posledica istovremenog delovanja više različitih jedinjenja ili grupa jedinjenja. Poznato je i da mnogi farmaceutski proizvodi koji su u kliničkoj upotrebi vode poreklo od biljaka ili gljiva (kinin, teofilin, penicilin i dr.) (Lahlou, 2013). Ipak, zbog porasta broja i rezistentnosti patogenih mikroorganizama na postojeće lekove kao i naučnih dokaza o efikasnosti prirodnih produkata povećan je obim ispitivanja supstanci prirodnog porekla sa ciljem otkrivanja aktivnih komponenti i njihove potencijalne primene u farmaciji i medicini.

1.3. Makromicete i njihov potencijal za dobijanje novih, biološki aktivnih supstanci

Mnoge makromicete (jestive i/ili lekovite vrste) predstavljaju nedovoljno iskorišćen izvor supstanci koje mogu naći primenu u tretmanu različitih bolesti čoveka. Gljive se pre svega zbog visokog sadržaja proteina i sekundarnih metabolita koriste za poboljšavanje imunskog odgovora kod različitih bolesti. Danas su u upotrebi različiti dijetetski proizvodi na bazi makromiceta koji se koriste za prevenciju ali i za ublažavanje simptoma različitih bolesti. Proizvodi na bazi makromiceta ne mogu u potpunosti da zamene komercijalne lekove, ali mogu u kombinaciji sa njihovom primenom da dovedu do poboljšanja opšeg stanja pacijenta (Stajić, 2015). Zato su autohtone vrste važan i još uvek neistražen izvor bioloških aktivnih supstanci koje mogu naći potencijalnu primenu u medicini, farmaciji i različitim granama privrede.

1.3.1. Hemijski sastav plodonosnih tela makromiceta

Jestive makromicete se zbog svoje specifične arome, ukusa kao i hemijskih i nutritivnih svojstava smatraju delikatesom u mnogim zemljama (Kalač, 2013). Prema podacima FAOSTAT-a (Food and Agriculture Organization of the United Nations), svetska produkcija komercijalnih vrsta makromiceta u 2018. godini iznosila je preko 15 miliona tona (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>). Plodonosna tela makromiceta sadrže visok procenat proteina, ugljenih hidrata, nezasićenih masnih kiselina, vitamina i minerala i nizak procenat kalorija i masti (Rahi i Malik, 2016), zbog čega su jako cenjene i smatraju se niskokaloričnom hranom (Kalač, 2013; Barroetaveña i Toledo, 2017). Jestive makromicete predstavljaju dopunu svakodnevnoj ishrani zbog hranljivih materija koje poseduju, a koje nisu toliko zastupljene u prehrambenim proizvodima biljnog i životinjskog porekla (Rahi i Malik, 2016). Takođe, bazidiokarpi sadrže i biološki aktivna jedinjenja (fenoli, terpeni, polisaharidi) što ih čini i medicinski značajnim.

Ugljeni hidrati, u zavisnosti da li podležu digestiji i apsorpciji u digestivnom traktu ili ne, podeljeni su na svarljive (digestibilne) i nesvarljive ugljene hidrate, koji u zavisnosti od vrste čine oko 3 – 65% suve mase makromiceta (Barros, 2008a; Cheung, 2010). Ugljeni hidrati koji podležu digestiji su: monosaharidi (glukoza, fruktoza), disaharidi (trehaloza) i manitol, dok oligosaharidi i polisaharidi (hitin, manan i β -glukan) spadaju u ugljene hidrate koji ne podležu potpunoj digestiji (dijetetska vlakna) (Cheung, 2010). Sadržaj dijetetskih vlakana varira zavisno od vrste, pa tako npr. plodonosna tela *Tricholoma giganteum* sadrže niski nivo dijetetskih vlakana (4,5% suve mase), dok su plodonosna tela *Auricularia auricular judea* bogata dijetetskim vlaknima (49,7% suve mase) (Cheung, 2010). Najzastupljeniji među polisaharidima su β -glukani, za koje je pokazano da poseduju različite biološke aktivnosti (antitumorsku, imunomodulirajuću, antioksidativnu i neuroprotektivnu). Varijabilnost u njihovoj zastupljenosti u plodonosnim telima makromiceta varira od 0,21 – 0,53 g/ 100 g suve mase (Valverde i dr., 2015).

Proteini čine 10 – 44% suve mase plodonosnog tela makromiceta (Barros, 2008a). Ukupan sadržaj proteina kod iste vrste može varirati u zavisnosti od faze razvića, dela plodonosnog tela koji se koristi za analizu, načina skladištenja ali i usled korišćenja specifičnog faktora za preračunavanje (Stajić, 2015). Proteini u ljudskom organizmu pojačavaju apsorbciju hranljivih materija u gastrointestinalnom (GI) traktu, i utiču na izmenu imunskog odgovora, čime štite organizam od patogena (Rathore i dr., 2017). Proteini koji ispoljavaju širok spektar bioloških aktivnosti, a koji su prisutni u bazidiokarpima i miceliji makromiceta su: lektini, antimikrobni proteini, imunomodularni proteini, ribozom inaktivirajući proteini, ribonukleaze i lakaze (Valverde i dr., 2015). Najznačajniji među njima su lektini koji pripadaju grupi glukoproteina koji se vezuju za ugljene hidrate na površini ćelije i koji poseduju imunomodulatornu, antitumorsku, antivirusnu i antimikrobnu aktivnost. Imunomodulatorni proteini gljiva su nova porodica bioaktivnih proteina, koji su pokazali potencijalnu primenu kao pomoćna sredstva u imunoterapiji tumora zbog svoje aktivnosti u suzbijanju invazije tumora i metastaza. Prema istraživanju sprovedenom od strane Bauer Petrovske (2001) kod 24 vrste ispitivanih makromiceta ukupna procentualna zastupljenost albumina, globulina, prolamina i glutelina varira između vrsta u opsegu 14% suve mase kod *Laetiporus sulphureus* do 52% kod *Calvatia caelata*. Takođe, proteini su i dobar izvor esencijalnih amino kiselina kao što su: leucin, valin, treonin, lizin, metionin i triptofan, od kojih leucin i valin čine 25 – 40% ukupnog sadržaja aminokiselina u plodonosnim telima makromiceta (Barros, 2008a).

Lipide makromiceta čine: slobodne masne kiseline, mono-, di-, i trigliceridi, steroli, sterolni estri i fosfolipidi (Barros, 2008a). Prema Cheung (2020) lipidi čine 5% suve mase plodonosnog tela makromiceta. Poznato je da samonikle vrste imaju visok sadržaj polinezasićenih masnih kiselina (linoleinska i oleinska), i nizak sadržaj zasićenih (palmitinska i stearinska) kiselina. Linoleinska kiselina je prekursor aromatičnog jedinjenja 1-okten-3-ola koje je dominantno aromatično jedinjenje kod većine gljiva, a koje gljivama daje karakterističan miris (Barros, 2008a). Mujić i dr. (2011), su pokazali da lipidi vrsta *Macrolepiota procera* i *Collybia platyphylla* dovode do povećanja fluidnosti membrane eritrocita, osobine značajne za lečenje hipertenzije.

Sadržaj pepela u plodonosnim telima samoniklih makromiceta varira i kreće se između 5,53 g/100 g suve mase kod *Boletus edulis* do 37,78 g/100 g suve mase kod vrste *Russula olivacea* (Barroetaveña i Toledo, 2017). Plodonosna tela makromiceta akumuliraju veliki broj različitih minerala, kao što su: kalijum, kalcijum, magnezijum, bakar, gvožđe, cink i fosfor, sadrže i natrijum ali u znatno manjim količinama. Koncentracije minerala u plodonosnim telima makromiceta su više nego u povrću i voću (Barros, 2008a). Takođe, makromicete mogu akumulirati i teške metale kao što su živa, olovo i kadmijum koji imaju toksičan efekat na organizam (Kalač, 2013).

Plodonosna tela makromiceta su takođe i dobar izvor vitamina a najzastupljeniji su: vitamin B (tiamin – B1, riboflavin – B2, niacin – B3 i piridoksin – B6), vitamin C (askorbinska kiselina) i vitamin E (tokoferol). Vitamini A i D su slabo zastupljeni u plodonosnim telima, ali zato veliki broj makromiceta sintetiše njihove prekursore: β -karoten (prekursor vitamina A) i γ -ergosterol (prekursor vitamina D) (Barros 2008a; Kalač 2013; Rahi i Malik, 2016). Tokoferoli su grupa vitamina koji su najviše proučavani kod samoniklih makromiceta, prvenstveno zbog svoje antioksidativne aktivnosti (Barroetaveña i Toledo, 2017).

Fenolna jedinjenja se mogu podeliti u više klasa na osnovu svoje hemijske strukture. Prosta fenolna jedinjenja su fenolne kiseline, fenilpropanoidi i flavonoidi; dok u složenije molekule spadaju lignini, melanini i tanini (Barros, 2008a). Plodonosna tela makromiceta sadrže najčešće derivate fenolnih kiselina koji su podeljeni u dve grupe: derivate hidroksibenzojeve kiseline i derivate hidroksicinaminske kiseline i koji su važni jer poseduju antioksidativnu aktivnost koja značajno utiče na smanjenje rizika od nastanka hroničnih bolesti (Ferreira i dr., 2009).

Organske kiseline doprinose organoleptičkim karakteristikama bazidiokarpa makromiceta. Usled termičke obrade i skladištenja, sadržaj organskih kiselina je slabo promenljiv za razliku od

drugih jedinjenja (npr. pigmenti). Zbog svoje antioksidativne aktivnosti, organske kiseline imaju protektivnu ulogu u nastajanju mnogih bolesti. Najčešće izolovane organske kiseline kod makromiceta su oksalna, kumarna i limunska (Barros, 2013).

1.3.2. Medicinski značaj makromiceta

Plodonosna tela makromiceta su pored nutritivne vrednosti jako cenjene i zbog svoje lekovitosti. Poznata je njihova široka primena u farmaciji i medicini, kao funkcionalni aditivi ishrani (nutriceutici), upravo zahvaljujući sinergističkoj aktivnosti njihovih bioaktivnih jedinjenja (Barros i dr., 2008b; Badalyan, 2012). Medicinski značajnim makromicetama se smatraju jestive i nejestive vrste koje ispoljavaju terapijski efekat na ljudski organizam (Wasser, 2011). Istorija upotrebe makromiceta, posebno u kineskoj tradicionalnoj medicini, je jako duga. Smatra se da lekovite makromicete imaju ukupno 126 terapijskih aktivnosti od kojih su najznačajnije: antioksidativna, antihiperholesterolna, antihiperглиkemijska, antimikrobna, antitumorska, imunomodulirajuća i hepatoprotektivna (Wasser, 2010).

1.3.2.1. Antimikrobna aktivnost

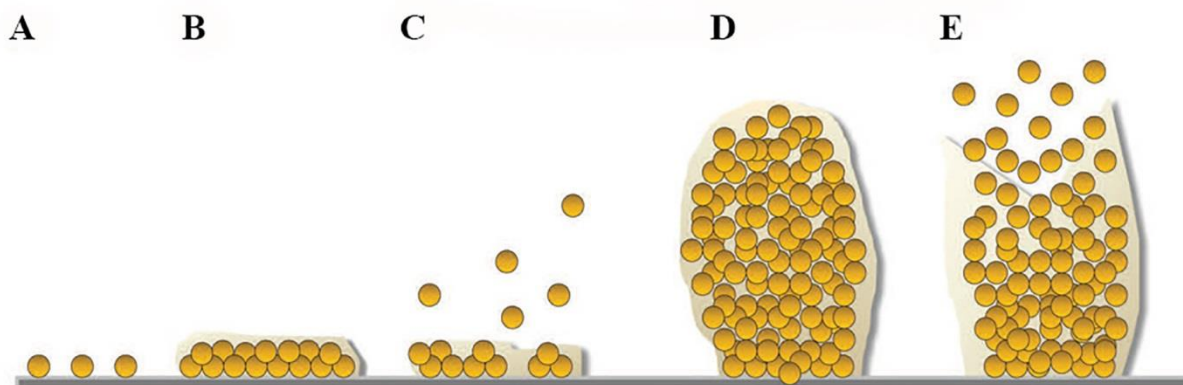
Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (WHO, 2014) bolesti kao što su meningitis, infekcije respiratornog trakta, bolničke infekcije, spadaju u bakterijske infekcije čiji je broj u porastu, prvenstveno zbog pojave rezistentnosti bakterija na antibiotike. Poslednjih godina, u porastu je broj infekcija izazvanih multirezistentnim sojevima *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp. i *Esherichia coli*. Posledično, povećao se i broj istraživanja koja obuhvataju analizu različitih ekstrakata i jedinjenja izolovanih iz plodonosnih tela gljiva u cilju pronalazjenja novih supstanci sa antimikrobnim delovanjem (Soković i dr., 2017). Smatra se da makromicete mogu biti dobar izvor prirodnih antibiotika zbog visoke zastupljenosti terpena, steroida, antrahinona, derivata benzoeve kiseline i oksalne kiseline u plodonosnim telima (Ferreira i dr., 2012). Vrste istog roda mogu ispoljiti različitu antibakterijsku aktivnost u zavisnosti od porekla kao i od tipa rastvarača koji je korišćen za ekstrakciju (Stojković i dr., 2013; Reis i dr., 2014). U studiji koja je obuhvatala pregled literature od 2000-2012, autori Alves i dr. (2012), dali su pregled antibakterijske aktivnosti različitih ekstrakata većeg broja makromiceta, koji su dobijeni ispitivanjem antimikrobnog potencijala disk difuzionom i mikrodilucionom metodom. Pokazano je da metanolni ekstrakti nekoliko vrsta roda *Lactarius* imaju bolju aktivnost protiv Gram pozitivnih bakterija G (+) u odnosu na Gram negativne G (-) bakterije. Slična studija sprovedena je i od strane Soković i dr. (2017), koja je uključila pregled antibakterijske aktivnosti različitih ekstrakata iz 33 vrste makromiceta. Među analiziranim ekstraktima, metanolni ekstrakti bazidiokarpa vrsta *Ganoderma lucidum* i *Coprinus comatus* imaju najbolju antibakterijsku aktivnost. Dalje, isti autori su predstavili i podatke koji se odnose na antifungalnu aktivnost ekstrakta mnogobrojnih vrsta makromiceta (Alves i dr., 2013a; Soković i dr., 2017). Takođe, Glamočlija i dr. (2019) su objedinili pregled rezultata antimikrobne aktivnosti jestivih i komercijalno gajenih makromiceta publikovane poslednjih deset godina. Među proučavanim vrstama, najbolju antimikrobnu aktivnost su ispoljile vrste rodova *Agaricus* (*A. bisporus*, *A. blazei*, *A. campestris*, *A. macrosporus*) i *Morchella* (*M. esculenta*, *M. conica*), kao i vrsta *Meripilus giganteus* i dr. Dalje, pokazano je da *p*-hidroksibenzoeva, *p*-kumarna, protokatehinska, galna, vanilinska, siringinska, cinaminska, kafeična i ferulna kiselina i rutin, kao i specifična jedinjenja izolovana iz bazidiokarpa testiranih rodova makromiceta (armilarna kiselina, rufuslakton, nekatorin, nekatoron, rusalan) poseduju značajnu antibakterijsku i antifungalnu aktivnost (Bross i dr., 1987; Obuchi i dr., 1990; Luo i dr., 2005; Alves i dr., 2013b; Khatua i dr., 2017).

1.3.2.2. Antibiofilm aktivnost

Biofilm predstavlja zajednicu mikroorganizama koja može biti sačinjena od jedne ili više bakterijskih i/ili gljivičnih vrsta koje su vezane za supstrat (abiotičkog ili biotičkog porekla) i povezane u ekstracelularni polimerni matriks. Ovakva zajednica pokazuje različite stope rasta i

ekspresije gena u odnosu na planktonske ćelije (Lister i Horswill, 2014). Prvi korak u formiranju biofilma je vezivanje planktonskih ćelija za supstrat, zatim dolazi do deobe ćelija, rasta i formiranja kolonija i ekstracelularnog polimernog matriksa. Ćelije nastalog biofilma se zatim mogu odvojiti i otpočeti ponovni ciklus formiranja biofilma na nekom drugom mestu u organizmu (Slika 3) (Moormeier i Bayles, 2017). Biofilm se smatra glavnim faktorom koji dovodi do hroničnih infekcija jer štiti bakterije od odbrambenog odgovora domaćina i dovodi do pojave rezistencije na primenjenu terapiju (Cavalcanti i dr., 2019). *S. aureus* u formi biofilma može dovesti do pojave hroničnih infekcija gornjih respiratornih puteva, uključujući i HT (Torreta i dr., 2013; Zautner i dr., 2010). Nosna šupljina i oralna duplja mogu biti polazne tačke širenja *S. aureus* infekcije na druga mesta u organizmu i nastanka sistemskih infekcija (Smith i dr., 2001; Archer i dr., 2011).

Uzimajući u obzir značaj biofilma u komunikaciji između bakterija, pojavi rezistentnih sojeva i poteškoće u tretmanu istih, javila se potreba za proučavanjem prirodnih proizvoda koji mogu biti izvor novih antimikrobnih lekova koji će biti efikasniji od postojećih u borbi protiv sojeva koji formiraju biofilm (Alves i dr., 2014a). U tom kontekstu, makromicete predstavljaju veoma važan izvor biološki aktivnih ekstrakata i/ili jedinjenja koja mogu da inhibiraju produkciju biofilma. Tako, pokazano je da različiti ekstrakti vrsta *Armillaria mellea* (Kostić i dr., 2017), i *Agaricus bisporus* (Soković i dr., 2014), *Agrocybe aegerita* i *Laetiporus sulphureus* (Petrović, 2018) uspešno utiču na sprečavanje formiranja *P. aeruginosa* biofilma. Alves i dr. (2014a), su utvrdili da primena sub-inhibitornih koncentracija metanolnih ekstrakata različitih makromiceta (*Lepista nuda*, *Leucopaxilus giganteus*, *Mycena rosea*, *Russula delica*) ima uticaja na inhibiciju biofilma različitih kliničkih izolata (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*). Dok su Čuvalová i dr. (2018), pokazali da vodeni ekstrakti vrsta: *Macrolepiota procera*, *Pleurotus ostreatus*, *Auricularia auricula-judae*, *A. mellea* i *L. sulphureus*, uspešno inhibiraju *Staphylococcus aureus* biofilm.



Slika 3. Proces formiranja *Staphylococcus aureus* biofilma: A) adhezija bakterijskih ćelija, B) rast i formiranje mikrokolonije i ekstracelularnog matriksa, C) eksodus – nakon dostizanja konfluentnosti dolazi do oslobađanja ćelija iz biofilma i stvaranja trodimenzionalnih mikrokolonija, D) maturacija – sazrevanje biofilma, E) disperzija biofilma – rasejavanje ćelija ka drugim mestima u organizmu (preuzeto i modifikovano iz Moormeier i dr., 2017).

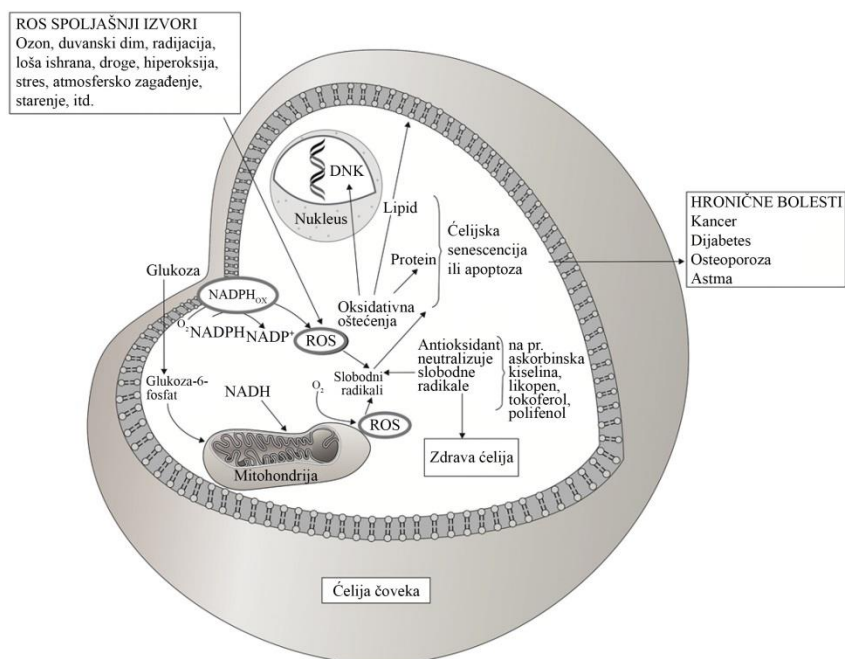
1.3.2.3. Antioksidativna aktivnost

Savremeni način života povezan je sa pojavom velikog broja štetnih materija u životnoj sredini koje unete u naš organizam, putem respiratornog trakta, utiču na povećanje oksidativnog stresa. Oksidativni stres predstavlja narušenu ravnotežu između stvaranja reaktivnih molekularnih vrsta i njihovog neutralisanja (Kozarski i dr., 2015). Slobodni radikal (SR) je hemijsko jedinjenje koje sadrži jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj atomskoj ili molekularnoj orbitali (Alliwell, 1994). Radijacija, pesticidi, duvanski dim, ksenobiotici, teški metali, alkohol, predstavljaju spoljašnje faktore koji dovode do stvaranja reaktivnih oblika prvenstveno kiseonika i azota (RONS

– Reactive Oxygen and Nitrogen Species), ali se mogu javiti i druge reaktivne vrste (RSS – Reactive Sulphur Species). RONS normalno nastaju kao produkti metaboličkih procesa u ćelijama (aerobna respiracija, degradacija masnih kiselina i toksičnih materija) što ujedno predstavlja unutrašnje faktore pod čijim uticajem dolazi do stvaranja SR-a (Lobo i dr., 2010; Sánchez, 2017). Usled prekomerne proizvodnje reaktivnih oblika, a bez mehanizma neutralizacije, dolazi do narušavanja ravnoteže u ćelijama, akumulacije reaktivnih vrsta i narušavanja ćelijskih struktura poput lipida, proteina, ugljenih hidrata i nukleinskih kiselina (Slika 4). Oštećenje ćelija uzrokovano SR-ima predstavlja uzrok procesa starenja, razvoja kardiovaskularnih i inflamatornih bolesti, neuroloških poremećaja i tumora. S obzirom na to da je oksidacija proces koji ćelijama obezbeđuje energiju i omogućava normalno funkcionisanje imunskog sistema, RONS su uključeni i u imunsku odbranu ćelija tokom inflamacije (Ferreira i dr., 2009; Liguori i dr., 2018; Stojković i dr., 2019). Zato usled njihove nekontrolisane i neuravnotežene proizvodnje dolazi do oštećenja tkiva kao što je pokazano u slučaju hroničnog tonzilitisa prema navodima Kaygusuz i Nevin (2003) i Cvetković i dr. (2009).

Antioksidans je molekul koji neutrališe slobodne radikale dajući im elektron, čime ih stabilizuje (Sánchez, 2017). Mehanizmi antioksidativne zaštite uključuju enzimske (superoksid dizmutaza – SOD, katalaza – CAT, glutation peroksidaza – GPx, glutation redutaza – Gred) i neenzimske sisteme (vitamini C, E, A; karotenoidi; polifenoli; minerali (Zn, Se); melatonin; glutation) (Kozarski i dr., 2015). Poslednjih godina, smanjena upotreba sintetičkih antioksidansa (butilovani hidroksianizol (BHA), butilovani hidroksitoluen (BHT) i tercijarni-butilovani hidroksihinon (TBHQ)) zbog štetnog efekta koje mogu imati po zdravlje ljudi, dovela je do većeg interesovanja za jedinjenjima prirodnog porekla koja imaju antioksidativnu aktivnost (Ferreira i dr., 2009; Stajić i dr., 2013).

Mnoga *in vitro* istraživanja ukazuju da različiti ekstrakti brojnih vrsta makromiceta poseduju antioksidativni potencijal. Smatra se da su fenoli (fenolne kiseline i flavonoidi), polisaharidi, tokoferoli, karotenoidi i askorbinska kiselina, prisutni u plodonosnom telu i miceliji, nosioci antioksidantne aktivnosti makromiceta (Ferreira i dr., 2009; Sánchez, 2017). Komercijalno gajene makromicete *Agaricus bisporus* i *Pleurotus ostreatus*, kao i samonikle vrste *Armillaria mellea*, *Lactarius deliciosus*, *L. piperatus*, *L. vellereus*, *Laetiporus sulphureus*, *Russula cyanoxantha* i mnoge druge, imaju značajnu antioksidativnu aktivnost (Ribeiro i dr., 2006; Barros i dr., 2007a; Ng i dr., 2007; Heleno i dr., 2012; Muszynska i dr., 2013; Petrović i dr., 2014; Stojković i dr., 2014). Pored jestivih, brojna istraživanja su pokazala da i medicinski značajne vrste kao što su: *Phellinus linteus*, *Ganoderma lucidum* i *Inonotus obliquus* poseduju antioksidantan kapacitet (Kozarski i dr., 2012; Wang i dr., 2014; Glamočlija i dr., 2015). Istraživanja ukazuju da aktivnost zavisi od vrste rastvarača, temperature, kao i od starosti plodonosnog tela (Ferreira i dr., 2009). Koristeći različite *in vitro* testove za ispitivanje antioksidantne aktivnosti, Elmastas i dr. (2007) su pokazali da metanolni ekstrakti vrsta *Lepista nuda*, *Russula delica*, *Boletus badius* i *Polyporus squamosus* imaju veću sposobnost hvatanja jona Fe^{2+} u poređenju sa BHT i BHA sintetičkim antioksidansima što ukazuje na njihovu zaštitnu ulogu u procesu peroksidacije.

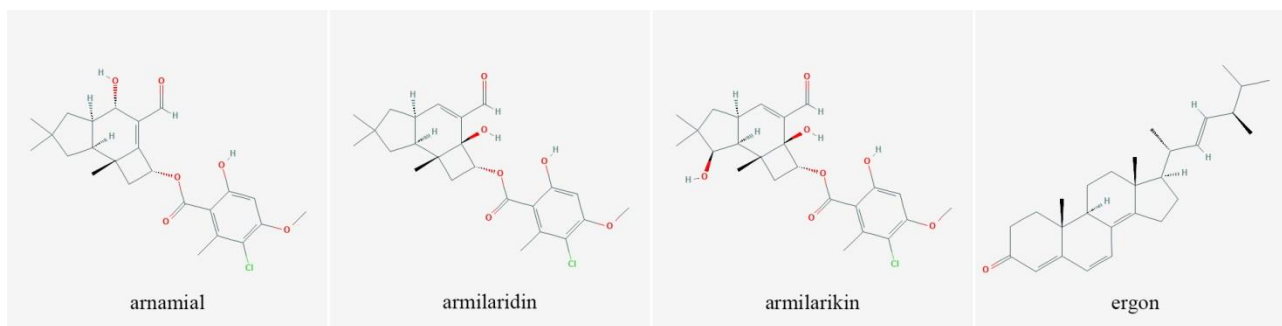


Slika 4. Uzročnici oksidativnog stresa, odbrambeni mehanizmi i antioksidansi (preuzeto i modifikovano iz rada Sánchez, 2017).

1.3.2.4. Antitumorska aktivnost

Maligna oboljenja su drugi uzrok smrtnosti humane populacije u svetu (WHO, 2018). Prema podacima Svetske Zdravstvene Organizacije, 9,6 miliona ljudi u svetu je umrlo od posledica karcinoma u 2018. godini. Najzastupljeniji tip i ujedno maligno oboljenje sa najvišom stopom smrtnosti je karcinom pluća (2,06 miliona obolelih/1,76 miliona umrlih od raka pluća u 2018. godini, (WHO, 2018)). Citostatici koji se danas koriste u tretmanu različitih malignih oboljenja ispoljavaju mnogobrojne nuspojave i komplikacije. Makromicete su prepoznate kao dodatak hemio- i radioterapiji jer suzbijaju neželjene efekte terapije, poput mučnine i anemije (Patel i Goyal, 2012). U tom kontekstu sprovedena su brojna klinička ispitivanja tretmana malignih oboljenja u kojima su korišćeni preparati napravljeni od ekstrakta lekovitih makromiceta i/ili njihovih bioaktivnih jedinjenja (Maruyama i dr., 2007; Chang i Wasser, 2012; Wasser, 2014). Polisaharidi makromiceta su nosioci antitumorske i imunomodulirajuće aktivnosti, među njima, biološki najaktivniji su β -glukani. Polisaharidi aktiviraju imunski sistem stimulacijom limfocita, makrofaga, NK (natural killer) ćelija, monocita i neutrofila da sintetišu citokine koji deluju antiproliferativno, indukujući apoptozu tumorskih ćelija (Wasser, 2002). Pored polisaharida značajnu antitumorsku aktivnost imaju i terpeni, lektini, alkaloidi i dr. (Chang i Wasser, 2012).

Ekstrakti (vodeni, etanolni i metanolni) različitih vrsta makromiceta (*Lentinula edodes*, *Lignosus rhinocerus*, *Suillus luteus* i dr.) u *in vitro* uslovima su pokazali značajnu antitumorsku i citotoksičnu aktivnost (Soković i dr., 2017). Seskviterpenoidi, armilarikin, armilaridin i arnamiol (Slika 5), izolovani iz micelije *Armillaria mellea* imaju značajnu citotoksičnu aktivnost na maligne ćelije jetre, ezofagusa, pluća, dojke i kolorektalnog karcinoma (Misiek i dr., 2009; Chi i dr., 2013; Chen i dr., 2015; Chen i dr., 2016). Polisaharidi izolovani iz micelije *Lactarius flavidulus* pozitivno citotoksično deluju na ćelije sarkoma u *in vivo* uslovima, dok lektin izolovan iz iste vrste ima antiproliferativnu aktivnost protiv kancerskih ćelija jetre (Wu i dr., 2011). Prema navodima Vanyolos i dr. (2015) među 16 testiranih vrsta podrazdela Basidiomycotina, jedna od tri vrste koje su pokazale najbolju aktivnost protiv HeLa, A2780, A431, MCF7 malignih ćelija, su ekstrakti vrste *Lactarius quietus*. Ergon, bioaktivni steroid izolovan iz bazidiokarpa *Russula cyanoxantha* ima antiproliferativnu aktivnost na ćelije jetre, dok lektin izolovan iz *R. lepida* pokazuje antitumorsku aktivnost na ćelije karcinoma jetre i dojke (Zhang i dr., 2010; Zhao i dr., 2011).



Slika 5. Hemijske strukture odabranih jedinjenja sa antitumorskom aktivnošću (strukture preuzete sa <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

1.3.2.5. Ostale biološke aktivnosti makromiceta

Pored gore pomenutih bioloških aktivnosti ekstrakti rodova *Armillaria*, *Lactarius* i *Russula* poseduju i druge različite aktivnosti. Pokazano je i da ekstrakti i izolovana jedinjenja (uglavnom terpenoidi) makromiceta imaju antivirusnu aktivnost. Principi njihovog delovanja su inhibicija virusnih enzima i inhibicija sinteze virusnih nukleinskih kiselina (De Silva i dr., 2013). Wang i dr. (2007) su pokazali da *Russula paludosa* ekstrakt ima antivirusni efekat na virus HIV-1. Biološka aktivnost ekstrakata makromiceta je zabeležena i kod tretmana dijabetesa (*diabetes mellitus*) koji je metabolički poremećaj izazvan apsolutnim nedostatkom ili nedovoljnom sekrecijom insulina i karakteriše ga povišen nivo glukoze u krvi (hiperglikemija) što za posledicu može imati ozbiljna oštećenja srca, krvnih sudova i drugih organa. Istraživanje Xu i dr. (2019) je pokazalo da etanolni ekstrakt *Lactarius deliciosus* poseduje antihiperglikemijski potencijal jer inhibira aktivnosti α -amilaze i α -glukozidaze. Dok su Mihailović i dr. (2015) *in vivo* istraživanjem pokazali da etanolni ekstrakt *L. deterrimus* deluje protektivno na ostrvca pankreasa kod dijabetičnih pacova nakon četvoronedeljnog tretmana. Alchajmerova bolest je progresivna neurološka bolest mozga koja dovodi do nepovratnog gubitka neurona i intelektualnih sposobnosti, uključujući pamćenje i rasuđivanje, koje može postati dovoljno ozbiljno da može uticati na socijalni i profesionalni aspekt života (De Silva i dr., 2013). Prema navodima An i dr. (2017), polisaharidi izolovani iz micelije *A. mellea* su pokazali da mogu biti dobri kandidati u prevenciji i lečenju Alchajmerove bolesti zbog neuroprotektivne aktivnosti na neuronskoj ćelijskoj liniji hipokampusu miša. Dalje, u istom istraživanju, zabeleženo je da polisaharid pozitivno utiče i na obrasce ponašanja kod miševa sa Alchajmerovom bolešću. Kosanić i dr. (2020) su saopštili da ekstrakt *Lactarius piperatus* poseduje neuroprotektivnu aktivnost jer inhibira acetilholinesterazu. Zapaljenje (inflamacija) predstavlja odgovor organizma na promenu izazvanu oštećenjima tkiva različitim patogenima, iritantima, štetnim materijama i dr. (Elsayed i dr., 2014). Ruthes i dr. (2013) pokazali su da vodeni i etanolni ekstrakti (1→3), (1→6)- β -D-glukana, izolovani iz plodonosnog tela *L. rufus* imaju antiinflamatorni efekat *in vivo*. Ovi autori su otkrili da u poređenju sa nerastvorivim glukanim, rastvorivi glukani inhibiraju inflamatorni bol izazvan formalinom i zaključili su da rastvorljivost, kao i grananje glukana utiču na njihovu biološku aktivnost. Pirogalol, fenol izolovan iz *L. deliciosus* pokazao je antiinflamatornu aktivnost na RAW364.7 makrofagima (Moro i dr., 2012), dok etanolni ekstrakt *Russula virescens* deluje antiinflamatorno (Hur i dr., 2012). Za pomenute biološke aktivnosti nisu pronađeni podaci da su ispitivani kod većine testiranih vrsta, ali su predstavljeni podaci koji se odnose na testirani rod.

1.4. Etarska ulja, njihovo poreklo i biološka aktivnost

Etarska ulja su kompleksne smeše aromatičnih i isparljivih jedinjenja koja nastaju kao produkti sekundarnog metabolizma biljaka i dobijaju se iz različitih delova biljke (list, cvet, seme, koren) (Bakkali i dr., 2008). Etarska ulja mogu se sintetisati u egzogenim (žlezdane dlake) i endogenim (sekretorni kanali i šupljine) strukturama biljke. Primarna uloga etarskih ulja je ekološka i ogleda se u: zaštiti biljaka od preteranog zagrevanja prilikom intenzivne insolacije, privlačenju

oprašivača, odbijanju herbivora, smanjivanju kompeticije alelopatskim delovanjem na druge biljne vrste, a poznata je i njihova uloga u intra- i inter komunikaciji biljaka (Sharifi-Rad i dr., 2017). Pored povoljnih efekata koje imaju za biljke koje ih sintetišu, pokazano je da etarska ulja poseduju i različite biološke aktivnosti koje su povoljne i za ljude zbog čega se primenjuju u tretmanu različitih bolesti kod ljudi i životinja.

Origanum minutiflorum je višegodišnja, aromatična biljka, sa periodom cvetanja od jula do avgusta (Slika 6). Može se naći u istočno Mediteranskom regionu, vrsta je endemična u Turskoj (Sadikoğlu i Özhatay, 2015). Lokalno tursko stanovništvo ovu vrstu koristi u obliku začina i čaja, u cilju lečenja prehlade, reumatizma i kao analgetik (Sadikoğlu i Özhatay, 2015).



Slika 6. *Origanum minutiflorum*, divlji origano, nadzemni deo biljke (preuzeto sa <https://www.rethinkoil.com/pages/origanum-minutiflorum>).

Korijander (*Coriandrum sativum*) je jednogodišnja, aromatična biljka, nativna u istočnom Mediteranu, međutim danas je sveprisutna gajena biljka (Slika 7) (Mandal i Mandal, 2015). U tradicionalnoj medicini se u vidu praška ili tinktura upotrebljava protiv gubitka apetita, za lečenje konvulzija, nesаницe, anksioznosti i respiratornih tegoba (kašalj i bronhitis) (Ugulu i dr., 2009; Khan i dr., 2014; Mandal i Mandal, 2015).



Slika 7. *Coriandrum sativum*, korijander, nadzemni deo biljke (preuzeto sa sajta <https://gobotany.nativeplanttrust.org/genus/coriandrum/>).

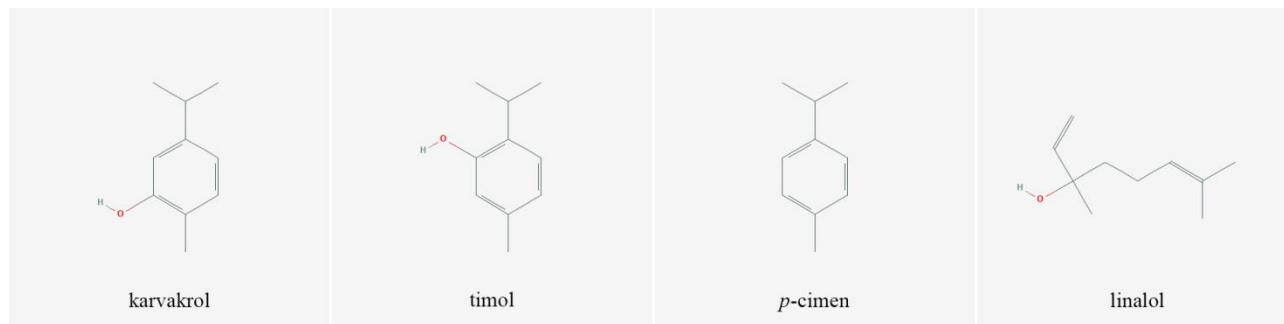
1.4.1. Hemijski sastav etarskih ulja

Sastav etarskih ulja, kao i količina variraju tokom životnog ciklusa biljke i zavise od brojnih faktora, kao što su: genetičke varijacije, ishrana biljke, lokalitet i vremenski uslovi tokom rasta, izloženost stresu usled rasta i sazrevanja; načina branja i skladištenja. Na sastav etarskih ulja uticaj može imati i deo biljke koji se koristi za ekstrakciju kao i metoda ekstrakcije i tip rastvarača. Etarsko ulje može sadržati od 20 do 60 različitih komponenti koji se po svojim hemijskim strukturama mogu svrstati u nekoliko hemijskih klasa (Bakkali i dr., 2008). Najčešće ih karakterišu dve, tri glavne komponente koje su zastupljene u prilično visokim koncentracijama (20 – 70%) u poređenju sa ostalim komponentama koje su mahom prisutne u manjim procentima ili u tragovima. Terpeni i alifatična i aromatična jedinjenja su najzastupljenije komponente etarskih ulja (Bakkali i dr., 2008; Eslahi i dr., 2018). Monoterpeni i seskviterpeni su najzastupljenije klase terpena u etarskim uljima. Glavne komponente većine etarskih ulja čine: monoterpeni ugljovodonici (*p*-cimen, limonen, α -pinen i α -terpinen), oksidovani monoterpeni (kamfor, karvakrol, eugenol i timol), diterpeni (cembren C, kauren, kamfen), seskviterpeni ugljovodonici (β -kariofilen, germakren D, humulen), oksidovani seskviterpeni (kariofilen oksid, spatulenon), monoterpeni alkoholi (geraniol, linalol, nerol), seskviterpeni alkoholi (pačulol), aldehidi (kuminal, citral), ketoni (acetofenon, benzofenon), laktoni (bergapten), fenoli (timol, karvakrol, eugenol, katehol), estri (etil acetat, bornil acetat) i kumarini (fumarin, benzofuran) (Slika 8) (Swamy i dr., 2016).

Rod *Origanum* sadrži 42 vrste koje su široko rasprostranjene u Mediteranskom regionu (Sharifi-Rad i dr., 2017). *O. vulgare* je najviše gajena vrsta origana. Osim ove vrste, naziv "origano" se koristi i za druge vrste roda koje su našle široku upotrebu u industriji hrane i fitoterapiji, a to su: *Origanum onites* – turski origano, *O. majorana* – slatki majoran, *O. minutiflorum* – divlji origano i *O. syriacum* var. *bevanii* – izraelski origano (Lombrea i dr., 2020). Hemijski sastav ulja kao i zastupljenost glavnih jedinjenja se razlikuje u odnosu na područje porekla biljke. Pa tako, etarsko ulje origana (*O. vulgare*) dobijeno iz biljaka sakupljenih u Italiji bogato je timolom, karkvakrolom, linalil acetatom i γ -terpinenom (De Mastro i dr., 2017), dok je u uzorcima poreklom iz Portugala dominantno jedinjenje β -fenhil alkohol pored timola, karkvakrola i γ -terpinena (Teixeira i dr., 2013). Etarsko ulje iz biljaka poreklom iz Crne Gore se još više razlikuje u svom sastavu od prethodno navedenih i njihove glavne komponente su: linalil acetat, germacren D, β -kariofilen, i α -terpineol (Stešević i dr., 2018). Takođe, razlike u sastavu etarskog ulja zavise i od dela biljke koji se koristi za destilaciju. Pa tako, ulje dobijeno iz stabljika biljke je siromašnije monoterpenima u odnosu na ulje dobijeno iz listova (Khan i dr., 2019). Hemijske analize etarskih ulja dobijenih iz različitih vrsta roda *Origanum* su pokazale da su njihove glavne komponente karvakrol, timol i *p*-cimen (Stefanakis i dr., 2013). Karvakrol (monoterpenoidni fenol) je jedinjenje koje je najzastupljenije u etarskom ulju *O. minutiflorum* a na njegovu zastupljenost najviše utiče vreme destilacije (Sokmen i dr., 2020). Toker i dr., (2017) utvrdili su da se prinos etarskog ulja smanjuje sa dužinom trajanja destilacije, dok se procenat karvakrola u ulju povećava.

Iako su svi delovi biljke *Coriandrum sativum* jestivi, u ishrani se najčešće koriste sveži ili sušeni listovi koji su bogati proteinima, vitaminima (A, B2, B3, C), mineralima (Ca, P i Fe), vlaknima i ugljenim hidratima. Listovi i seme korijandera su bogati i etarskim uljem koje daje specifičan ukus hrani zbog svog intenzivnog mirisa, i zato se puno koristi kao začim (Mandal i Mandal, 2015). Etarsko ulje korijandera se može naći u slobodnoj prodaji kao suplement (dodatak ishrani) i preporučena dnevna doza za odraslu osobu je 600 mg (EFSA, 2013). Prema navodima Ganesana i dr. (2013), zreli listovi korijandera sadrže visok procenat vode (87,9%), zatim 3,3% proteina, 6,5 % ugljenih hidrata i 1,7% pepela, dok je seme bogato i lipidima, 19 – 28%. Seme korijandera sadrži oko 0,2 – 1,5% isparljivog ulja i 13 – 20% masnih kiselina. Najzastupljenije masne kiseline u etarskom ulju semena korijandera su: petroselinska, linolenska, oleinska, palmitinska i stearinska kiselina (Mandal i Mandal, 2015). Etarsko ulje dobijeno iz semena korijandera se razlikuje po hemijskom sastavu od etarskog ulja dobijenog iz listova (Laribi i dr., 2015). Ulje dobijeno iz zrelih i osušenih semena je blede žute boje ili bezbojno, karakterističnog

mirisa i blagog ukusa i najzastupljenija komponenta je linalol (monoterpenski alkohol). Dok se ulje dobijeno iz sveže biljke odlikuje neprijatnim mirisom za koji su odgovorni alifatični aldehidi (Burdock i dr., 2009).



Slika 8. Hemijske strukture odabranih komponenti etarskih ulja (strukture preuzete sa: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

1.4.2. Medicinski značaj etarskih ulja

Lekovite i aromatične biljke smatraju se važnim resursom u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Procenjuje se da više od 80% svetske populacije u svom lečenju koristi tradicionalne biljne lekove (Swamy i dr., 2016). Poslednjih godina, proizvodi na bazi etarskih ulja su sve više zastupljeni u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Swamy i dr., 2016). Mnogobrojne studije su pokazale da etarska ulja origana i korijandera poseduju širok spektar bioloških aktivnosti, uključujući antimikrobnu, antioksidantu, antitumorsku, antihiperглиkemijsku, insekticidnu i dr. (Laribi i dr., 2015; Pezzani i dr., 2017).

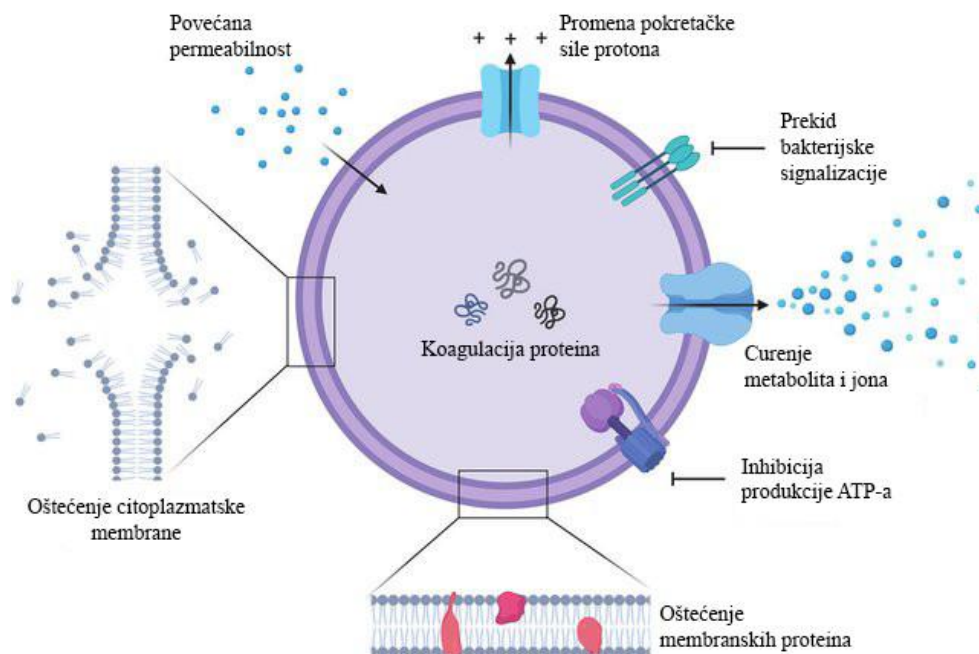
1.4.2.1. Antimikrobna i antibiofilm aktivnost etarskih ulja

Antimikrobni potencijal etarskih ulja zavisi od kvalitativnog i kvantitativnog sastava aktivnih komponenti (Nazzaro i dr., 2013). Zbog razlika u građi ćelijskog zida G (+) i G (-) bakterija, antibakterijska aktivnost ulja može biti različita (Raut i Karuppayil, 2014). Zahvaljujući svojoj lipofilnoj prirodi, etarska ulja lako prodiru kroz membrane bakterijskih ćelija, narušavajući njihov integritet i dovodeći do njihove veće propustljivosti (gubitka jona i curenja ćelijskih komponenti) (Slika 9). (Oussalah i dr., 2006; Saad i dr., 2013; Raut i dr., 2014). Antibakterijski potencijal etarskih ulja povezan je i sa redukcijom membranskog potencijala, ometanjem rada protonskih pumpi i trošenjem ATP-a (Turina i dr., 2006). Etarsko ulje origana u potpunosti inhibira produkciju enterotoksina vrste *Staphylococcus aureus*. Prema navodima, Albayrak i Aksoy, (2019) ekstrakt *O. minutiflorum* poseduje značajnu antimikrobnu aktivnost protiv G (+) i G (-) bakterija. Niz studija ukazuje da etarsko ulje semena korijandera ispoljava dobru antibakterijsku aktivnost na veliki broj bakterija, uključujući vrste roda *Streptococcus*, *Lactobacilli* i *Staphylococcus* (Casetti i dr., 2012; Pawar Vinita i dr., 2013; Thompson i dr., 2013).

Zabeleženo je da i pojedinačne komponente etarskih ulja mogu imati dobru antibakterijsku aktivnost. Tako npr. karvakrol utiče na ćelijsku membranu menjajući sastav masnih kiselina, što dovodi do povećanja permeabilnosti membrane. Takođe, karvakrol inhibira i sintezu flagelina, proteina zaduženog za pokretljivost bakterija (Swamy i dr., 2016). Dok su Ultee i Smit (2001, 2002) pokazali da karvakrol indukuje curenje i gubitak ATP-a iz ćelija, a dovodi i do inhibicije produkcije toksina kod vrste *Bacillus cereus*.

Kod kvasnica, etarska ulja prodiru kroz ćelijsku membranu i narušavaju proizvodnju ATP-a, što dovodi do oštećenja ćelijske membrane (Aleksić i dr., 2014). Kada su u pitanju filamentozne gljive etarska ulja prodiru kroz ćelijski zid i plazma mebranu što dovodi do promena u protoku elektrona i utiče na sadržaj proteina, lipida i nukleinskih kiselina u ćelijama (Swamy i dr., 2016).

Takođe, ulja mogu uticati i na depolarizaciju mitohondrija, čime smanjuju membranski potencijal. Ovakva promena u fluidnosti membrana može uzrokovati curenje elektrolita, ometati funkciju citohroma C, metabolizam proteina i koncentraciju kalcijumovih jona. Poremećaj permeabilizacije membrane mitohondrija može rezultirati apoptozom ili nekrozom ćelija (Swamy i dr., 2016). U literaturi se navode podaci da ulja korijandera i divljeg origana pokazuju i dobru antifungalnu aktivnost (Freires i dr., 2014; Albayrak i Aksoy, 2019).



Slika 9. Mehanizmi antimikrobne aktivnosti etarskih ulja (preuzeto i modifikovano iz Alves Carneiro i dr., 2020).

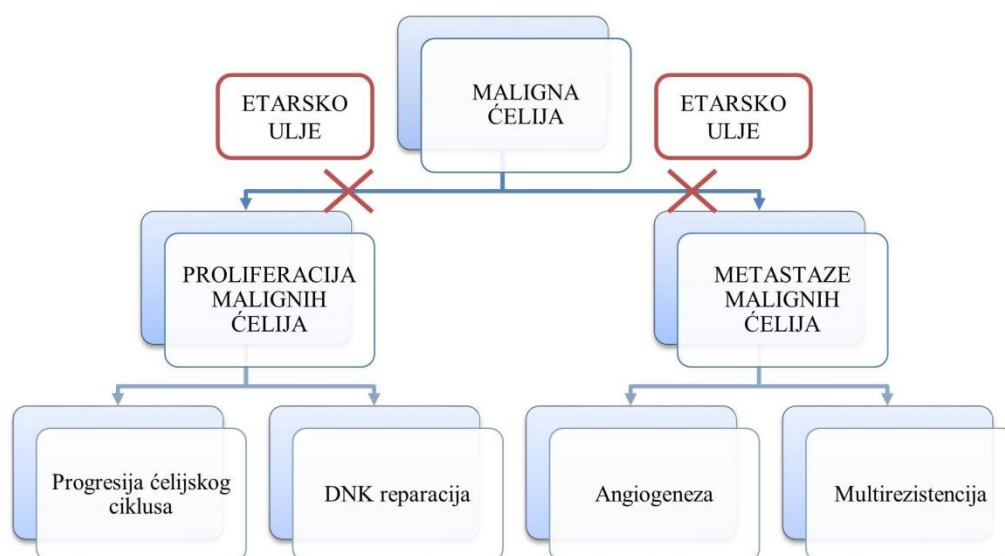
Etarska ulja mogu uticati na razvoj biofilma blokadom quorum sensing sistema ili ometanjem pokretljivosti bakterija (Nazzaro i dr., 2013). U zavisnosti od pokazane antibiofilm aktivnosti etarska ulja u budućnosti mogu naći različitu terapijsku primenu. Tako, etarska ulja koja inhibiraju stvaranje biofilma mogu se koristiti u profilaksi hirurške ugradnje različitih implanta, dok se etarska ulja koja imaju uticaj na već formirani biofilm mogu primenjivati, u kombinaciji sa antibioticima, u lečenju infekcija povezanih sa biofilmom. Etarska ulja različitih vrsta roda *Origanum* (*O. vulgare*, *O. majorana*) pokazala su veliki potencijal u inhibiranju i potpunom uklanjanju (eradikaciji) meticilin-rezistentnog *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilma (Lu i dr., 2018; Ben Abdallah i dr., 2020). Nosiocem antibiofilm aktivnosti *O. majorana* smatra se terpinen-4-ol (Ben Abdallah i dr., 2020). Furletti i dr. (2011) navode da etarsko ulje korijandera efikasno inhibira stvaranje *Candida albicans* biofilma.

1.4.2.2. Antioksidativna aktivnost etarskih ulja

Dosadašnja istraživanja ukazuju da je upotreba biljaka, posebno začinskih, kao izvora antioksidanasa obećavajuća alternativa sintetičkim antioksidansima (Nadeem i dr., 2013). Dokazano je da su flavonoidi, terpeni i fenoli odgovorni za snažnu antioksidantnu aktivnost etarskih ulja (Miguel, 2010; Raut i Karuppayil, 2014). Dve glavne komponente etarskih ulja kod vrsta iz rodova *Thymus* i *Origanum*, timol i karvakrol, poseduju snažnu antioksidativnu aktivnost (Miguel, 2010). Međutim, veći antioksidantni potencijal imaju ekstrakti listova korijandera nego ekstrakt semena (Nadeem i dr., 2013). Prema Darughe i dr. (2012) kampfor, limonen, geraniol i α -pinen su komponente odgovorne za antioksidativnu aktivnost etarskog ulja korijandera.

1.4.2.3. Antitumorska aktivnost etarskih ulja

Danas je česta primena hemioterapije, čiji je najveći izazov inhibicija dalje proliferacije malignih ćelija koja dovodi do progresije kancera, ali neminovno je prate i nusfekti. Savremena istraživanja su pokazala da etarska ulja mogu smanjiti proliferaciju malignih ćelija, razvoj metastaza tumora i rezistenciju malignih ćelija na lekove, što ih čini potencijalnim pomoćnim sredstvima u tretmanu malignih oboljenja (Gautam i dr., 2014). Mehanizmi antitumorske aktivnosti etarskih ulja se baziraju na apoptozi ćelija i DNK reparaciji što je prikazano na Slici 10 (Gautam i dr., 2014). Raut i Karuppayil (2014) su pokazali da etarska ulja dovode do smanjenja malignih tumora kao što su: gliom, tumor dojke, pluća, tumor jetre, želuca itd. Terpenoidi i polifenoli etarskih ulja indukuju apoptozu i nekrozu tumorskih ćelija i na taj način dovode do prevencije dalje proliferacije tumorskih ćelija (Bakkali i dr., 2008). Pokazano je da ulja predstavnika roda *Origanum* (*O. vulgare*, *O. minutiflorum*) poseduju citotoksičnu aktivnost protiv velikog broja ćelijskih linija, kao što su: karcinom dojke (MCF-7), adenokarcinom pluća (A549) i hepatocelularni karcinom (HepG2), kao i akutne T limfoblastne leukemije (CEM) (Pezzani i dr., 2017; Sokmen i dr., 2020).



Slika 10. Mehanizmi antitumorske aktivnosti etarskih ulja uključuju apoptozu ćelija i DNK reparaciju (preuzeto i modifikovano iz Gautam i dr., 2014).

1.4.2.4. Ostale aktivnosti etarskih ulja

Etarska ulja i njihove komponente, osim aktivnosti koje su opisane u prethodnim odeljcima, poseduju i druge aktivnosti koje nisu bile predmet ove doktorske disertacije. Smatra se da su monoterpeni, seskviterpeni i fenilpropanoidi odgovorni za inhibiciju replikacije virusa (Astani i dr., 2011). Imajući u vidu hemijski sastav etarskih ulja pokazano je da ulje origana ima i antivirusnu aktivnost protiv adenovirusa tip 3, poliovirusa i koksaki virusa grupe B (Reichling i dr., 2009). Kombinacija etarskih ulja cimeta, kima, komorača, origana i mirte u *in vivo* uslovima poseduje antidijabetsku aktivnost jer smanjuje nivo glukoze kod pacova obolelih od dijabetesa tipa 2 (Talpur i dr., 2005). Takođe, zabeleženo je da određena etarska ulja mogu imati i antimutagenu aktivnost. Tako su etarska ulja *Helichrysum italicum*, *Ledum groenlandicum*, *Cinnamomum camphora* i *Origanum compactum* pokazala antimutagenu aktivnost na indukovane mutacije kod *Drosophila melanogaster* (Idaomar i dr., 2002; Mezzoug i dr., 2007). Brojne studije pokazuju da ekstrakti i etarsko ulje korijandera poseduju antiinflamatornu aktivnost (Reuter i dr., 2008; Wu i dr., 2010). Ulje korijandera poseduje i antihiperглиkemijski potencijal jer stimuliše sekreciju insulina koji utiče na poboljšanje korišćenja glukoze kao izvora energije u mišićima (Pandeya i dr., 2013). Dok ulje iz semena korijandera je u *in vivo* studiji uticalo na metabolizam lipida, smanjujući nivo lipoproteina

male gustine (LDL) i lipoproteina vrlo male gustine (VLDL) (Dhanapakiam i dr., 2008; Gupta i dr., 2010). Takođe, u *in vivo* studiji, pokazano je da ulje korijandera pozitivno utiče i na memoriju A β (1-42) pacova (model sistem za ispitivanje Alchajmerove bolesti) koji su bili inhalirani 21 dan ovim uljem (Cionca i dr., 2013).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na osnovu svega prethodno navedenog o hroničnom tonzilitisu i biološkoj aktivnosti makromiceta i etarskih ulja, definisani su sledeći naučni ciljevi:

- prikupljanje demografsko-epidemioloških i kliničkih podataka o pacijentima sa HT i postoperativno uzorkovanje tkiva tonzila;
- izolacija i identifikacija mikroorganizama iz tonzilarnog tkiva i njegova histološka analiza;
- sakupljanje plodonosnih tela makromiceta sa terena u Srbiji i identifikacija vrsta: *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm.; *Lactarius piperatus* (L.) Pers.; *Lactarius quietus* (Fr.) Fr.; *Lactarius vellereus* (Fr.) Fr.; *Russula integra* (L.) Fr.; *Russula nigricans* (Bull.) Fr.; *Russula rosea* Pers.;
- određivanje nutritivne vrednosti plodonosnih tela proučavanih vrsta i karakterizacija odabranih tokoferola, prostih organskih, fenolnih i masnih kiselina;
- hemijska analiza komercijalnih etarskih ulja *Origanum minutiflorum* O.Schwarz & P.H.Davis (divlji origano) i *Coriandrum sativum* L. (korijander);
- ispitivanje antibakterijske i antibiofilm aktivnosti ekstrakata makromiceta i etarskih ulja;
- ispitivanje antioksidantne aktivnosti ekstrakata makromiceta i etarskih ulja;
- određivanje citotoksične aktivnosti ispitivanih ekstrakata i etarskih ulja na odabranu tumorsku ćelijsku liniju humanog porekla NCI-H460 (karcinom nemalih ćelija pluća) i netumorske ćelije svinjske jetre (PLP2).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Metodologija istraživanja

Istraživanje je urađeno u periodu od 2017 – 2020 godine i sastoji se iz četiri dela:

(i) Prvi deo istraživanja je obuhvatao prikupljanje demografsko-epidemioloških i kliničkih podataka o pacijentima. Postoperativno sakupljanje tkiva tonzila (adenoida i nepčanih tonzila) pacijenata kod kojih je prethodno dijagnostifikovan hronični tonzilitis (HT), a na osnovu preporuka kliničkog vodiča (Baugh i dr., 2011). Studija je obuhvatila analizu podataka 75 pacijenta, starosti od 3 – 40 godina, sakupljenih u vremenskom periodu od januara 2017. do decembra 2018 godine. Ovaj deo studije odobren je od strane strane Etičkog odbora Kliničko bolničkog centra (KBC) Zvezdara (Prilog 1).

(ii) Drugi deo istraživanja je obuhvatao obradu tkiva tonzila, izolaciju i identifikaciju mikroorganizama kao i analizu patohistoloških promena u operativnom hirurškom materijalu tonzila;

(iii) Treći deo istraživanja je obuhvatio sakupljanje i identifikaciju željenih vrsta makromiceta sa terena u Srbiji;

(iv) Četvrti deo istraživanja podrazumevao je hemijsku karakterizaciju ekstrakata plodonosnih tela odabranih makromiceta i etarskih ulja, kao i *in vitro* ispitivanje njihove biološke aktivnosti u tretmanu protiv prethodno izolovanih uzročnika hroničnog tonzilitisa.

Istraživanje je sprovedeno na:

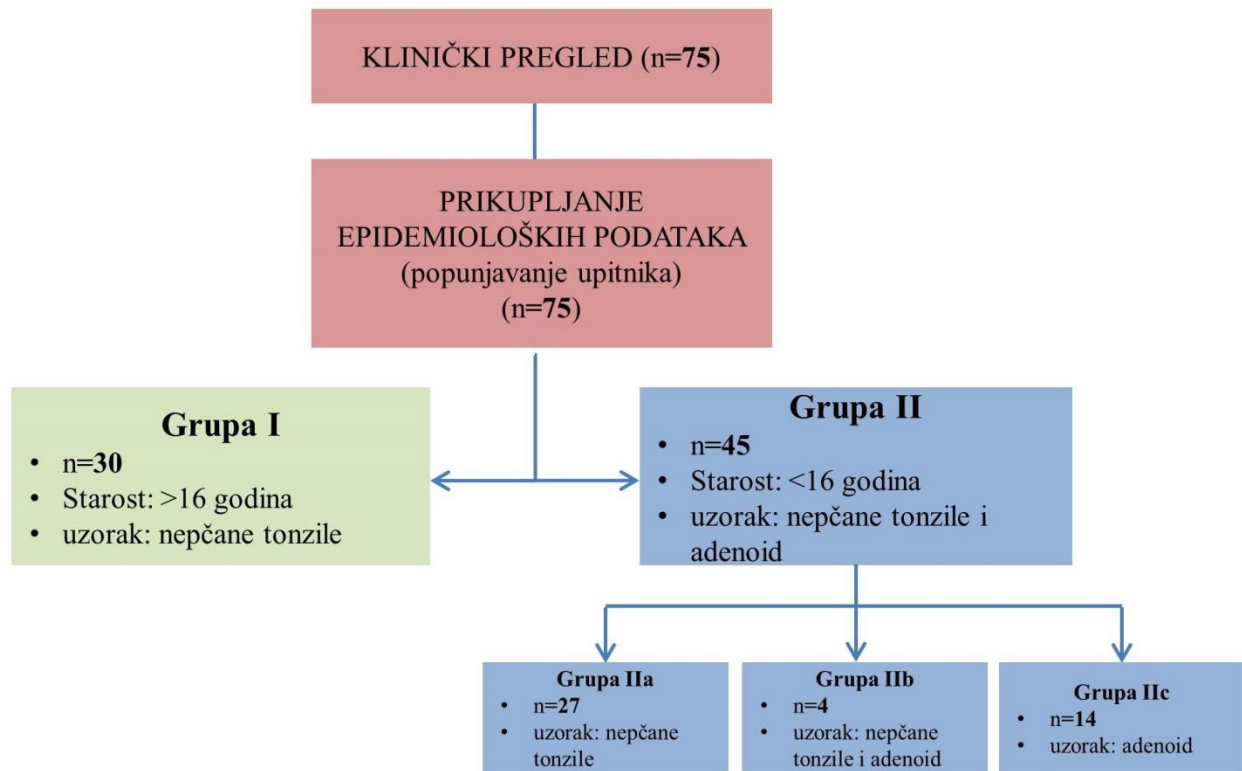
(i) Klinici za uvo, grlo i nos, KBC Zvezdara, Beograd;

(ii i iv) Odeljenju fiziologije biljaka, Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju (IBISS) i delom u Mountain Research Center - u, Politehnički Institut Braganca, Portugal.

(iii) na terenima u Srbiji i u Mikološkoj laboratoriji, Odeljenja fiziologije biljaka, IBISS

3.2. Selekcija ispitanika

U istraživanju je učestvovalo 75 pacijenata sa HT. Prvu grupu su činili pacijenti uzrasta 16 – 40 godina (Grupa I, n=30) kod kojih je izvršena tonzilektomija nepčanih tonzila. Drugu grupu činili su pacijenti uzrasta 3 – 16 godina (Grupa II, n=45) kod kojih je pored tonzilektomije urađena i adenektomija (hirurško uklanjanje adenoida). Pacijenti iz druge grupe su zatim podeljeni u 3 podgrupe na osnovu tkiva tonzila koje je uzorkovano: Grupa IIa, n=27, uzorak: nepčane tonzile; Grupa IIb, n=4, uzorak: adenoid i nepčane tonzile; Grupa IIc, n=14, uzorak: adenoid (Slika 11).



Slika 11. Dizajn studije – podela ispitanika po grupama

Selekcija ispitanika je vršena na osnovu inkluzionih i ekskluzionih kriterijuma prikazanih u Tabeli 1. Za prikupljanje svih neophodnih podataka korišćen je prethodno dizajniran Upitnik za ispitanike (Prilog 2).

Tabela 1. Inkluzioni i ekskluzioni kriterijumi

Grupa I <i>inkluzioni kriterijumi</i>	Grupa II <i>inkluzioni kriterijumi</i>
<ul style="list-style-type: none"> - pacijenti >16 god., - upala grla >3 puta godišnje, - dugotrajna upotreba antibiotika u lečenju HT, - bol u grlu, - otežano gutanje, - prisustvo gustog sekreta u grlu, - neprijatan zadah, - hiperemične, hipertrofične, kriptične tonzile sa detritusom u kriptama, - asimetrične, neravne tonzile sa hiperemijom nepčanih lukova. 	<ul style="list-style-type: none"> - pacijenti <16 god., - upala grla i ušiju* >3 godišnje, - dugotrajna upotreba antibiotika u lečenju HT, - bol u grlu, - otežano gutanje i disanje*, - prisustvo gustog sekreta u grlu i nosu*, - hrkanje, - kašalj, - asimetrične režnjevite tonzile uz hiperemiju nepčanih lukova, - zamućena i netransparentna bubna opna*.
<i>ekskluzioni kriterijumi</i>	
<ul style="list-style-type: none"> - akutna upala sluznice grla, - tekuća terapija antibioticima, - febrilna stanja, - imunodeficienta stanja. 	

*kriterijum za adenotomiju.

3.2.1. Mikrobiološka analiza

Izbor hranljivih podloga za izolaciju bakterija; postupak izolacije bakterija i metoda korišćena za identifikaciju izolata.

3.2.2. Hranljive podloge

Za izolaciju mikroorganizama iz tkiva tonzila korišćena je gotova krvna podloga (Torlak, Beograd, Srbija), čokoladni agar (Promedia, Srbija) i Tryptic Soya Agar (TSA) (Torlak, Beograd, Srbija). Tryptic Soya Broth (TSB) (Torlak, Beograd, Srbija) hranljivi medijum (Tabela 2) korišćen je za ispitivanje antimikrobne aktivnosti, dok je TSB sa 2% glukoze, medijum korišćen za ispitivanje antibiofilm aktivnosti. TSA, TSB i TSB sa 2% glukoze su pripremljeni rastvaranjem praha podloge u zagrejanj destilovanoj vodi, nakon čega su hranljivi medijumi sterilisani u autoklavu.

Tabela 2. Sastav podloga

Krvni agar		Čokoladni agar	
Triptozni pepton Torlak	20,0 g	Enzimski hidrolizat kazeina	7,5 g
Ekstrakt kvasca	3,0 g	Ekstrakt mesa	7,5 g
Natrijum-hlorid	5,0 g	Natrijum hlorid	5 g
Agar	15,0 g	Dikalijum fosfat	4 g
Sterilna defibrinisana krv	5-7 %	Kukuruzni skrob	1 g
Destilovana voda	1 L	Monokalijum fosfat	1g
pH=7,2±0,2		Agar	12 g
Tryptic Soya Agar*/Broth (TSA/TSB)		Hemoglobin	10 g
Kazein	15,0 g	Vitamin b12	1 mg
Pepton	5,0 g	NAD (Koenzim I)	2,5 mg
Agar*	15,0 g	L-glutamin	100 mg
Natrijum-hlorid	5,0 g	Kokarboksilaza	0,1 mg
Destilovana voda	1 L	Adenin sulfat	10 mg
pH=7,3±0, 2		Gvožđe nitrat	0,2 mg
		Guanin hidrohlorid	0,3 mg
		Tiamin hidrohlorid	0,03 mg
		p-Aminobenzoeva kiselina (PABA)	0,130 mg
		L-Cistein hidrohlorid	259 mg
		L-Cistin	11 mg
		Dekstroza	1g
		Bacitracin	50,000 U
		pH=7,3±0,2	

*koristi se samo za pripremu TSA hranljive podloge

3.2.3. Obrada tkiva i izolacija bakterija

Nakon tonzilektomije/adenektomije tkiva su transportovana u sterilnim uslovima (sterilne petri čaše ispunjene sterilnim fiziološkim rastvorom) do IBISS-a. U sterilnim uslovima, tkivo je hiruški resecirano i isečci su zasejavani na hranljive podloge (krvni i čokoladni agar). Petri šolje sa zasejanim tkivom inkubirane su na 37 °C a razvoj kolonija je posmatran nakon 24 i 48 sati. Kolonije su presejavane na krvni agar i TSA podlogu u cilju dobijanja čistih kultura. Zasejane kolonije inkubirane su 24 h na 37 °C i dobijene čiste kulture su korišćene za identifikaciju do nivoa vrste.

3.2.4. Identifikacija bakterija korišćenjem MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight) masene spektrometrije

Identifikacija izolovanih sojeva izvršena je primenom aparata Vitek MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francuska) prema metodi Dubois i dr., (2012). Princip rada MALDI masene spektrometrije podrazumeva 3 koraka: pripremu uzoraka, desorpciju uzorka i matrice pomoću lasera i protonizaciju/jonizaciju uzorka. Deo pojedinačne kolonije, nanesen je sterilnim štapićem na metalnu pločicu na koju je dodat 1 μ L matriksa – α - cijano-4-hidroksicimetna kiselina (VITEK MS - CHCA, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francuska). Nakon sušenja (1 – 2 minuta) na sobnoj temperaturi, uzorak i matriks kristališu na pločici i zatim se pločica stavlja u aparat i dobijeni podaci se analiziraju primenom VITEK MS baze podataka. Razdvajanjem proteina prema odnosu mase i naboja tokom dejonizacije dobijen je profil proteina (mass spectral fingerprinting). Pikovi dobijenog profila za određeni izolat poređeni su sa poznatim profilima proteina dostupnim u VITEK bazi podataka na osnovu kojih je izvršena precizna identifikacija mikroorganizma. Za VITEK MS pouzdana identifikacija je postignuta ukoliko je sličnost u profilima >90 %. Rezultati između 60 % i 80 % smatrani su rezultatima sa niskom pouzdanošću i mogu se upotrebiti jedino za identifikaciju roda, dok su rezultati < 60 % smatrani nepouzdanom identifikacijom. MALDI TOF analiza je rađena na VITEK MS modelu koji je opremljen sa pulsni (50 Hz) azotnim laserom koji emituje svetlost na 337 nm. Analizator TOF je bio podešen da radi u reflektornom režimu.

3.2.5. Histološka analiza

Iz hirurški reseciranog materijala za histološku analizu su uzimani isečci debljine 5 do 10 mm. Uzorci su fiksirani u 10% pufersanom formalinu tokom 12 časova, dehidrirani u alkoholima rastuće koncentracije, prosvetljeni u hloroformu, prožeti i ukalupljeni u parafin i sečeni na kliznom mikrotomu (Leica CM1850, Germany) na serijske preseke debljine od 4 μ m, zatim deparafinisani i bojani hematoksilin-eozin (H&E) i PAS (Periodic acid-Schiff) metodama (Bancroft i dr., 2013). Histološki preparati su posmatrani pod mikroskopom (Olympus BX50) kako bi se uočile, analizirale i opisale promene tkiva nastale usled upalnog procesa.

3.3. Sakupljanje makromiceta

Za hemijsku karakterizaciju i analizu biološke aktivnosti ekstrakata makromiceta sakupljana su plodonosna tela sa različitih lokaliteta u Republici Srbiji. Identifikacije makromiceta su vršene na osnovu makroskopskih i mikroskopskih karakteristika plodonosnih tela, poređenjem sa dostupnim ključevima za identifikaciju gljiva (Phillips, 2006; Hadžić i Vukojević, 2008). Sveža plodonosna tela su, nakon identifikacije, zamrznuta na -20 °C, liofilizovana (LH Leybold, Lyovac GT2, Frankendorf, Switzerland), samlevena do finog praha i do analize skladištena na 4 °C.

3.3.1. Priprema ekstrakata

Za identifikaciju fenolnih jedinjenja i za ispitivanje biološke aktivnosti odabranih makromiceta korišćeni su metanolni (ME) i etanolni (EE) ekstrakti plodonosnih tela izabranih vrsta. Ekstrakti su pripremljeni prema opisanim procedurama Cheng i dr. (2008) i Vaz i dr. (2010).

3.3.1.1. Priprema metanolnog ekstrakta

Usitnjeno plodonosno telo (~ 10 g praha) homogenizovano je sa 240 mL metanola preko noći na -20 °C (Vaz i dr., 2010). Dobijeni ekstrakt je zatim sonifikovan 15 minuta u ultrazvučnom kupatilu (Bandelin sonorex, Berlin, Germany); centrifugiran 10 minuta na 4000 g (Heraeus biofuge stratos centrifuge, Thermo electron corporation, MA, USA) na temperaturi od 4 °C i filtriran kroz Whatman No. 4 filter papir. Talog je reekstrahovan u ultrazvučnom kupatilu tri puta sa po 100 mL metanola. Dobijeni supernatant je uparen do suvog ostatka na 40 °C korišćenjem rotacionog

vakuum uparivača (Büchi R-210, Flawil, Switzerland). Uzorak je skladišten na 4 °C do dalje upotrebe.

3.3.1.2. Priprema etanolnog ekstrakta

Usitnjeno plodonošno telo (~ 10 g praha) je homogenizovano sa 340 mL destilovane vode tokom 2 h na magnetnoj mešalici (Velp Scientifica, SRL, Italy) (Cheng i dr., 2008). Ekstrakt je zatim filtriran kroz papir Whatman No. 4, a talog reekstrahovan još dva puta sa ukupno 340 mL destilovane vode. Dobijeni supernatant je zamrznut na -20 °C i liofilizovan (LH Leybold, Lyovac GT2, Frankendorf, Switzerland). Liofilizatu je dodato 70 mL 95% etanola radi prekonoćne precipitacije polisaharida na 4 °C. Ekstrahovani polisaharidi su sakupljeni centrifugiranjem na 3100 g (Heraeus biofuge stratos centrifuge, Thermo Electron Corporation, MA, USA) tokom 40 minuta na temperaturi 4 °C, nakon čega je uzorak ponovo filtriran kroz Whatman No. 4 filter papir. Dobijeni supernatant predstavlja etanolni ekstrakt, koji je dalje uparen na 40 °C do suvog ostatka korišćenjem rotacionog vakuuma uparivača (Büchi R-210, Flawil, Switzerland). Uzorak je skladišten na 4 °C do dalje upotrebe.

3.4. Hemijska analiza bazidiokarpa testiranih makromiceta

Za ove analize su korišćene metode za određivanje nutritivne vrednosti, kao i metode za analizu šećera, tokoferola, organskih kiselina, fenolnih jedinjenja i masnih kiselina iz plodonosnih tela testiranih makromiceta.

3.4.1. Određivanje nutritivne vrednosti

Prema procedurama koje preporučuje Asocijacija Analitičkih Hemičara (Association of Official Analytical Chemists – AOAC), određen je ukupni sadržaj: masti, proteina, ugljenih hidrata, pepela, kao i energetska vrednost plodonosnih tela testiranih makromiceta (Horwitz i Latimer, 2016).

Za potrebe određivanja ukupnog sadržaja masti od bazidiokarpa pripremljen je petroleumski ekstrakt u Soksletovom aparatu. Prethodno pripremljeni prah uzorka makromicete (2 g) uronjen je u petroleumski ekstrakt 7 sati na temperaturi 1200 °C, nakon čega je rastvarač uklonjen vakuom uparivačem (Büchi R210, Flawil, Switzerland). Dobijeni tečni sadržaj je držan u sušnici 24 – 48 sati, dok tečnost ne ispari. Sadržaj masti je izmeren u suvom ostatku.

Metodom po Kjeldalu određen je ukupni sadržaj proteina u bazidiokarpu. Metoda uključuje digestiju organske materije koja podrazumeva mešanje praha gljive (0,50 g) sa katalizirajućim agensom $K_2SO_4/CuSO_4$ (14,15 g) i 99% H_2SO_4 (15 mL) u balonu po Kjeldalu, destilaciju amonijakom i titraciju sumpornom kiselinom. Smeša je inkubirana u digestoru na 406 °C tokom 70 minuta do potpunog razlaganja organskih materija. Destilacija i titracija su obavljene u automatskom destilatoru (model Pro-Nitro M Kjeldahl Steam Distillation System, Barcelona, Spain).

Odmereni uzorak bazidiokarpa (0,50 g praha) je u porcelanskoj posudi izložen temperaturi od 550 °C u pećnici do potpunog sagorevanja (SNOL 13/1100 LHM01, Snol term, Utena, Lithuania). Nakon postizanja sobne temperature, ponovo je izmeren sadržaj posude. Sadržaj pepela je izračunat oduzimanjem dobijene vrednosti od početne izmerene vrednosti praha.

Vrednost ukupnih ugljenih hidrata dobijena je korišćenjem obrasca prema Manzi i dr. (2004):

Ukupni sadržaj ugljenih hidrata = 100 – (sadržaj proteina + sadržaj masti + sadržaj pepela)

Dobijene vrednosti masti, proteina, pepela i ugljenih hidrata sadržanih u bazidiokarpu testiranih makromiceta izražene su u g/100 g suve mase bazidiokarpa.

Energetska vrednost (E) makromiceta izračunata je prema obrascu:

$$E \text{ (kcal)} = 4 \times (\text{g proteina} + \text{g ugljenih hidrata}) + 9 \times (\text{g masti})$$

Dobijene vrednosti su izražene u kcal/100 g suve mase bazidiokarpa.

3.4.2. Priprema uzoraka i HPLC analiza šećera

Sadržaj šećera je određen metodom tečne hromatografije pod visokim pritiskom (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC, Knauer, Smartlyne system 1000; Berlin, Germany) uz detektor refrakcionog indeksa (Refraction Index-RI, Knauer, Smartlyne 2300; Berlin, Germany).

Prah bazidiokarpa makromicete (~ 1 g) je tretiran sa 40 mL 80% etanola na 80 °C tokom 90 minuta, a zatim je centrifugiran 10 minuta na 15,000 g (Centurion K24OR refrigerated centrifuge, West Sussex, UK). Supernatant je koncentrovan na 60 °C pod smanjenim pritiskom i odmašćen ispiranjem tri puta sa po 10 mL etil-etra sa ciljem razdvajanja faza. Gornja faza je koncentrovana na 40 °C do suvog ostatka koji je rastvoren u vodi (5 mL), filtriran kroz jednokratne filtere 0,22 µm LC (Liquid Chromatography) i analiziran putem HPLC (Barros i dr., 2008a). Kao interni standard korišćena je rafinoza (IS, 5 mg/mL) (Barros i dr., 2008a).

HPLC oprema za analizu je sadržala integrisani sistem sa Smartline pumpom 1000, sistem za degasiranje (Smartline manager 5000), detektor refrakcionog indeksa (2300 RI detektor; Knauer, Germany) i sistem za automatsko uzorkovanje (autosampler AS-2057; Jasco, Japan). Dobijeni podaci su analizirani programom Clarity 2.4 Software (DataApex). Hromatografsko razdvajanje postignuto je uz izokratsku eluciju kolonom Eurospher 100-5 NH2 (4,6 mm × 250 mm × 5 mm, Knauer) na 35 °C (7971R Grace oven). Mobilna faza je sadržala smešu acetonnitrila i dejonizovane vode u odnosu 7:3 (v/v), zapremina ubrizganog uzorka je iznosila 20 µL, a protok 1 mL/min. Šećeri su identifikovani poređenjem retencionih vremena pikova (retention time – RT) uzoraka sa standardima, kvantifikovani metodom unutrašnjeg standarda, a dobijene vrednosti su izražene u g/100 g suve mase bazidiokarpa.

3.4.3. Priprema uzoraka i HPLC analiza tokoferola

Prema metodi Heleno i dr. (2010) izvršena je identifikacija i određen sadržaj 4 izoforme tokoferola (α-, β-, γ- i δ-tokoferol). Za ekstrakciju tokoferola, korišćeno je 0,5 g praha homogenizovanih plodonosnih tela sa dodatkom 100 µL rastvora butil-hidroksitoluena (10 mg/mL BHT), 250 µL internog standarda δ-tokoferola (rastvoren u heksanu, 50 µg/mL), 4 mL metanola, 4 mL *n*-heksana i 2 mL zasićenog rastvora NaCl, pre same analize. Rastvor BHT je dodat radi sprečavanja oksidacije tokoferola, a interni standard radi unapređenja preciznosti metode. Nakon dodavanja svakog rastvora uzorak je vorteksovan 60 s radi homogenizacije. Smeša je ponovo homogenizovana (60 s) i centrifugirana (5 min, 600 rpm). Nakon toga supernatant je pipetiranjem odvojen u odgovarajući sud. Postupak je ponovljen još 2 puta. Uzorku je dodat dehidriran anhidrovani natrijum-sulfat, a zatim je supernatant uparen u struji azota. Uparenom uzorku dodat je 1 mL heksana, zatim filtriran kroz 0,22 µm LC filter (Liquid Chromatography), prebačen u tamni injekcioni špric, ubrizgan i analiziran na HPLC uređaju.

HPLC oprema za analizu tokoferola sastojala se od integrisanog sistema sa Smartline pumpom 1000 (Knauer, Nemačka), sistema za degasiranje (Smartline manager 5000), sistema za automatsko uzorkovanje (autosampler) i UV detektora na 295 nm (Knauer, Nemačka), povezanih u nizu sa FP-2020 fluorescentnim detektorom (Jasco, Japan). Detektor je programiran za ekscitaciju na 290 nm i emisiju na 330 nm. Dobijeni podaci su analizirani korišćenjem programa Clarity 2.4 Software (DataApex). Hromatografsko razdvajanje je postignuto sa Poliamid II (250 × 4,6 mm)

kolonom normalne faze (YMC Waters, Japan) na 30 °C (7971 R Grace oven). Mobilnu fazu je činila smeša *n*-heksana i etil-acetata (70:30, v/v) pri protoku 1 mL/min, dok je ubrizgana zapremina iznosila 20 µL. Jedinjenja su identifikovana poređenjem RT sa standardima, a kvantifikacija uzorka je zasnovana na odgovoru signala fluorescencije. Kvantitativni sadržaj tokoferola u uzorcima je izražen u µg/100 g suve mase bazidiokarpa (Heleno i dr., 2010).

3.4.4. Priprema uzoraka i HPLC analiza organskih kiselina

Identifikacija organskih kiselina je urađena ultra-brzom tečnom hromatografijom pomoću detektora niza fotodiode (Ultrafast Liquid Chromatography – Photodiode Array UFLC–PDA, Shimadzu 20 A serije; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Organske kiseline su ekstrahovane iz uzorka makromiceta (~ 2 g praha) sa 25 mL metafosfatne kiseline (4,5%) na magnetnoj mešalici tokom 25 minuta. Uzorak je filtriran kroz filter papir Whatman No. 4, a neposredno pre analize, filtriran je kroz 0,2 µm najlonski filter (Barros i dr., 2013).

Razdvajanje je postignuto na 35 °C na C₁₈ reverzno faznoj koloni (5 µm x 250 mm × 4,6 mm i.d.), dok je rastvaranje omogućeno prisustvom sumporne kiseline (H₂SO₄; 3,6 mM). Protok mobilne faze je iznosio 0,8 mL/min. Za detekciju je korišćen fotodiodni detektor na 215 nm. Sadržaj organskih kiselina je određen poređenjem površine pikova zabeleženih na 215 nm i kalibracionih krivih koje su dobijene za komercijalne standarde. Kvantitativni sadržaj organskih kiselina izražen je u g/100 g suve mase plodonosnog tela makromicete.

3.4.5. Priprema uzoraka i HPLC analiza fenolnih kiselina

Za identifikaciju i određivanje sadržaja fenola prah plodonosnog tela (~ 1,5 g) tretiran je rastvorom metanola i vode (80:20, v/v; 30 mL) i etanola i vode (80:20, v/v; 30 mL), sonifikovan 15 min i filtriran kroz filter papir Whatman No. 4. Precipitat je reekstrahovan još dva puta smešom metanola i vode (30 mL) a zatim je kombinovani supernatant uparen (Büchi R-210) na 40 °C kako bi se uklonio metanol. Vodena faza je pomešana sa *n*-heksanom a zatim izložena tečno-tečnoj ekstrakciji sa dietil-etrom (330 mL) i etil acetatom (3 x 30 mL). Organske faze su uparene na 40 °C do suvog ostatka (Büchi R-210) a zatim rastvorene u smeši vode i metanola (80:20, v/v; 1 mL), filtrirane kroz 0,22 µm LC filter disk za jednokratnu upotrebu i analizirane na HPLC uređaju (Fernandes i dr., 2014).

Hemijska analiza fenolnih kiselina je izvedena ultra-brzom tečnom hromatografijom pomoću detektora niza dioda (Ultrafast Liquid Chromatography – Diode Array Detector UFLC–DAD, Shimadzu 20 A serije; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Za detekciju je korišćen diodni detektor, na 280 i 370 nm i maseni spektrometar Finnigan TM LCQ MS (Thermo-quest, San Jose, CA, USA) opremljen ESI jonskom probom. Sadržaj fenolnih jedinjenja je određen poređenjem UV spektra i retencionih vremena uzoraka zabeleženih na 280 i 370 nm i kalibracionih krivih koje su dobijene za komercijalne standarde. Kalibraciona kriva je dobijena korišćenjem različitih koncentracija standarda protokatehinske kiseline, *p*-hidroksibenzoeve kiseline, *p*-kumarne kiseline, galne kiseline i cinaminske kiseline. Vrednosti su izražene u µg/g ekstrakta bazidiokarpa.

3.4.6. Priprema uzoraka i HPLC analiza masnih kiselina

Metodom gasno-tečne hromatografije sa plameno jonizujućim detektorom (Gas Chromatography/Flame Ionization Detector, GC/FID) nakon ekstrakcije i reakcije transesterifikacije određena je identifikacija i udeo pojedinačnih masnih kiselina prema metodi (Barros i dr., 2008a). Uzorci homogenizovanih plodonosnih tela suspendovani u 5 mL smeše metanol:sumporna kiselina:toluen = 2:1:1 (v:v) i inkubirani na 50 °C u vodenom kupatilu tokom noći (12 sati). Nakon toga je dodato 3 mL dejonizovane vode i 3 mL dietil-etra uz vorteksovanje nakon svakog koraka, u cilju razdvajanja faza. Gornji faza koja sadrži metil-estre masnih kiselina (Fatty Acid Methyl Esters

– FAME) provedena kroz mikro-kolonu anhidrovanog natrijum sulfata kako bi se eliminisala voda. Uzorak je filtriran kroz 0,2 µm najlonski filter Milipore a potom ubrizgan u kolonu.

Profil masnih kiselina je analiziran putem gasnog hromatografa (DANI 1000) opremljenog sa split/splitless injektorom, plameno jonizujućim detektorom (FID) i kolonom Macherey-Nagel (30 mm × 0,32 mm ID × 0,25 µm df). Inicijalna temperatura kolone je iznosila 50 °C tokom 2 minuta, nakon čega je temperatura povećana na 240 °C, tempom od 10 °C/min i na toj vrednosti zadržana 11 minuta. Protok gasa nosača (vodonika) je iznosio 4,0 mL/min na 50 °C (0,61 bar). Split ubrizgavanje (1:40) je izvedeno na 250 °C a zapremina ubrizganog uzorka u GC je iznosila 1 µL. Profil masnih kiselina je identifikovan poređenjem relativnih retencionih vremena uzoraka sa pikovima standarda FAME, rezultati su analizirani korišćenjem softvera CSW 1,7 (Data Apex 1,7, Prag, Češka) i izraženi kao relativni udeo (%) svake masne kiseline.

3.5. Hemijska analiza etarskih ulja

Za hemijsku karakterizaciju i analizu biološke aktivnosti, a na osnovu pregleda literature, izabrana su dva komercijalna etarska ulja – divlji origano (*Origanum minutiflorum* O.Schwarz & P.H.Davis, Probotanik, Srbija) i korijander (*Coriandrum sativum* L., Probotanik, Srbija).

Za utvrđivanje hemijskog sastava komercijalnih etarskih ulja korišćena je metoda gasne hromatografije. Uzorak je rastvaran u 10 µL 75% etanola i ubrzan u split režim (1:30). Hemijski profil uzoraka analiziran je putem gasnog hromatografa (Agilent Technologies 7890A, Santa Klara, SAD) sa split/splitless injektorom povezanim sa HP-5 kolonom (30 m • 0,32 mm, debljine filma 0,25 µm) i plameno-jonizujućim detektorom (FID). Protok gasa nosača (vodonika) je iznosio 1 mL/min na 210 °C. Temperatura injektora iznosila je 250 °C, detektora 280 °C, dok je temperatura kolone menjana u linearnom režimu temperaturskog programiranja od 40 – 260 °C i to 4 °C po minutu. Sastav ulja izračunat je na osnovu površine dobijenih pikova i izražen je u procentima.

Metoda gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC/MS) korišćena je za identifikaciju pojedinačnih komponenti ulja. Identifikacija je određena na HP G 1800C Series II GCD analitičkom sistemu, sa HP-5MS kolonom (30 m • 0,25 mm • 0,25 µm). Protok gasa nosača (helijum) je iznosio 1 mL/min na 260 °C. Maseni spektri snimani su u EI režimu (70 eV) u opsegu m/z 40-400. Pojedinačne komponente su identifikovane masenospektrometrijski i preko Kovačevih indeksa uz korišćenje različitih baza masenih spektara (NIST/Wiley), poređenjem sa eksperimentalno određenim indeksima (AMDIS) i raspoloživim literaturnim podacima (Adams, 2009).

3.6. *In vitro* ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakta makromiceta i etarskih ulja

Za testiranje biološke aktivnosti ekstrakata gljiva i etarskih ulja u *in vitro* uslovima korišćene su sledeće metode:

3.6.1. Antibakterijska aktivnost – mikrodiluciona metoda

Testiranje antibakterijske aktivnosti odabranih ekstrakata makromiceta i etarskih ulja rađeno je mikrodilucionom metodom (Soković 2001; EUCAST, 2003). Određivane su minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK). Testirani sojevi inkubirani su u 2 mL TSB medijuma na 37 °C, 24 h. Finalne koncentracije bakterijskih suspenzija (1×10^6 ćelija/polju mikrotitar ploče) su standardizovane primenom denzitometra DEN1B (Biosan, Litvanija). Inokulumi su čuvani na hladnom (+ 4 °C) do upotrebe. MIK i MBK određivane su serijskim razblaženjima ekstrakata makromiceta/etarskih ulja u TSB medijumu u mikrotitar pločama sa ravnim dnom, 96 sistem (Spektar, Čačak, Srbija). Ploče su inkubirane na 37 °C, 24 h. Inokulisani medijum bez dodatog ekstrakta/etarskog ulja korišćen je kao negativna kontrola. Nakon inkubacije, rezultati su potvrđeni dodavanjem 40 µl indikatorske crvene boje *p*-jodonitrotetrazolijuma (0,2

mg/mL, INT, I 8377– Sigma, SAD) po bunarčiću i nakon 30 min ponovne inkubacije na 37 °C očitani su rezultati. Najniža koncentracija na kojoj nije bilo vidljivog rasta definisana je kao MIK. Određivanje MBK-a izvedeno je reinokulacijom 10 µL sadržaja iz bunarčića odgovarajuće koncentracije gde nije zabeležen rast bakterija u 100 µL sterilnog medijuma u mikrotitracionim pločama koje su reinkubirane 24 h na 37 °C. Komercijalni antibiotici amoksicilin sa klavulonskom kiselinom (Hemofarm, Vršac, Srbija) i cefiksim (Alkaloid, Skoplje, Severna Makedonija), u koncentracijama 1 mg/mL korišćeni su kao pozitivne kontrole.

3.6.2. Inhibiranje formiranja biofilma *Staphylococcus aureus*

Uticaj odabranih ekstrakata i etarskih ulja na proces formiranja biofilma kod vrste *S. aureus* ispitan je modifikovanom mikrodilucionom metodom prema metodi Stepanović i dr. 2007, Inokulum *S. aureus* (1×10^6 ćelija/polju mikrotitar ploče) je standardizovan primenom denzitometra DEN1B (Biosan, Litvanija). Biofilm je formiran u mikrotitar pločama sa adhezivnim dnom (Sarstedt, SAD) dodavanjem 10 µl inokuluma *S. aureus* i 90 µl prethodno određenih subinhibitornih (subMIK) i MIK koncentracija (Odeljak 3.6.1.) ispitivanih ekstrakata gljiva i etarskih ulja u TSB medijumu obogaćenom sa 2% glukozom. Mikrotitar ploče su inkubirane na 37 °C, 24 h. Nakon inkubacije sadržaj ploče je odstranjen pipetiranjem, ploča je isprana 3x fiziološkim rastvorom i zatim dodato 100 µL metanola (Carlo Erba, Španija) zbog fiksacije adheriranih ćelija. Nakon sušenja ploče, u svaki bunarčić je dodata kristal violet boja (100 µl, 0,1%) (Bio-Merieux, Francuska) i nakon 30 min inkubacije na 37 °C ploča je isprana vodom i osušena na vazduhu. U svaki bunarčić je dodato po 100 µl 96% etanola (Zorka, Šabac, Srbija) zbog resuspendovanja boje i sadržaj je homogenizovan. Absorbanca (optička gustina) je čitana na talasnoj dužini od 570 nm na automatizovanom Elisa čitaču (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific). Procenat inhibicije formiranja biofilma računat je po sledećoj formuli:

$$[(OG_{\text{kontrola}} - OG_{\text{uzorak}}) / OG_{\text{kontrola}}] \times 100.$$

OG-optička gustina

3.6.3. Inhibiranje formiranog biofilma *Staphylococcus aureus*

Inokulum *S. aureus* je inkubiran u mikrotitar ploči sa adhezivnim dnom 24 h, na 37 °C. Nakon inkubacije, ploča je isprana 3x fiziološkim rastvorom i adherirane ćelije su tretirane MBK ekstrakta/etarskih ulja u trajanju od 30 s. Nakon ispiranja, dodatka metanola, sušenja, bojenja kristal violet bojom i dodatka etanola (Odeljak 3.6.2.) absorbanca je očitana na talasnoj dužini od 570 nm na automatizovanom Elisa čitaču (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific). Procenat inhibicije formiranog biofilma računat je po sledećoj formuli:

$$[(OG_{\text{kontrola}} - OG_{\text{uzorak}}) / OG_{\text{kontrola}}] \times 100.$$

3.6.4. Ispitivanja međusobne interakcije etarskih ulja metodom šahovske table (eng. “checkerboard assay”)

Za ispitivanje sinergističkog delovanja mešavine etarskih ulja i antibiotika na rast *S. aureus* u *in vitro* uslovima korišćena je dvo-agensna mikrodiluciona metoda (twoagent broth microdilution checkerboard assay) (Jacqueline i dr., 2005). Finalna koncentracija *S. aureus* inokuluma bila je $1,0 \times 10^6$ ćelija/mL. Dobijene MIK (odeljak 3.6.1.) korišćene su kao početne za dalja ispitivanja u mikrotitracionim pločama. Serija razblaženja smeše dva agensa je kreirana u mikrotitar ploči, 96 sistem pri čemu je u samoj ploči pravljen vertikalni gradijent koncentracije prve supstance, a naknadno su unesena odgovarajuća razblaženja druge supstance po horizontalnoj liniji ploče. Razblaženja su pravljena u TSB medijumu u opsegu vrednosti od $1/128 \times$ MIK do MIK. Kao kontrola korišćen je netretiran inokulum. U bunarčiću je dodato po 10 µL bakterijske suspenzije *S. aureus*. Ukupna zapremina po bunarčiću je iznosila 100 µL. Inkubacija je vršena na 37 °C, 24 h.

Nakon inkubacije dodato je 40 µl indikatorske crvene boje *p*-jodonitrotetrazolijuma (0,2 mg/mL, INT, I 8377 – Sigma, SAD) po bunarčiću i ploča je ponovo inkubirana 30 min na 37 °C. Zabeležene su kombinacije etarskih ulja i antibiotika koje ne dovode do promene boje i računane su FIKI vrednosti po sledećoj formuli:

$$\text{FIKI} = (\text{FIK1}^\circ / \text{MIK1}^\circ) + (\text{FIK2}^\circ / \text{MIK2}^\circ)$$

FIKI – Frakcioni Inhibitorni Koncentracioni Indeks za dva testirana agensa

FIK1° – koncentracija prve supstance u kombinaciji kojom je dostignuta MIK vrednost;

MIK1° – minimalna inhibitorna koncentracija prve supstance primenjene individualno;

FIK2° – koncentracija druge supstance u kombinaciji kojom je dostignuta MIK vrednost;

MIK2° – minimalna inhibitorna koncentracija druge supstance primenjene individualno.

Na osnovu dobijene vrednosti FIKI, određena je vrsta interakcije i vrednosti FIKI su interpretirane na sledeći način: sinergizam (FIKI < 0,5), aditivnost (0,5 < FIKI ≤ 1), indiferentnost (1 < FIKI ≤ 4) i antagonizam (FIKI > 4) prema metodi Karlowsky i dr., 2006.

3.6.5. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakta makromiceta i etarskih ulja

Antioksidativna aktivnost ekstrakata utvrđena je sledećim *in vitro* metodama:

3.6.5.1. Test reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (Thiobarbituric acid reactive substances – TBARS)

Detekcija lipidne peroksidacije pomoću TBARS metode izvedena je prema metodi Reis i dr. (2012). Za potrebe eksperimenta korišćen je svinjski mozak (*Sus scrofa*) dobijen od sveže žrtvovanih životinja koji je homogenizovan u hladnom puferu Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) radi dobijanja homogenata u odnosu 1:2 w/v. Homogenat je centrifugiran na 3000 g, 10 minuta, zatim su alikvoti supernatanta (100 µL) inkubirani 60 minuta sa 200 µL uzorka ekstrakta/etarskog ulja različite koncentracije u prisustvu askorbinske kiseline (0,1 mM; 100 µL) i FeSO₄ (10 mM; 100 µL) na 37 °C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 500 µL trihlorsirćetne kiseline (28% w/v, 380 µL) a potom i tiobarbiturne kiseline (2% TBA, 0,38 mL). Nakon toga, smeša je zagrevana 20 minuta na 80 °C a zatim centrifugirana 5 minuta na 14000 rpm kako bi se odstranili precipitirani proteini. Supernatant je sadržao kompleks MDA-TBA roze boje sa maksimumom apsorpcije na 532 nm. Rezultati su izračunati prema sledećoj formuli i izraženi u procentima:

$$(\%) = [(\text{OG}_{\text{kontrola}} - \text{OG}_{\text{uzorka}}) / \text{OG}_{\text{kontrola}}] \times 100\%$$

OG_{kontrola} – Apsorbanca kontrole

OG_{uzorka} – Apsorbanca rastvora uzorka

Koncentracija ekstrakta/etarskog ulja (mg/mL) koja je obezbedila 50% antioksidativne aktivnosti (EC₅₀) je određena sa grafika antioksidativne aktivnosti.

3.6.5.2. Test inhibicije oksidativne hemolize (Oxidative haemolysis inhibition assay – OxHLIA)

Za potrebe eksperimenta korišćena je sveža ovčja krv, prethodno centrifugirana na 1000 g (5 min, 10 °C). Izdvojeni eritrociti isprani su prvo rastvorom NaCl (150 mM) a zatim još tri puta PBS rastvorom (pH 7,4). Pelet eritrocita je resuspendovan u 2,8% PBS-u. U mikrotitar ploču sa ravnim dnom, 48 sistem (Sarstedt, SAD), dodato je 400 µL ekstrakta/etarskog ulja rastvorenog u vodi i urađena su serijska razblaženja, zatim je dodato i 200 µL rastvora eritrocita u svaki bunarčić. Kao negativna kontrola je korišćen rastvor eritrocita pomešan sa PBS-om i rastvor eritrocita pomešan sa vodom a Trolox je korišćen kao pozitivna kontrola. Nakon inkubacije 10 min, na 37 °C, dodato je 200 µL 2,2'-azobis-2-metil-propanimidamid dihidrohlorid (AAPH, 160 mM) i ploča je reinkubirana

10 min na 37 °C. Optička gustina je merena na 690 nm na svakih 10 min tokom 1 h (Takebayashi i dr., 2012).

Procenat populacije eritrocita koja je ostala intaktna (P) izračunat je na sledeći način:

$$P (\%) = (S_t - PH_0 / S_0 - PH_0) \times 100$$

gde S_t predstavlja optičku gustinu uzorka za vreme t (10, 20, 30, 40, 50, 60 min), a S_0 predstavlja optičku gustinu uzorka u nultom minutu. PH_0 je optička gustina potpune hemolize u nultom minutu.

Rezultati su izraženi kao odloženo vreme hemolize (Δt) koje je izračunato na sledeći način:

$$\Delta t (\text{min}) = Ht_{50} (\text{uzorak}) - Ht_{50} (\text{kontrola})$$

gde Ht_{50} predstavlja 50% hemolitičkog vremena (min) koje je grafički dobijeno iz krive hemolize za svaku koncentraciju uzorka.

Vrednosti Δt zatim su povezane s različitim koncentracijama uzoraka (Takebayashi i dr., 2012) i iz dobijene korelacije izračunata je inhibitorna koncentracija (IC_{50} vrednost, $\mu\text{g/mL}$) koja može odložiti vreme hemolize Δt za 10, 30 i 60 min.

3.6.6. Ispitivanje citotoksične aktivnosti ekstrakta makromiceta i etarskih ulja

Za testiranje citotoksične aktivnosti ekstrakata gljiva i etarskih ulja, prema metodi Calhelha i dr. (2014), korišćena je maligna ćelijska linija NCI-H460 (karcinom nemalih ćelija pluća) i ćelijska kultura koja je pripremljena od ćelija jetre svinje i dizajnirana je kao PLP2 (primarne ćelije jetre svinje, Porcine Liver Primary cells). Ćelije NCI-H460 su gajene na 37 °C u CO_2 inkubatoru (5% CO_2) u hranljivoj podlozi RPMI – Roswell Park Memorial Institute medium (HyClone Logan, USA) uz dodatak 10% fetalnog govedeg seruma (FBS – Fetal Bovine Serum) i 2 mM glutamina. Ćelijska linija zasejana je pri gustini $7,5 \times 10^3$ ćelija po bunarčiću u pločama sa ravnim adhezivnim dnom (96 bunarčića) koje su inkubirane 24 h na 37 °C. Nakon inkubacije, adherirane ćelije tretirane su rastvorima ekstrakata makromiceta/etarskih ulja tokom 48 h, kako bi se ispitao njihov citotoksični efekat. Nakon 48 h, adherentne ćelije su fiksirane dodavanjem hladne 10% trihlorsirćetne kiseline (TCA, 100 μL), a zatim ponovo inkubirane 1h na 37 °C, isprane su destilovanom vodom i osušene na vazduhu. Rastvor sulforodamina B (0,1% u 1% sirćetnoj kiselini, 100 μL) dodat je svakoj ploči koja je zatim inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi. Ploče su isprane 1% sirćetnom kiselinom kako bi nevezani sulforodamin B bio uklonjen. Ploče su osušene na vazduhu dok je vezani sulforodamin rastvoren dodatkom 10 mM Trisa (200 μL , pH 7,4). Apsorbanca sadržaja je izmerena na 540 nm na ELISA čitaču.

Tkivo jetre svinje je isprano u Hankovom balansiranom slanom rastvoru (Sigma Aldrich, Germany) koji je sadržao 100 U/mL penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomicina i podeljeno na $1 \times 1 \text{ mm}^3$ eksplante. Eksplantanti su prebačeni u 25 cm^2 posudu sa DMEM medijumom (Dulbecco's Modified Eagle Medium, ThermoFisher Scientific) obogaćenim sa: 10% fetalnim goveđim serumom (Sigma-Aldrich, Germany), 2 mM neesencijalnim aminokiselinama, 100 U/mL penicilinom, 100 mg/mL streptomycinom i inkubirani su na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO_2 uz menjanje medijuma i direktno praćenje rasta korišćenjem faznog kontrastnog mikroskopa na svaka 2 dana. Ćelije su subkultivisane i zasejane u ploče (96 bunarčića) u gustini od $1,0 \times 10^4$ ćelija/polju i kultivisane u DMEM medijumu sa 10% fetalnim goveđim serumom, 100 U/mL penicilinom i 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomicina (SigmaAldrich, Germany) koje su inkubirane 24 h na 37 °C. Za ispitivanje citotoksičnog efekta ekstrakata i ulja korišćen je Sulforodamin B esej, detaljno opisan u prethodnom pasusu. Elipticin je korišćen kao pozitivna kontrola. Rezultati su predstavljeni kao GI_{50} vrednosti (koncentracija jedinjenja koja inhibira rast 50% ćelija).

3.7. Statistička analiza

Eksperimenti su urađeni u tri ponavljanja a rezultati su izraženi kao srednja aritmetička vrednost \pm standardna greška merenja. Rezultati su analizirani korišćenjem jednofaktorske i dvofaktorske analize varijanse (One-way ANOVA i two-way ANOVA), Tukey's HSD testa sa $p < 0,05$ i Studentovog t-testa sa $p < 0,05$. Sve statističke analize su izvedene korišćenjem GraphPad Prism softvera.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Demografsko-epidemiološke i kliničke karakteristike operisanih pacijenata sa hroničnim tonzilitisom

U istraživanju je učestovalo 75 HT pacijenata, od toga 40 pacijenata ženskog pola (53,33%) i 35 (46,67%) pacijenata muškog pola (Tabela 3). Pacijenti su na osnovu starosti podeljeni u dve grupe. Prvu grupu su činili HT pacijenti stariji od 16 godina (Grupa I), dok su drugu grupu činili HT pacijenti mlađi od 16 godina (Grupa II). Pacijenti koji čine Grupu II su na osnovu tipa tonzilektomije podeljeni u posebne grupe. Naime, u grupu IIa svrstani su pacijenti kojima su hirurški odstranjene samo nepčane tonzile; grupi IIb pripadaju pacijenti kojima je pored nepčanih tonzila urađena i adenotomija i na kraju, u grupu IIc su svrstani pacijenti kod kojih je urađena jedino adenotomija.

Prvu grupu (Grupa I) operisanih pacijenata su činile pretežno osobe ženskog pola (60%), odnos polova je bio 1:1,5 (M:Ž), prosečnog uzrasta 28,13 godina (Tabela 3). Prosečan godišnji broj upala grla kod ove grupe je bio 4,33, dok su svi pacijenti u sklopu medikamentozne terapije za lečenje upala uzimali medikamente iz grupe beta laktamskih antibiotika i cefalosporina III generacije. Na osnovu anamnestičkih podataka, najčešći simptom kod svih pacijenata sa umereno jakim (56,66%) i izraženim tegobama (43,33%) bio je bol u grlu. Ostali simptomi koji su se manifestovali u većini slučajeva (> 50%) sa umereno jakim do izraženim tegobama, su bili: otežano gutanje (56,66%), prisustvo gustog sekreta u grlu (50%), i neprijatan zadah (66,66%). Analiza orofaringoskopskog statusa je pokazala da je 13 pacijenata zbog hiperemičnih, hipertrofičnih, kriптиčnih tonzila zahtevalo operaciju, dok je drugih 17 pacijenata kao indikaciju za operaciju, pored gorepomenutih simptoma imalo i asimetrične, neravne tonzile sa hiperemijom nepčanih lukova.

Drugu grupu (Grupa II) operisanih pacijenata su činile 23 osobe muškog pola (51,11%), i 22 osobe ženskog pola (48,89%) dok je odnos polova bio 1:1,05 (M:Ž), prosečnog uzrasta 5,56 godina. Grupu IIa je činilo 11 osoba muškog pola i 16 osoba ženskog pola; 4 pacijenta grupe IIb su bila muškog pola; dok je grupu IIc činilo 8 pacijenata muškog i 6 pacijenata ženskog pola (Tabela 3). Prosečna starost po grupama je bila sledeća: grupa IIa – 6,12 godina; grupa IIb – 5 godina i grupa IIc – 4,6 godina. Prosečan godišnji broj upala grla i ušiju grupe IIa je bio 3,29; IIb grupe 4,5; dok je prosečan broj upala ušiju grupe IIc bio 3,64. Svi pacijenti u sklopu medikamentozne terapije za lečenje upala uzimali su medikamente iz grupe beta laktamskih antibiotika i cefalosporina III generacije. Na osnovu podataka prikupljenih upitnikom, zastupljenost simptoma i njihova težina se razlikuju po grupama. Najčešći simptom u grupi IIa, bilo je otežano disanje, čak 15 pacijenata (55,55%) je izjavilo da ima teško podnošljive tegobe sa disanjem. Takođe, za još jedan simptom, prisustvo gustog sekreta u grlu, je nešto manje od polovine operisanih pacijenata (40,74%) reklo da im predstavlja problem. U grupi IIb, jedini simptom sa teško podnošljivim tegobama (75%) bilo je hrkanje. Otežano disanje, prisustvo gustog sekreta u nosu i hrkanje su simptomi koji su bili najzastupljeniji kod pacijenata grupe IIc. Analiza orofaringoskopskog statusa je pokazala da je 25 pacijenata (92,59%) grupe IIa i 4 (100%) pacijenata grupe IIb zbog hiperemičnih, hipertrofičnih, kriптиčnih tonzila zahtevalo operaciju. Dok je kod svih pacijenata u grupi IIb rađena i adenotomija, jer su uočene asimetrične režnjevite tonzile sa hiperemijom nepčanih lukova, uvećan adenoid, kao i zamućene i netransparentne bubne opne, što je sve indikacija za operaciju. U grupi IIc orofaringoskopski status je bio pozitivan kod svih pacijenata, dok je otoskopski status bio pozitivan kod 11 od ukupno 14 pacijenata (Tabela 3).

Tonzilitis je treća ORL infekcija po učestalosti u opštoj populaciji, posle rinofaringitisa i otitisa (Beatrix i dr., 2014). U Francuskoj se svake godine dijagnostifikuje oko 9 miliona slučajeva tonzilitisa, dok je taj broj u Španiji 4 miliona, a u Sjedinjenim Američkim Državama čak 40 miliona (Haidara i dr., 2019). Tonzilektomija je jedna od najčešće izvođenih hirurških procedura u okviru pedijatrijske otorinolaringologije. Tako, samo u Velikoj Britaniji tonzilektomija čini 20% operacija

koje se izvode kod dece a samo je 2010. godine izvedeno 289,000 tonzilektomija (Urquhart i Montague, 2012). Jedina operacija sa većom frekvencom bila je miringotomija (hirurški postupak presecanja bubne opne u cilju evakuacije sekreta), sa 699,000 zahvata iste godine (Hall i dr., 2017). Na osnovu istraživanja o incidenci tonzilektomija i adenotonzilektomija urađenih u Sjedinjenim Američkim Državama, u periodima 1970/74 i 2000/05, Erickson i dr. (2009), su zaključili da je došlo do povećanja incidence tonzilektomija sa 126/100 000 pacijenata na 153/100 000 pacijenata. Incidenca adenotonzilektomija je bila nešto viša sa 243/100 000 pacijenata na 485/100 000 pacijenata.

Učestalost HT, samim tim i hiruških zahvata između polova je različita, pa je tako u retrospektivnoj studiji Tzelnick i dr. (2020) prevalenca operisanih osoba ženskog pola bila 57,1%, naspram 42,9 % operisanih osoba muškog pola. Slične rezultate dobili su Senska i dr. (2010), koji su u svojoj studiji imali 75% žena, kao i Koskenkorva i dr. (2016) i Haidara i dr. (2019), koji su imali 67%, odnosno 60,63% ženskih pacijenata, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji. U istraživanjima Wetmora (2017) incidenca polova se razlikuje i po tipu operativnog zahvata. Naime, od ukupnog broja pacijenata kod kojih je urađena tonzilektomija, 65% su bile osobe ženskog pola, dok je kod pacijenata koje su podlegle odstranjivanju nepčanih tonzila i adenoida odnos polova bio drugačiji (M:Ž (52%:48%)).

HT je oboljenje koje je uglavnom prisutno kod osoba dečijeg uzrasta, što je potvrđeno brojnim studijama gde je pokazano da je prosečan uzrast pacijenata sa HT 5,5 godina (Ng i dr., 2019); 6,34 (Parker i Walner, 2011); 7,8 (Šumilo i dr., 2019); 9,4 (Kalaiarasi i dr., 2018) i 14,25 godina (Haidara i dr., 2019), dok je u ovoj doktorskoj disertaciji prosečna starost dece sa HT bila 5,56 godina. Međutim, podaci nekoliko retrospektivnih studija pokazuju da je HT zastupljen i kod starijih osoba (radno sposobnih). Autori iz Izraela pokazali su retrospektivnom studijom (2003 – 2009) da su operisani pacijenti sa rekurentnim tonzilitisom bili prosečne starosti 37,6 godina (Tzelnick i dr., 2020). Dok je druga studija na osnovu 97 ispitanika, pokazala da su operisani HT pacijenti bili prosečne starosti 26 godina (Senska i dr., 2010), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji. Takođe, uzrasna grupa se razlikuje i na osnovu tipa operacije. Wetmore (2017) je pokazao da je prosečna starost pacijenata kojima je urađena tonzilektomija bila 15,9 godina, dok je kod pacijenata sa urađenom adenotonzilektomijom prosek godina bio znatno niži – 6,8 godina. Upala adenoida se ređe javlja kod odraslih jer nakon puberteta dolazi do atrofije adenoida (Plank, 2016).

Činjenica je da HT ima negativan uticaj na kvalitet života. Pacijenti se najčešće žale na česte upale ždrela i gnojne angine, ponavljane peritonzilarnе apcese, peckanje, žarenje i stalan osećaj prisustva stranog tela u ždreleu, neprijatan zadah, otežano disanje i/ili gutanje, perzistiranje hronične infekcije nosa, paranazalnih šupljina ili uha (Plank, 2016). Takođe, moguća je i pojava umora, malaksavosti, gubitka apetita, brzog zamaranja. Posebno su simptomi izraženi kod dece kod kojih je prisutna i infekcija adenoida. Kod takve dece je posebno disanje otežano, zbog čega često dolazi do hrkanja ili čak i do gušenja u toku spavanja. Ove simptome prati i slabija ishrana i razvoj deteta. Opstrukcija nazofarinksa remeti ventilaciju bubne opne i može doći do razvoja sekretornog otitisa sa posledičnom nagluvošću (Roland i dr., 2001). Neadekvatna respiracija, može dovesti i do poremećaja u razvoju grudnog koša deteta. Ng i dr. (2019) su analizom 420 zdravstvenih kartona dece koja su tokom četvorogodišnjeg perioda (2011 – 2014) podlegla tonzilektomiji ili adenotomiji utvrdili da su najčešći simptomi, indikacije za operaciju bili opstrukcija disajnih puteva (n=253, 60,2%) i rekurentna upala tonzila (n=166, 39,5%). Na osnovu retrospektivne analize sprovedene od strane Erickson i dr. (2009), utvrđeno je da se učestalost opstrukcije disajnih puteva kao indikacije za operaciju menjala tokom vremena. Pa tako, u periodu 1970/74 je iznosila 12%, dok je 2005. godine bila 77%. Međutim Tzelnick i dr. (2020) su došli do suprotnih informacija. Njihova studija je pokazala da je *sleep apnea* zaslužna za samo 5,1% operativnih zahvata u periodu 2000 – 2009. Šumilo i dr., (2019), su uradili retrospektivnu kohortnu studiju na osnovu pregleda medicinskih kartona dece uzrasta 0 – 15 godina operisanih u periodu od 2006 do 2016. Evidentirane

indikacije za tonzilektomiju koje su praćene su bile: upala grla, temperatura, faringitis, stomatitis i tonzilarni tumor. Incidenca urađenih tonzilektomija na osnovu analiziranih simptoma je bila 4,2% na 1000 osoba po godini. Od indikacija najviše je bila zastupljena upala grla i to 2 – 4 upale godišnje (44,6%), što je u skladu sa podacima dobijenim popunjavanjem upitnika u ovoj disertaciji. U jednogodišnjoj observaciji u kojoj je učestvovalo 315 pacijenata, najzastupljeniji simptom HT je bio bol pri gutanju – odinofagija (88,63%), dok su ostali simptomi na osnovu incidence bili zastupljeni sledećim redom: temperatura (86,27%), hrkanje (38,43%), refleksna otalgija – bol u ušima (37,65%), hiper-sijaloreja – prekomerno lučenje pljuvačke (20,39%), disfagija – otežano gutanje (15,25), *sleep apnea* sindrom (14,12%) i *dyspnea* – kratak dah (10,20%) (Haidara i dr., 2019).

Prema navodima Hibbert i dr. (2019) u 55 – 94% slučajeva akutnog tonzillitisa deci je prepisivan antibiotik, što je u skladu sa podacima dobijenim u ovoj disertaciji. Júnior i dr. (2019) su saopštili da je 83,6% *Staphylococcus aureus* izolata iz tkiva tonzila bilo rezistentno na penicilin i 13,6% na amoksicilin sa klavulonskom kiselinom. Neefikasnost penicilina dovela je do povećane upotrebe drugih antibiotika kao što su β laktamski inhibitori i cefalosporini (Júnior i dr., 2019).

Orofaringoskopski status je pokazao da je bilateralna hipertrofija nepčanih tonzila prisutna u 82,35% operisanih slučajeva (Haidara i dr., 2019). Podaci ukazuju na to da brojni patogeni mikroorganizmi koji su izolovani iz inficiranih tonzila mogu uticati na razvoj hipertrofije tonzila (Brook i dr., 2000). Torretta i dr. (2013), pokazali su da postoji značajna povezanost između bakterija izolovanih iz tkiva tonzila koje mogu da formiraju biofilm i hipertrofije tonzila.

Nedavna publikacija u vezi sa dugoročnim rizicima od bolesti povezanih sa tonzilektomijom, adenotonziloktomijom i adenoktomijom obuhvatila je preko 50 hiljada dece čije je zdravstveno stanje praćeno do 20 godina nakon operacija. Rezultati su pokazali da kod operisane dece postoji veći rizik za razvoj različitih bolesti gornjih disajnih puteva i veći rizik od infektivnih bolesti i alergija (Byars i dr., 2018). Druga istraživanja su pokazala da tonzile i adenoidi, kao deo limfnog sistema imaju ključnu ulogu u normalnom razvoju imunskog sistema. Lunny i dr. (2013) su meta analizom ispitivali vezu između tonzilektomije i multiple skleroze. Otkrili su da je uklanjanje nepčanih tonzila kod dece povezano sa rizikom od razvoja multiple skleroze u kasnijim godinama života, dok tonzilektomija urađena kod odraslih nije pokazala istu korelaciju. Slično tome, pokazano je da je povećan rizik od akutnih bolesti miokarda kod pacijenata koji su bili podvrgnuti tonzilektomiji tokom detinjstva, bez slične povezanosti kod odraslih koji su bili podvrgnuti istom hirurškom zahvatu (Janszky i dr., 2011).

Tabela 3. Demografski podaci i istorije bolesti pacijenata sa dijagnostifikovanim hroničnim tonzilitisom.

Demografski podaci	Grupa I (n, %)	Grupa II (n, %)		
		Grupa IIa (n, %)	Grupa IIb (n, %)	Grupa IIc (n, %)
Pol				
M	12 (40)	11 (40,74)	4 (100)	8 (57,14)
Ž	18 (60)	16 (59,26)	-	6 (42,86)
Ukupan broj	30 (100)	27 (100)	4 (100)	14 (100)
Uzrasna grupa				
<5	-	6 (22,22)	2 (50)	8 (57,14)
5-10	-	19 (70,37)	2 (50)	6 (42,86)
11-16	-	2 (7,41)	-	-
17-20	4 (13,33)	-	-	-
21-30	16 (53,33)	-	-	-
31-40	10 (33,33)	-	-	-
Godine (srednja vrednost ± SD)	28,13 ± 6,7	6,12 ± 2,4	5,56 ± 2,26	4,6 ± 1,65
Simptomi HT				
Bol u grlu				
Bez simptoma	-	24 (88,88)	4 (100)	
Veoma slabo izražene tegobe	-	1 (3,70)	-	
Slabo izražene tegobe	-	1 (3,70)	-	
Umereno jake tegobe	17 (56,66)	1 (3,70)	-	
Izražene tegobe	13 (43,33)	-	-	
Teško podnošljive tegobe	-	-	-	
Otežano gutanje				
Bez simptoma	-	25 (92,59)	4 (100)	
Veoma slabo izražene tegobe	-	-	-	
Slabo izražene tegobe	1 (3,33)	-	-	
Umereno jake tegobe	12 (40)	-	-	
Izražene tegobe	17 (56,66)	2 (8,33)	-	
Teško podnošljive tegobe	-	-	-	

REZULTATI I DISKUSIJA

Otežano disanje				
Bez simptoma		6 (22,22)	1 (25)	-
Veoma slabo izražene tegobe		2 (7,41)	-	-
Slabo izražene tegobe		1 (3,70)	1 (25)	1 (7,14)
Umereno jake tegobe		3 (11,11)	-	6 (42,86)
Izražene tegobe		-	1 (25)	2 (14,29)
Teško podnošljive tegobe		15 (55,55)	1 (25)	5 (35,71)
Prisustvo gustog sekreta u grlu				
Bez simptoma	4 (13,33)	11 (40,74)	-	
Veoma slabo izražene tegobe	-	1 (3,70)	1 (25)	
Slabo izražene tegobe	5 (16,66)	3 (11,11)	1 (25)	
Umereno jake tegobe	15 (50)	-	1 (25)	
Izražene tegobe	6 (20)	1 (3,70)	1 (25)	
Teško podnošljive tegobe	-	11 (40,74)	-	
Prisustvo gustog sekreta u nosu				
Bez simptoma	4 (13,33)	-	1 (25)	7 (50)
Veoma slabo izražene tegobe	-	-	-	-
Slabo izražene tegobe	4 (13,33)	-	1 (25)	2 (14,29)
Umereno jake tegobe	9 (30)	-	1 (25)	3 (21,43)
Izražene tegobe	13 (43,33)	-	1 (25)	1 (7,14)
Teško podnošljive tegobe	-	-	-	1 (7,14)
Kašalj				
Bez simptoma	6 (20)	23 (85,18)	4 (100)	13 (92,86)
Veoma slabo izražene tegobe	2 (6,66)	2 (7,41)	-	-
Slabo izražene tegobe	6 (20)	-	-	-
Umereno jake tegobe	9 (30)	1 (3,70)	-	-
Izražene tegobe	7 (23,33)	-	-	1 (7,14)
Teško podnošljive tegobe	-	1 (3,70)	-	-
Neprijatan zadah				
Bez simptoma	-	20 (70,07)	4 (100)	13 (92,86)
Veoma slabo izražene tegobe	-	3 (11,11)	-	-
Slabo izražene tegobe	-	-	-	1 (7,14)
Umereno jake tegobe	1 (3,33)	1 (3,70)	-	-

REZULTATI I DISKUSIJA

Izražene tegobe	20 (66,66)	1 (3,70)	-	-
Teško podnošljive tegobe	9 (30)	2 (7,41)	-	-
Hrkanje				
Bez simptoma		11 (40,74)	1 (25)	4 (28,57)
Veoma slabo izražene tegobe		4 (14,81)	-	-
Slabo izražene tegobe		-	-	-
Umereno jake tegobe		2 (7,41)	-	-
Izražene tegobe		1 (3,70)	-	6 (42,86)
Teško podnošljive tegobe		9 (33,33)	3 (75)	4 (28,57)
Broj upala grla i ušiju	4,33 ± 0,61	3,29 ± 1,92	4,5 ± 1	3,64 ± 2,31
Upotreba antibiotika	30 (100)	17 (62,96)	3 od 4 (75)	8 (57,14)
Orofaringskopski/Otoskopski* status				
hiperemične, hipertrofične, kriptične tonzile sa detritusom u kriptama	13 (23,1)	25 (92,59)	4 (100)	-
asimetrične, neravne tonzile sa hiperemijom nepčanih lukova	17 (56,67)	2 (7,41)	4 (100)	-
* uvećan adenoid	-	-	4 (100)	14 (100)
* zamućena i netransparentna bubna opna	-	-	4 (100)	11 (78,57)

*kriterijum za adenotomiju.

4.2. Analiza uzorkovanih tonzila

Iz Klinike za uvo, grlo i nos, KBC Zvezdara, uzeto je ukupno 79 postoperativnih uzoraka tkiva nepčanih tonzila i adenoida za izolaciju uzročnika HT-a.

4.2.1. Bakterije izolovane iz tkiva tonzila

Iz svih uzoraka izolovano je i identifikovano ukupno 82 bakterije i to 35 izolata iz tkiva Grupe I i 47 iz uzorkovanog tkiva Grupe II (Tabela 4). Identifikovano je ukupno 8 aerobnih i 8 fakultativno anaerobnih vrsta iz rodova *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Rothia*, *Enterobacter* i *Stenotrophomonas*.

Analiza učestalosti bakterija izolovanih iz uzoraka tkiva nepčanih tonzila kod pacijenata iz Grupe I pokazala je najveću zastupljenost vrste *Staphylococcus aureus* (29%), od ostalih G (+) bakterija po učestalosti slede *Streptococcus oralis* (20%) i *S. parasanquinis* (18%), dok je izolovana samo jedna G (–) bakterija, *Enterobacter cloacae* (6%) (Figura 1). Kod pacijenata iz Grupe II analiza učestalosti bakterija izolovanih iz tkiva nepčanih tonzila i adenoida pokazala je najveću zastupljenost vrste *S. oralis* (43%), dok su sledeće dve vrste po zastupljenosti *S. parasanquinis* (22%) i *S. aureus* (15%) (Figura 2A – D). Jedina G (–) bakterija *Stenotrophomonas maltophilia* je izolovana iz tkiva adenoida (Figura 2D). U obe grupe izolovane su i vrste koje pripadaju grupi A β – hemolitičkih streptokoka, s tim da je u Grupi I izolovana samo vrsta *S. anginosus* (3%), dok su u Grupi II izolovani sojevi sva tri predstavnika ove grupe: *Streptococcus anginosus* (2%), *S. constellatus* (4%) i *S. pyogenes* (4%). Iz nekoliko uzoraka tkiva nepčanih tonzila, pored *S. aureus*, izolovane su i druge vrste bakterija. U 4 uzorka je sa *S. aureus* izolovana i vrsta *Streptococcus oralis*, a u jednom uzorku *S. dysgalactiae*. Takođe, u jednom uzorku tkiva nepčanih tonzila pored *S. aureus* koizolovane su još dve vrste i to *S. oralis* i *Rothia mucilaginosa*.

Tonzilitis je jako zastupljena bolest koja može imati akutni i hronični tok, a uzročnici mogu biti različite bakterije i virusi. Akutni tonzilitis se ne leči hirurški i najčešće uzročnici ovih infekcija su virusi, ali u 30 – 40% slučajeva pokazalo se da uzročnici mogu biti i bakterije, i to najčešće grupa A β – hemolitičkih streptokoka (*S. pyogenes*, *S. anginosus*, *S. constellatus*). Ponavljajuća infekcija rezultira HT, gde dolazi do hipertrofije tonzila koja vodi ka respiratornoj opstrukciji (Johnson, 2018). Tokom istraživanja Jeong i dr. (2007) identifikovane su *S. aureus* (30,3%), *Haemophilus influenzae* (15,5%) i *S. pyogenes* (14,4%) kao najčešće izolovane bakterije kod pacijenata sa HT. Mikrobiološkom analizom tkiva nepčanih tonzila i adenoida, Swidsinski i dr. (2007), su pokazali da su vrste rodova *Bacterioides* i *Streptococcus* zastupljene u kriptama tonzila, *H. influenzae* je zabeležen u samom tkivu, dok su vrste rodova *Fusobacteria*, *Pseudomonas* i *Burkholderia* izolovane iz površinskih slojeva tkiva. Ovi rezultati sugerišu da je hiperplazija adenoida i nepčanih tonzila verovatno rezultat prisustva više vrsta patogenih bakterija, što menja dosadašnja shvatanja da je adenotonzilitis posledica infekcije izazvane jednom bakterijskom vrstom, koja kolonizuje samo površinu tkiva (Johnston i Douglas, 2018). U skladu sa dobijenim rezultatima ove doktorske disertacije i niza drugih studija u kojima je analizirano tkivo nepčanih tonzila pokazano je da je najzastupljenija bakterijska vrsta u tkivima *S. aureus*. Tako je Zautner i dr., (2010) pokazao da 130 uzoraka analiziranog tkiva tonzila, najzastupljenija bakterija je *S. aureus* (57,7%), zatim: *Haemophilus parainfluenzae* (32,3%), *H. influenzae* (23,1%), ali se mogu javiti i kvasnice iz roda *Candida* (14,6%). Galli i dr. (2007) proučavali su tonzilarno tkivo kod pacijenata sa HT, nakon primenjene antibiotske terapije. Bakterije su izolovane iz 62,5% analiziranog tkiva nepčanih tonzila, uključujući *S. aureus* kod 3 pacijenta, α – hemolitički *Streptococcus* kod 3 pacijenta. U istoj studiji ispitivano je i tkivo adenoida i tu je zastupljenost bila drugačija. Najzastupljenija je bila vrsta *H. influenzae*, zatim *S. pyogenes* i α – hemolitički *Streptococcus*. Ova proučavanja su pokazala da svi izolovani sojevi iz tkiva nepčanih tonzila imaju sposobnost da formiraju biofilm, dok je u slučaju adenoidnog tkiva 60% vrsta imalo sposobnost da formira biofilm (Galli i dr., 2007). Istraživanje sprovedeno od strane Kalaiarasi i dr. (2018) obuhvatilo je

bakteriološku analizu 160 tonzila kod osoba dečijeg uzrasta. Izolovano je ukupno 301 aerobnih i 171 anaerobnih vrsta bakterija, sa najvišom stopom zastupljenosti sojeva vrste *Streptococcus viridans* (83/27,57%), zatim grupa A β – hemolitičkih streptokoka (67/22,25%), dok je *S. aureus* izolovan kod samo 38 pacijenata (12,62%). Analizom briseva tkiva uzetih nakon resekcije tkiva Katkowska i dr. (2016) su pokazali da je najzastupljenija bakterija u tkivu nepčanih tonzila *S. aureus* (30,5%). Od ukupnog broja *S. aureus* pozitivnih briseva, u čak 27,78% je pored *S. aureus* izolovana još jedna vrsta bakterija. Takođe, u manjem procentu su izolovane i β – hemolitičke streptokoke (7,6%), kao i G (–) bakterije među kojima je *Esherichia coli* izolovana u najvećem procentu (3,4%). Pored bakterija izolovane su i kvasnice, dve vrste roda *Candida*, *C. albicans* (2,5%) i *C. krusei* (0,8%) (Katkowska i dr., 2016). Drugi autori Zautner i dr. (2010) su pokazali da je od ukupno 75 uzoraka tkiva pozitivnih na *S. aureus* čak u 62 uzorka pored vrste izolovana još jedna patogena bakterija a najčešći koizolati bile su vrste: *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, *H. influenzae* i *H. parainfluenzae*.

Više studija je identifikovalo *S. aureus* kao glavnog uzročnika tonzilitisa, ili kao verovatnog kopatogena sa prevalencom od 83% (Zautner i dr., 2010; Raju i dr., 2012; Torretta i dr., 2013; Katkowska i dr., 2016). Prisustvo *S. aureus* u tonzilarnom tkivu čak i nakon zapaljenskog procesa može biti povezano sa njegovom sposobnošću da formira biofilm. Prisustvo biofilma objašnjava neaktivnost antibiotika a samim tim i recidiv infekcije (Júnior i dr., 2019).

Streptococcus oralis izolovana iz većine uzorkovanog tkiva ispitivanih tonzila je važan oportunistički patogen. Poznato je da je ova bakterija prva koja kolonizuje gleđ i formira biofilm, često interaguje sa periodentalnim patogenima kao što je *Porphyromonas gingivalis* koji je izazivač hronične paradontoze (Maeda i dr., 2013). Takođe, kod imunokomprovitovanih pacijenata može biti uzročnik bakterijskog endokarditisa, respiratornih bolesti, a može izazvati i streptokoknu sepsiju (Dziedzic i dr., 2015).

Tabela 4. Bakterije izolovane iz tkiva tonzila i adenoida kod pacijenata sa hroničnim tonzilitisom.

Vrsta bakterije	Broj izolata	
	Grupa I	Grupa II
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	7
<i>Staphylococcus warneri</i>	1	0
<i>Staphylococcus hominis</i>	1	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	1
<i>Streptococcus anginosus</i>	1	1
<i>Streptococcus constellatus</i>	0	2
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2	0
<i>Streptococcus oralis</i>	7	20
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	6	10
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	0	1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	2
<i>Streptococcus salivarius</i>	0	1
<i>Micrococcus luteus</i>	0	1
<i>Rothia muciliginosa</i>	3	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	1
Ukupan broj izolovanih bakterija	35	47

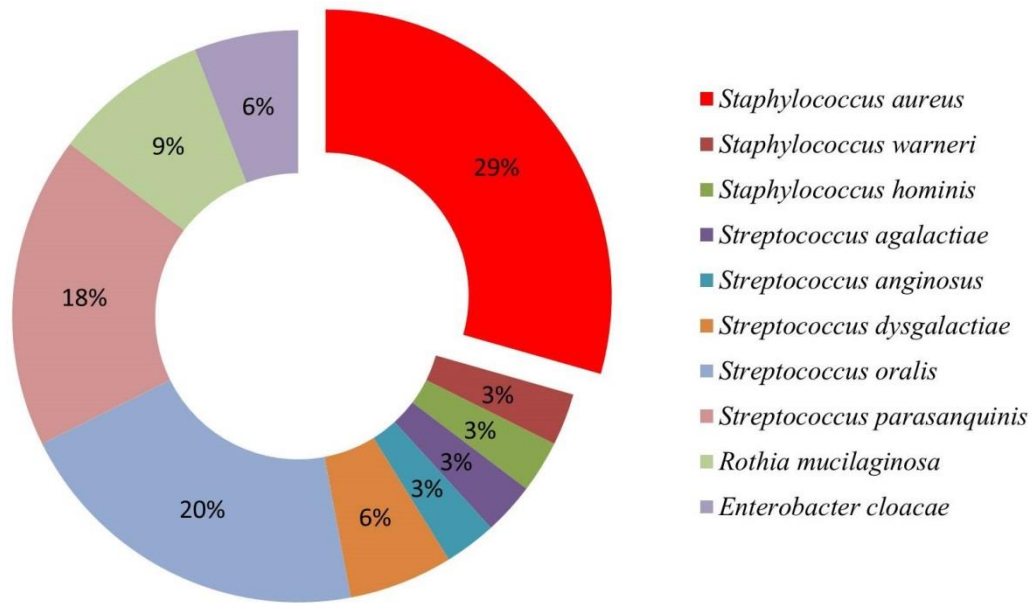


Figura 1. Procentualna zastupljenost vrsta u postoperativnim uzorcima tkiva nepčanih tonzila pacijenata iz Grupe I.

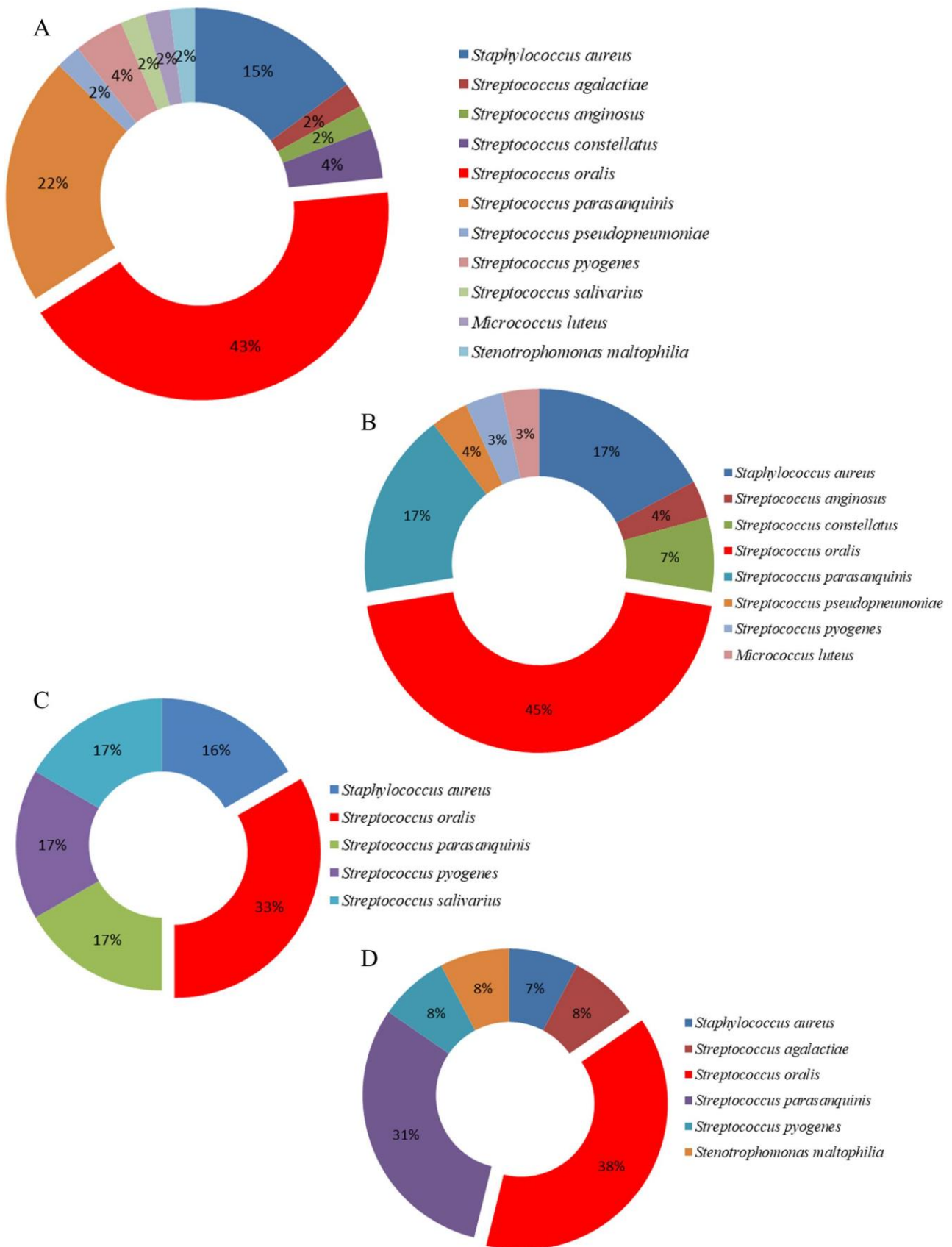


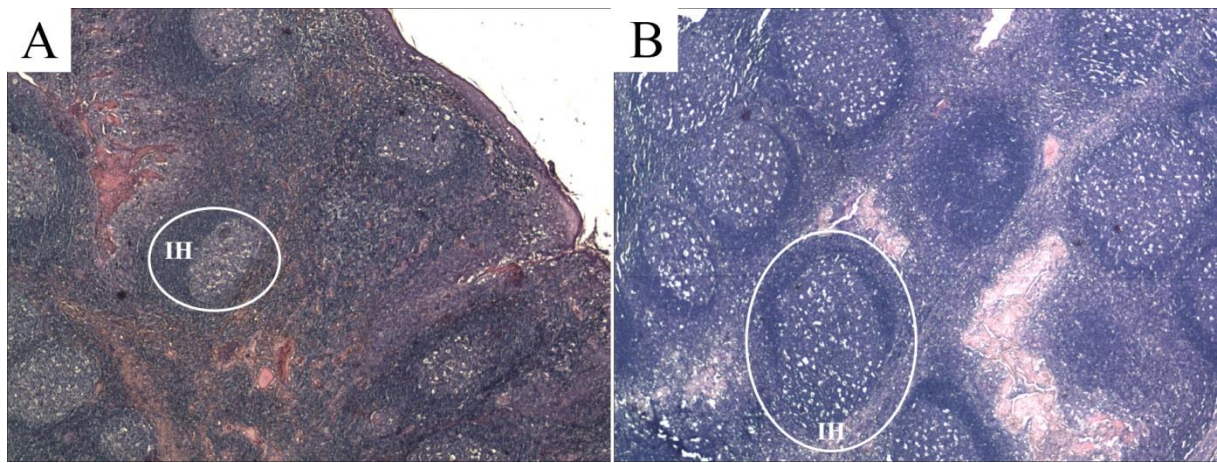
Figura 2. Procentualna zastupljenost vrsta bakterija u postoperativnim uzorcima tkiva tonzila: A) kod pacijenata iz Grupe II; B) kod pacijenata iz Grupe IIa; C) kod pacijenata iz Grupe IIb; D) kod pacijenata iz Grupe IIc.

4.2.2. Prikaz histološke analize tkiva tonzila

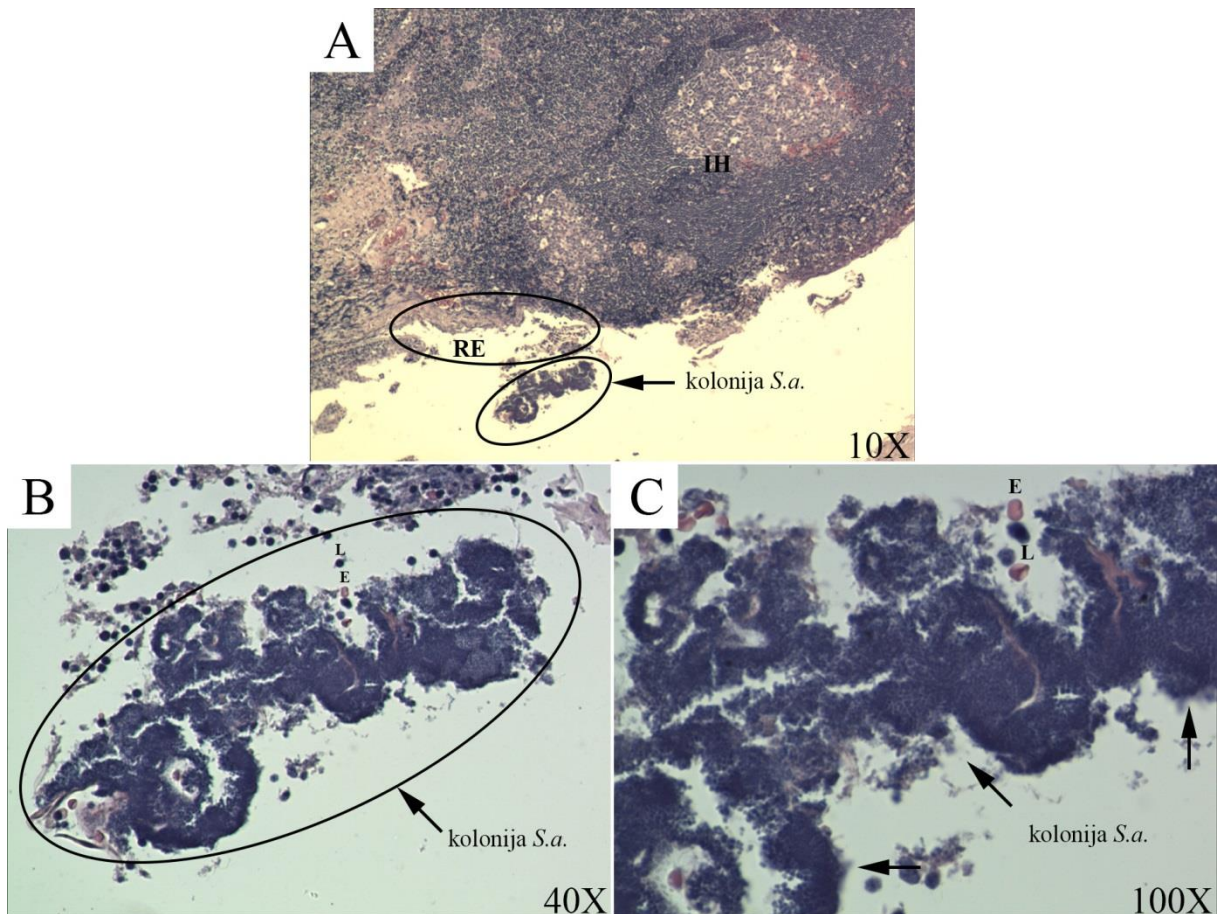
Iz hirurški resećiranog materijala za histološku analizu uzimana su tkiva nepćanih tonzila i adenoida sa ciljem detekcije prisustva bakterija uzročnika HT-a. Na dobijenim presecima tkiva tonzila uočeno je prisustvo uvećanih folikula u kojima se mogu uočiti mrka telašca (intrafolikularna hiperplazija) (Slika 12 A i B, 13A i 14A). Na histološkom preseku jasno se može uočiti samo deo epitela jer je došlo do odvajanja epitela usled zapaljenskog procesa (Slika 13A). Na istoj slici, presek B i C se pri različitim uveličanjima uočava i kolonija G (+) bakterije *S. aureus*, čime je potvrđeno da je ova vrsta jedan od uzročnika HT-a. Takođe, na preseku tkiva adenoida se jasno vidi intrafolikularna hiperplazija (Slika 14A) kao i prekid kontinuiteta epitela unutar kripte, sa prisustvom zapaljenskih ćelija – limfocita (Slika 14B i C). Na histološkim presecima unutar kripte adenoida se uočava kolonija G (-) bakterije *S. maltophilia* (Slika 15A i B). Pri uveličanju 40X se jasno može uočiti amorfnu masu bakterija *S. maltophilia* po čijim se ivicama mogu videti i pile ove bakterijske vrste. Predstavljene rezultati potvrđuju da kolonizatori tkiva nepćanih tonzila i adenoida mogu biti i G (+) i G (-) bakterije. Do sada nije saopšteno da vrsta *S. maltophilia* kolonizuje tonzilarno tkivo, stoga rezultat dobijen u ovom istraživanju predstavlja prvi podatak o prisustvu ove vrste u tkivu adenoida. U istraživanju su analizirani i prikazani samo histološki preseki tkiva obolelih pacijenata bez mogućnosti poređenja sa zdravim tkivom jer takvo tkivo ne podleže tonzilektomiji.

Tkivo tonzila se sastoji iz: epitela, vezivnog tkiva u obliku trabekula i retikuluma, i limfoidnog tkiva koga čine limfni folikuli i interfolikularno tkivo. Nepćane tonzile su sa spoljašnje strane prekrivene pločasto slojevitim epitelom, koji pripada sluzokoži gornjeg respiratornog trakta. Epitel se uvlači u tkivo u vidu dubokih primarnih kripta koje se pri dnu raćavaju u sekundarne, manje kripte (Perry i dr., 1998). Lumen kripta najčešće je ispunjen limfocitima, deskvaminiranim epitelom i bakterijama. Epitel je tanji pri dnu kripte i preplavljen je leukocitima koji ovde imaju ulogu fagocita. Vezivno tkivo stvara podlogu za strukturu tonzila i nema specifičnu funkciju. Plazmociti, granulociti i makrofagi se često mogu naći u vezivnom tkivu. Pored toga, tu su prisutni krvni i limfni sudovi kao i ogranci IX kranijalnog nerva. Najznačajniji deo tonzilarnog parenhima čini limfoidno tkivo koje se deli na folikularno i ektrafolikularno. Limfoidno folikularno tkivo u vidu limfnih folikula smatra se osnovnim elementom tonzilarnog tkiva. U pretežno pravilnom rasporedu, paralelno sa površinom kripta, gusto su raspoređeni krupni limfni folikuli sa izraženim germinativnim centrima i nesimetrično širom zonom malih limfocita, okrenutih ka epitelu. Broj i veličina folikula, kao i obim germinativnih središta zavise od stupnja antigenskog nadražaja (Perry i dr., 1998; Dell'Aringa i dr., 2005; Nemati i dr., 2020).

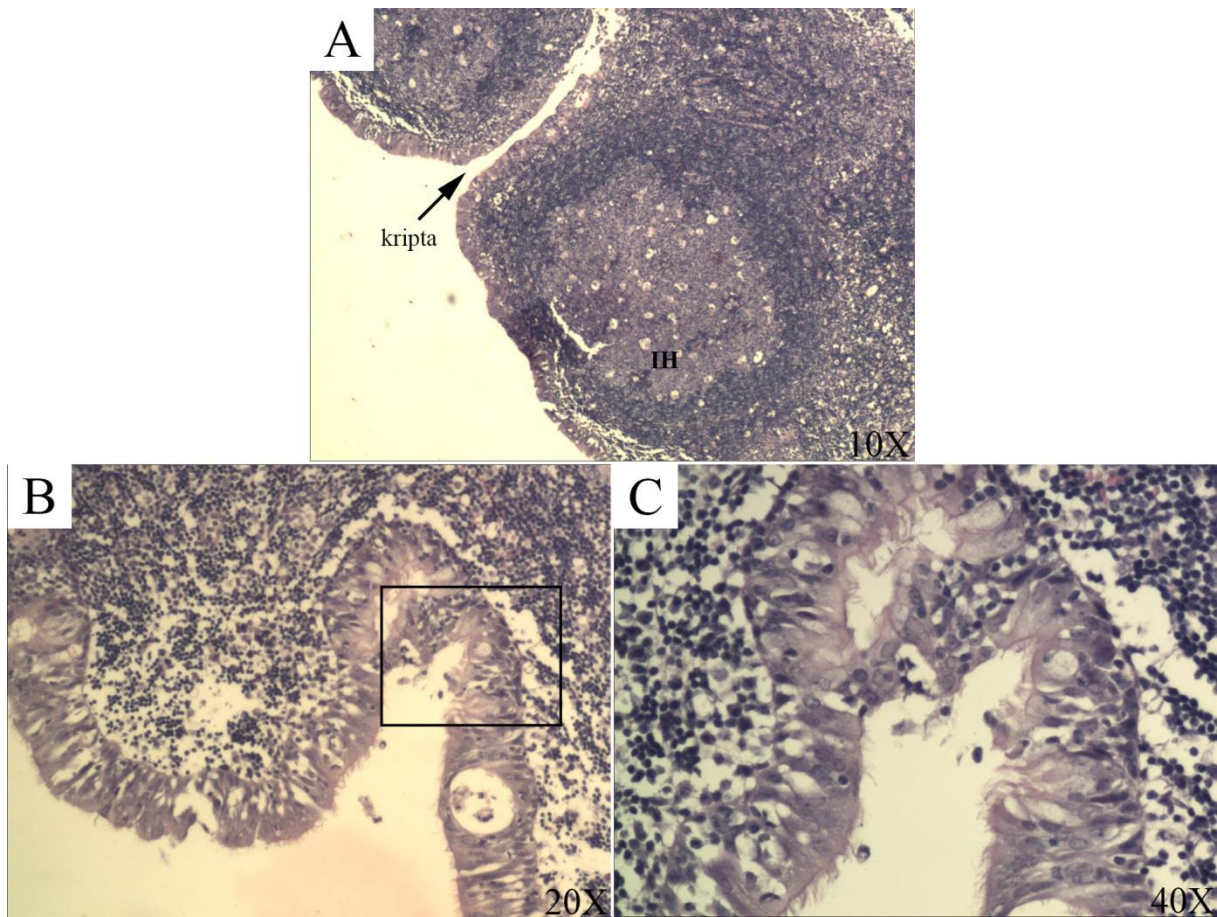
Chole i Faddis (2003) potvrdili su histološkom analizom prisustvo bakterija u formi biofilma u kriptama tkiva nepćanih tonzila. Na presecima su uočene guste nakupine G (+) i G (-) bakterija u kriptama, dok su inflamatorne ćelije viđene na periferiji ovih bakterijskih kolonija. Elektronskom mikroskopijom bakterijske kolonije su detektovane kao amorfnu masu uronjena u ekstracelularni matriks, čime su autori dokazali prisustvo biofilma. Bakterije u biofilmu, unutar tkiva tonzila, zaštićene su od odbrambenog odgovora domaćina i od delovanja antibiotika i mogu bez prepreka da sintetišu različite endotoksine. Endotoksini u kriptama tonzila dovode do hroničnih upala. Takođe, kada su lokalni uslovi sredine povoljni, bakterije u biofilmu postaju pokretne, što za posledicu ima pojavu ponovne infekcije (Stoodley i dr., 2001). Imunohistološka bojenja preseka nepćane tonzile iz koje je izolovan *S. aureus*, jasno su pokazala povezanost bojenja specifičnog za *S. aureus* sa histološkim znacima upale tonzila (rastresit epitel, nekroza tkiva, prisustvo eksudata) (Zautner i dr., 2010). Time su autori zaključili da *S. aureus* nije bio samo prolazni kolonizator tkiva, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji.



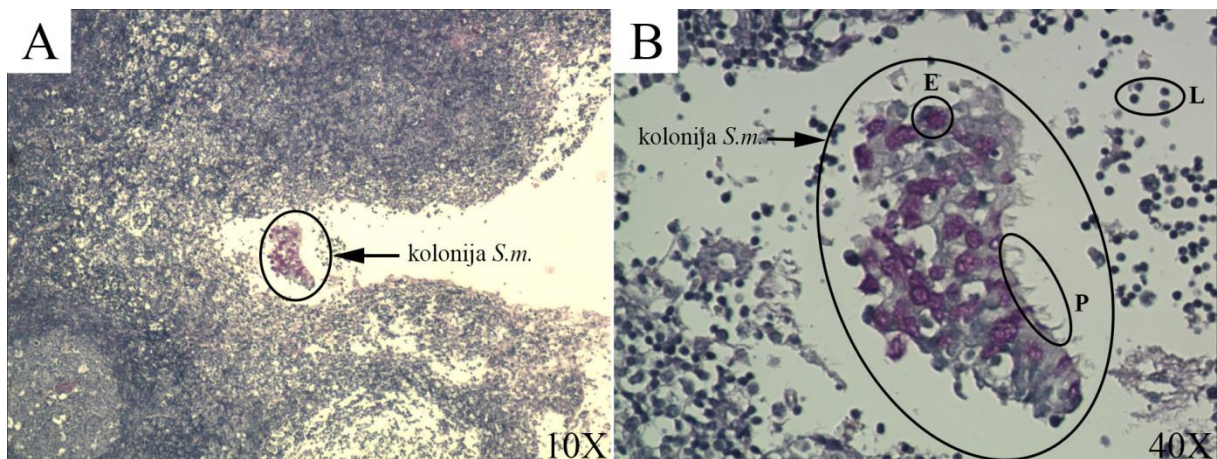
Slika 12. Presek tkiva nepčane tonzile sa intrafolikularnom hiperplazijom (IH) kod pacijenata iz: A) Grupe II, 5X; B) Grupe I, 5X.



Slika 13. Presek tkiva nepčane tonzile sa kolonijom *Staphylococcus aureus*: A) rastresit epitel (RE) kao posledica zapaljenskog procesa; kolonija *S. aureus*; IH; B), C) kolonija *S. aureus* sa uočljivim limfocitima (L) i eritrocitima (E).



Slika 14. Presek tkiva adenoida: A) intrafolikularna hiperplazija (IH) sa jasno vidljivom kriptom; B) epitel sa velikim brojem limfocita unutar kripe; C) rastresit epitel sa limfocitima unutar kripe.



Slika 15. Presek tkiva adenoida sa: A) kolonijom *Stenotrophomonas maltophilia*; B) amorfna masa *S. maltophilia* sa uočljivim pilama (P) i eritrocitima (E), u okolnom tkivu nalazi se i veliki broj limfocita (L).

4.3. Sakupljanje makromiceta

Plodonosna tela izabranih vrsta, koja su korišćena za dalja istraživanja, sakupljana su u periodu 2014 – 2017 godine na različitim lokacijama širom Republike Srbije. Tokom leta 2014. godine uzorkovanje je urađeno u zapadnoj Srbiji na planini Divčibare. Naredne, 2015. godine sakupljanje je izvršeno ponovo na planini Divčibare ali i u istočnoj Srbiji na Homoljskim planinama. 2016. godine plodonosna tela su sakupljana u centralnoj Srbiji, na planini Kopaonik. Poslednje, 2017. godine sakupljanje je urađeno u okolini Beograda, na planini Kosmaj.

4.3.1. Identifikacija vrsta

Analizirane su makroskopske i mikroskopske karakteristike, zrelih ne oštećenih bazidiokarpa, na terenu i u laboratoriji. Analizom šešira praćeni su: veličina, oblik, boja, ornamentacija, konzistencija i izgled ivice. Observacijom drške praćena je: dužina, oblik, ornamentacija, izgled na preseku i odnos drške i šešira. Takođe su analizirane i druge karakteristike relevantne za identifikaciju vrsta kao što su: tip himenofora (izgled, boja i odnos listića i drške), izgled i boja spora i stanište. Na osnovu navedenih karakteristika identifikovano je 7 vrsta: *Armillaria mellea*, *Lactarius quietus*, *L. vellereus*, *L. piperatus*, *Russula integra*, *R. nigricans*, *R. rosea*) (Tabela 5).

Tabela 5. Identifikovane vrste makromiceta

Naučno ime	Kod	Lokalitet	Godina sakupljanja
<i>Armillaria mellea</i> (Vahl) P. Kumm.	Am-011-2015	Divčibare	2015.
<i>Lactarius piperatus</i> (L.) Pers.	Lp-061-2017	Kosmaj	2017.
<i>Lactarius quietus</i> (Fr.) Fr.	Lq-071-2014	Divčibare	2014.
<i>Lactarius vellereus</i> (Fr.) Fr.	Lv-082-2016	Kopaonik	2016.
<i>Russula integra</i> (L.) Fr.	Ri-231-2015	Homolje	2015.
<i>Russula nigricans</i> (Bull.) Fr. (1838)	Rn-201-2015	Homolje	2015.
<i>Russula rosea</i> Pers.	Rr-211-2015	Homolje	2015.

4.3.2. Opšte karakteristike plodonosnih tela odabranih vrsta i njihova taksonomska pripadnost

Prema korišćenim ključevima (Phillips, 2006; Hadžić i Vukojević, 2008; Vukojević i Hadžić, 2013) karakteristike vrsta odabranih za dalja istraživanja su:

Podrazdeo: Basidiomycotina
 Klasa: Hymenomycetes
 Red: Agaricales
 Familija: Tricholomataceae
 Rod: *Armillaria*

***Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm.**

Plodonosna tela rastu i u grupama i pojedinačno. Boja plodonosnog tela varira od žućkaste, oker do braonkaste. Šešir je veličine 5 – 15 cm, poluloptast u ranoj fazi rasta, a kasnije ravan sa izraženom grbicom u centru. Ivice šešira su podvijene, kasnije otvorene. Himenofor je listast, listići su gusti i prljavo bele boje, kasnije boje šešira. Drška je duga, vlaknasta, ljuspasta, centralno postavljena (Slika 16A). Saprobi na stablima, panjevima i korenu listopadnog i četinarskog drveća i rastu od avgusta do novembra. Ova vrsta je u srpskom narodu poznata pod narodnim imenom prava medenjača. U tradicionalnoj kineskoj medicini, ova vrsta se koristi za lečenje glavobolje, epilepsije, hipertenzije, insomnije i mnogih drugih poremećaja (Kostić i dr., 2017).

Red: Russulales

Familija: Russulaceae

Rod: *Lactarius*

***Lactarius piperatus* (L.) Pers.**

Plodonosna tela su mesnata, šešir prečnika 6 – 16 cm. Kod mladih bazidiokarpa šešir je ravan sa podvijenim ivicama, kasnije udubljen na sredini sa raširenim ivicama. Šešir je bele boje, stariji primerci mogu imati crvenkaste mrlje. Drška je zdepasta, bele boje sa zelenkastom ili crvenkastom nijansom. Himenofor je listast sa gustim listićima bele boje koji kasnije postaju smeđi (Slika 16B). Na preseku himenofor izlučuje eksudat bele boje koji nakon nekoliko sati postaje zelen. Spore su bele. Raste u listopadnim šumama, od kasnog leta do rane zime. U srpskom narodu je poznata kao paprena mlečnica (Phillips, 2006; Hadžić i Vukojević, 2008). Poznato je da se ova vrsta u tradicionalnoj medicini koristi u tretmanu urinarnih infekcija (Kosanić i dr., 2020).

***Lactarius quietus* (Fr.) Fr.**

Šešir je širine 3 – 8 cm, konveksan u ranim fazama rasta, kasnije centralno udubljen. Boja šešira je crvenkasto smeđa, ponekad sa tamnim koncentričnim krugovima ili mrljama. Drška je cilindričnog oblika, duga, šuplja, ponekad uzdužno izbrazdana i bez prstena. Himenofor je listast, listići su gusti i široki. Boja listića varira od smeđe do crvenkasto braonkaste. Odnos listića i drške je dekurentan (Slika 16C). Spore su krem boje. Raste u jesen, u hrastovim šumama. Narodno ime vrste je hrastova mlečnica. U literaturi nema podataka da je ova vrsta korišćena u medicinske svrhe.

***Lactarius vellereus* (Fr.) Fr.**

Šešir je širine 10 – 25 cm, centralno udubljen u obliku levka, bele ili krem boje. Himenofor je listast, listići su umereno udaljeni, a boja listića varira od bele do svetlo žute. Odnos listića i drške je dekurentan. Drška je kraća u odnosu na prečnik šešira (Slika 16D). Spore su bele boje. Raste u listopadnim šumama, od kasnog leta do rane zime. Narodno ime vrste je runjava mlečnica. Kao i za *L. quietus* nema zabeleženih podataka o lekovitim svojstvima plodonosnih tela ove vrste.

Rod: *Russula*

***Russula integra* (L.) Fr.**

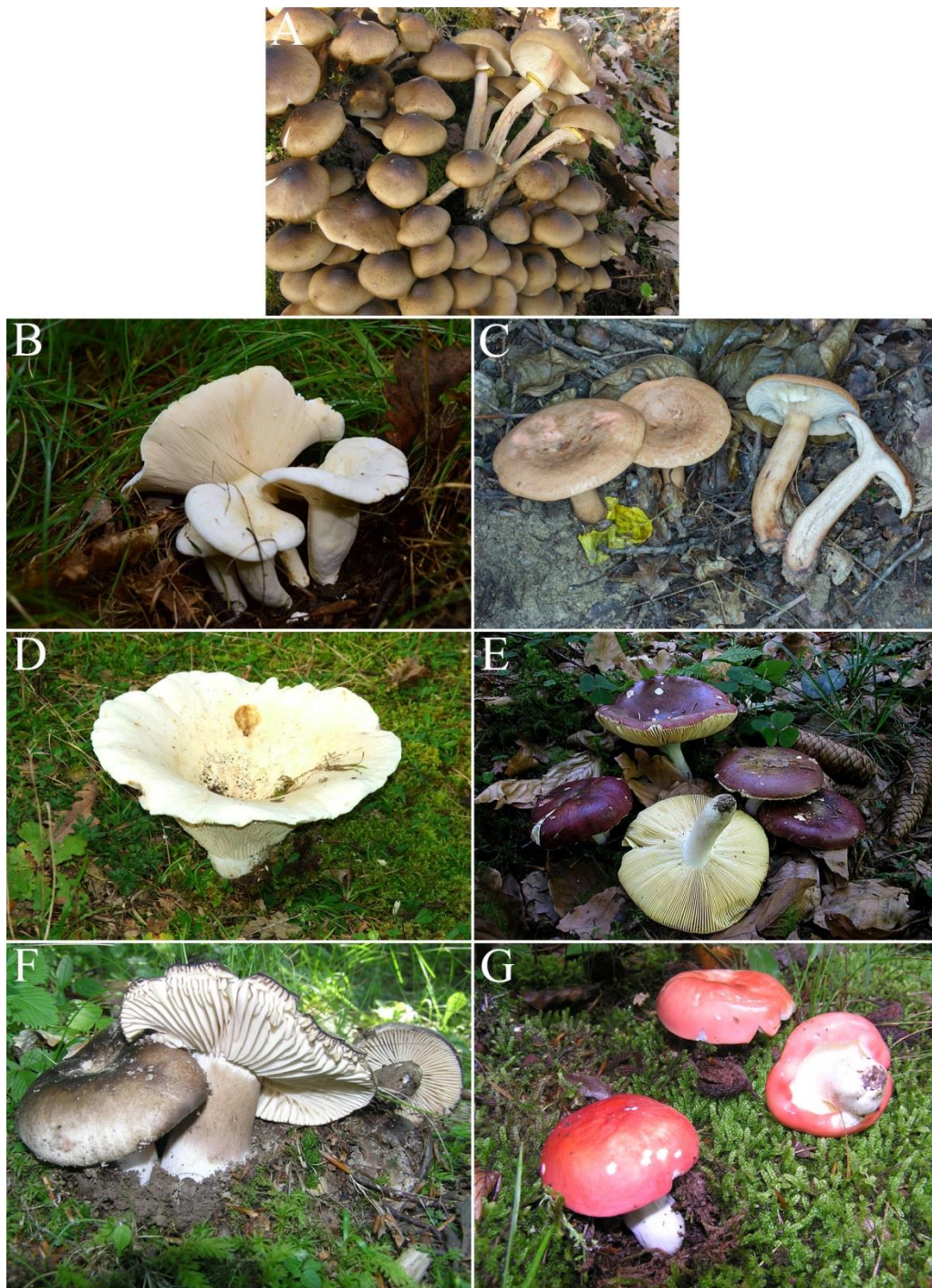
Šešir je prečnika 5 – 15 cm, u mladosti konveksan, dok odrasli primerci imaju ravnije, valovite šešire sa pektinatnim ivicama. Šešir je gladak, boja varira od modro crvene, bordo do tamno braon. Himenofor je listast, listići su gusti, ravno prirasli za dršku. Listići mogu biti bele do žućkaste boje. Drška je bela, glatka (Slika 16E). Spore su oker boje. Raste od kasnog leta do jeseni, u četinarskim šumama. Narodno ime vrste je smeđa golubica. Lekovitost bazidiokarpa nije poznata.

***Russula nigricans* (Bull.) Fr.**

Šešir je prečnika 5 – 20 cm, u mladosti konveksan bele boje, kasnije ravan smeđe do crne boje. Boja drške se tokom starenja menja kao i boja šešira. Ivice šešira su podvijene sa glatkim rubom. Himenofor je listast, listići su retki sa međulistićima. Odnos listića i drške je adnate. Drška je kratka (Slika 16F). Bela boja drške se javlja kod mlađih primeraka, dok je kod starijih boja drške crna. Spore su bele boje. Raste od leta do kasne jeseni u listopadnim i četinarskim šumama. Narodno ime vrste je crnkasta golubica. I za *R. nigricans* nisu zabeleženi podaci da je korišćena u tradicionalnoj medicini.

***Russula rosea* Pers., sinonim *Russula lepida* Fr.**

Šešir je prečnika 4 – 10 cm, crvene boje, konveksan u ranim fazama rasta, kasnije postaje ravan. Himenofor je listast, listići su beli i srednje gusti. Drška je u odnosu na šešir centralno postavljena, cilindrična, rozikaste boje (Slika 16G). Spore su blede krem boje. Mikorizna vrsta, raste u listopadnim šumama, najčešće bukovim. Raste od leta do rane jeseni. Narodno ime vrste je crvena golubica. Kao ni za većinu gore navedenih, ni za *R. rosea* nema podataka o biološkim aktivnostima u tretmanu bolesti u tradicionalnoj medicini što je jedan od razloga zašto su ove vrste izabrane za ispitivanja biološke aktivnosti.



Slika 16. Plodonosna tela testiranih makromiceta: A) *Armillaria mellea*, B) *Lactarius piperatus*, C) *Lactarius quietus*, D) *Lactarius vellereus*, E) *Russula integra*, F) *Russula nigricans*, G) *Russula rosea* (fotografije A, B, D-G J. Glamočlija; fotografija C M. Blagojević).

4.4. Nutritivne karakteristike testiranih makromiceta

Samonikle vrste gljiva su jako cenjena hrana zbog svog specifičnog nutritivnog sastava, tj. visokog sadržaja proteina i niskog sadržaja masti u bazidiokarpima. Glavni nutrijenti prisutni u plodonosnim telima makromiceta su ugljeni hidrati (Tabela 6). Opseg vrednosti ugljenih hidrata testiranih vrsta iznosio je 70,56 – 87,52 g/100 g suve mase. Bazidiokarpi *L. piperatus* su najbogatiji ugljenim hidratima (87,52 g/100 g), dok je njihova najniža vrednost zabeležena u bazidiokarpima *L. quietus* (70,56 g/100 g). Sadržaj ugljenih hidrata kod proučavanih vrsta, po opadajućem redosledu je sledeći: *L. piperatus* (87,52 g/100 g) > *R. rosea* (82,03 g/100 g) > *A. mellea* (81,25 g/100 g) > *L.*

vellereus (77,3 g/100 g) > *R. nigricans* (75,26 g/100 g) > *R. integra* (72,4 g/100 g) > *L. quietus* (70,56 g/100 g) (Tabela 6). Najvažnija uloga ugljenih hidrata je da obezbedi energiju ćeliji. Za makromicete, ugljeni hidrati su značajni i u pogledu skladištenja i sinteze strukturno složenih polisaharida (Barroetavena i Toledo, 2017). S obzirom na to da ugljeni hidrati čine više od polovine hranljivih sastojaka prisutnih u plodonosnim telima, opseg vrednosti ukupnog sadržaja ugljenih hidrata između vrsta značajno varira; od 25,57 g/100 g suve mase kod *Russula delica* do 79,22 g/100 g suve mase kod vrste *Lactarius salmonicolor* (Kalač, 2013). Većina dobijenih vrednosti ukupnog sadržaja ugljenih hidrata testiranih makromiceta je u opsegu vrednosti koje je naveo Kalač, (2013), jedino su za vrste *L. piperatus*, *R. rosea* i *A. mellea*, zabeležene više vrednosti.

Pored ugljenih hidrata, hemijska analiza je pokazala da su bazidiokarpi testiranih vrsta bogati i proteinima. Opseg vrednosti sadržaja proteina iznosio je 1,81 – 21,3 g/100 g suve mase. Najviše vrednosti su izmerene u bazidiokarpima vrsta *L. quietus* i *R. integra*, gde su vrednosti iznosile 21,1 g/100 g suve mase, odnosno 21,3 g/100 g suve mase, dok je najniža vrednost proteina zabeležena u bazidiokarpima *A. mellea* (1,81 g/100 g suve mase). Sadržaj proteina svih testiranih vrsta, po opadajućem redosledu, je sledeći: *R. integra* (21,3 g/100 g) > *L. quietus* (21,1 g/100 g) > *R. nigricans* (19,33 g/100 g) > *L. vellereus* (15,1 g/100 g) > *R. rosea* (12, 2 g/100 g) > *L. piperatus* (5,37 g/100 g) > *A. mellea* (1,81 g/100 g) (Tabela 6). Prema navodima Kalač (2013), opseg vrednosti ukupnog sadržaja proteina u plodonosnim telima makromiceta je od 13,2 g/ 100 g suve mase (*Pleurotus ostreatus*) do 62,78 g/100 g suve mase (*Laccaria laccata*). Dok su Barroetavena i Toledo (2017), naveli niži opseg vrednosti od 16,38 g/100 g suve mase (*Armillaria mellea*) do 21,07 g/100 g suve mase (*Boletus edulis*). Brojni autori smatraju da do razlika u vrednostima ukupnog sadržaja proteina dolazi zbog korišćenja različitih vrednosti konverzionih faktora prilikom finalnog preračunavanja (Kalač, 2012; Barroetavena i Toledo, 2017). Vrednosti prikazane u Tabeli 7, dobijene su korišćenjem konverzionog faktora N x 4,38. Sadržaj proteina može zavisiti i od načina pripreme plodonosnih tela. Sadržaj ostaje nepromenjen tokom sušenja uzoraka na 40°C, dok kuvanje dovodi do smanjenja sadržaja proteina (Kalač, 2013).

Sadržaj masti u bazidiokarpima ispitivanih vrsta je bio u opsegu od 0,55 g/100 g suve mase kod *L. quietus* do 2,73 g/100 g suve mase kod *L. piperatus*. Sadržaj masti kod analiziranih uzoraka, po opadajućem redosledu je sledeći: *L. piperatus* (2,73 g/100 g) > *A. mellea* (1,97 g/100 g) > *R. nigricans* (1,70 g/100 g) > *R. integra* (1,12 g/100 g) > *R. rosea* (0,84 g/100 g) > *L. vellereus* (0,60 g/100 g) > *L. quietus* (0,55 g/100 g) (Tabela 6). Literaturni podaci pokazuju da vrednosti ukupnog sadržaja masti variraju od 0,11 g/ 100 g suve mase (*Agaricus campestris*) do 8,02 g/100g suve mase (*L. deliciosus*) (Kalač, 2013; Barroetavena i Toledo, 2017). Dobijeni opseg vrednosti ukupnog sadržaja masti testiranih makromiceta je u saglasnosti sa literaturnim podacima.

Sadržaj pepela kod analiziranih vrsta je bio u opsegu 3,71 – 8,84 g/100 g suve mase. Najveći sadržaj pepela je izmeren u bazidiokarpima vrste *A. mellea*, dok je najniža vrednost zabeležena za uzorak *R. nigricans* (Tabela 6). Sadržaj pepela kod svih analiziranih vrsta po opadajućem redosledu je sledeći: *L. piperatus* (2,73 g/100 g) > *A. mellea* (1,97 g/100 g) > *R. nigricans* (1,70 g/100 g) > *R. integra* (1,12 g/100 g) > *R. rosea* (0,84 g/100 g) > *L. vellereus* (0,60 g/100 g) > *L. quietus* (0,55 g/100 g). Prema navodima Barroetaveña i Toledo (2017), sadržaj pepela varira od 5,53 g/100 g suve mase kod *Boletus edulis* do 37,78 g/100 g suve mase kod *Russula olivacea*. Dobijene vrednosti sadržaja pepela u analiziranim bazidiokarpima su znatno niže od literaturnih opsega vrednosti. Kalač (2013) ističe da je sadržaj pepela kod samoniklih vrsta varijabilniji nego kod gajenih zbog rasta na različitim supstratima. Naime, gajene vrste rastu na supstratima poznatog hemijskog sastava, u kontrolisanim uslovima, za razliku od samoniklih.

Kalorijska vrednost svih analiziranih vrsta je ujednačena. Najniža kalorijska vrednost je iznosila 372 kcal/100 g suve mase za *L. quietus*, dok je najviša izračunata vrednost bila 396,13 kcal/100 g suve mase za *L. piperatus* (Tabela 6). Dobijeni podaci su u saglasnosti sa podacima Barroetaveña i Toledo (2017) koji su pokazali da je opseg kalorijske vrednosti bazidiokarpa

makromiceta od 258,84 kcal/100 g suve mase kod *A. mellea* do 400,68 kcal/100 g suve mase kod *R. olivacea*.

Hemijski sastav i nutritivna vrednost plodonosnih tela samoniklih gljiva zavise od njihove zrelosti, uslova spoljašnje sredine, načina obrade i uslova skladištenja. Takođe, usled pomenutih faktora, njihove vrednosti variraju između i unutar vrsta (Valverde i dr., 2015; Stajić, 2015). U uzorku *A. mellea* poreklom iz Makedonije, najzastupljeniji su ugljeni hidrati (65,47 g/100 g suve mase), zatim proteini (24,47 g/100 g suve mase), pepeo (7,95 g/100 g suve mase) i masti (2,10 g/100 g suve mase) (Ouzouni i dr., 2009). Isti odnos zastupljenosti imao je i uzorak iz Portugala (Vaz i dr., 2011). U odnosu na navedene rezultate, testirani uzorak iz Srbije je bio bogatiji ugljenim hidratima (81,25 g/100 g suve mase) i pepelom (8,84 g/100 g suve mase), dok je sadržaj proteina i lipida bio niži (Tabela 6). Prema analizi Ao i Deb (2019), bazidiokarpi *L. piperatus* poreklom iz Indije najviše sadrže proteina (19,33 g/100 g suve mase), zatim ugljenih hidrata (9,2 g/100 g suve mase) i pepela (5,38 g/100 g suve mase), dok su u uzorku iz Srbije dominantni ugljeni hidrati (Tabela 6). Studija sprovedena od strane Barros i dr. (2007b) je pokazala da se nutritivni sastav *L. piperatus* menja u zavisnosti od toga da li je analizirano nezrelo ili zrelo plodonosno telo. Tako, ukupni sadržaj proteina je niži u nezrelim bazidiokarpima, dok je ukupni sadržaj proteina viši u zrelih bazidiokarpima. Nasuprot tome, sadržaj lipida i pepela se ne menja u zavisnosti od faze zrelosti. U pogledu nutritivnog sastava vrste roda *Russula* su slabo ispitivane. Prema navodima Sharma i Gautam (2015) bazidiokarpi *R. lepida* poreklom sa Himalaja, sadrže najviše ugljenih hidrata (34,15 g/100 g suve mase), zatim proteina (12,10 g/100 g suve mase) i u maloj količini su prisutne masti (0,28 g/100 g suve mase) i pepeo (0,17 g/100 g suve mase). Uzorak ove vrste iz Srbije je sadržao duplo veću količinu ugljenih hidrata (82,03 g/100 g suve mase) i pepela (4,9 g/100 g suve mase), dok je sadržaj proteina i lipida približno isti (Tabela 6). Rezultati Ouzouni i dr. (2009) i Kalogeropoulos i dr. (2013) dobijeni analizom plodonosnih tela *R. delica* poreklom iz Makedonije odnosno Grčke sadrže najviše ugljenih hidrata (63,87 g/100 g suve mase odnosno 7,76 g/100 g suve mase), zatim proteina (26,10 g/100 g suve mase odnosno 1,57 g/100 g suve mase) i u manjim količinama masti (4,44 g/100 g suve mase odnosno 0,13 g/100 g suve mase) i pepela (5,61 g/100 g suve mase, odnosno 0,85 g/100 g suve mase). Dok uzorak iste vrste iz Portugala sadrži najviše proteina (50,59 g/100 g suve mase), zatim ugljenih hidrata (25,57 g/100 g suve mase) i pepela (22,93 g/100 g suve mase) i najmanje količine masti (0,91 g/100 g suve mase) (Heleno i dr., 2009). Energetska vrednost uzorka iz Portugala (312,81 Kcal/100g) je niža u odnosu na dobijene rezultate u ovom radu.

Poznato je da sadržaj nutrijenata (ugljenih hidrata, proteina, masti i pepela) i različitih biološki aktivnih jedinjenja u plodonosnim telima makromiceta može značajno varirati kako u okviru iste, tako i između vrsta. Ovo se može pripisati uticaju različitih faktora, od fizičkih i hemijskih karakteristika zemljišta na kojima gljiva raste, do klimatskih uslova i razvojne faze bazidiokarpa koji su korišćeni za analizu. Takođe, način na koji je uzorak procesuiran za analizu može značajno uticati na sadržaj ovih jedinjenja. Tako, termička obrada na visokim temperaturama može sniziti sadržaj kako nutrijenata tako i bioaktivnih jedinjenja, dok konzerviranje/kiseljenje plodonosnih tela znatno produžava njihov rok upotrebe i povećava sadržaj vlakana, ali može sniziti sadržaj vitamina (Adhikari i dr. 2011). Sušenjem se smanjuje težina, ali se povećava sadržaj proteina i minerala (Barros i dr., 2007a; Adhikari i dr. 2011; Fernandes i dr., 2016).

Tabela 6. Nutritivna vrednost testiranih makromiceta (g/100 g suve mase ± SD).

Nutritivna vrednost	Testirane makromicete						
	<i>Armillaria mellea</i>	<i>Lactarius piperatus</i>	<i>Lactarius quietus</i>	<i>Lactarius vellereus</i>	<i>Russula integra</i>	<i>Russula nigricans</i>	<i>Russula rosea</i>
Ugljeni hidrati	81,25 ± 1,12	87,52 ± 0,5	70,56 ± 0,4	77,3 ± 0,4	72,4 ± 0,3	75,26 ± 0,4	82,03 ± 0,1
Proteini	1,81 ± 0,29	5,37 ± 0,4	21,1 ± 0,01	15,1 ± 0,02	21,3 ± 0,5	19,33 ± 0,5	12,2 ± 0,01
Masti	1,97 ± 0,06	2,73 ± 0,20	0,55 ± 0,01	0,60 ± 0,01	1,12 ± 0,04	1,70 ± 0,06	0,84 ± 0,01
Pepeo	8,84 ± 0,24	4,38 ± 0,37	7,7 ± 0,04	7 ± 0,2	5,19 ± 0,04	3,71 ± 0,08	4,9 ± 0,01
Energija (kcal/100g suve mase)	374,52 ± 0,88	396,13 ± 1,8	372 ± 1,3	375 ± 0,6	384,9 ± 0,3	393,66 ± 0,4	384,6 ± 0,3

4.4.1. Sadržaj šećera u bazidiokarpima testiranih vrsta

Rezultati hemijske analize sadržaja šećera u bazidiokarpu testiranih vrsta su pokazali prisustvo fruktoze, trehaloze i manitola (Tabela 7). Među testiranim vrstama, fruktoza je detektovana u bazidiokarpima vrsta *R. integra* i *R. nigricans*, u maloj količini 0,347 g/100 g suve mase, odnosno 0,39 g/100 g suve mase. Opseg vrednosti sadržaja manitola iznosio je 3,67 – 34 g/100 g suve mase. Najviša vrednost je izmerena u bazidiokarpima *R. nigricans* 34 g/100 g suve mase. Umerene vrednosti su zabeležene u bazidiokarpima *R. rosea*, *R. integra* i *L. vellereus* (25,84 g/100 g suve mase; 14,6 g/100 g suve mase i 13,47 g/100 g suve mase), dok je najniža vrednost manitola zabeležena u bazidiokarpima *L. quietus* (3,67 g/100 g suve mase) i *A. mellea* (5,92 g/100 g suve mase). Trehaloza je zastupljena u svim uzorcima sem u uzorku *R. rosea*. Sadržaj trehaloze kod svih analiziranih vrsta po rastućem redosledu je sledeći: *R. integra* (0,2 g/100 g) < *L. quietus* (0,77 g/100 g) < *L. vellereus* (0,77 g/100 g) < *A. mellea* (1,72 g/100 g) < *R. nigricans* (7,2 g/100 g) < *L. piperatus* (17,78 g/100 g). Jedino je kod vrsta *R. integra* i *R. nigricans* zabeleženo prisustvo sve tri vrste šećera. Dobijeni rezultati su pokazali da ukupni sadržaj identifikovanih šećera testiranih makromiceta varira u širokom opsegu od 7,65 g/100 g suve mase kod *A. mellea* do 42 g/100 g suve mase kod *R. nigricans*.

Najzastupljeniji šećeri u plodonosnim telima makromiceta su manitol i trehaloza, dok su fruktoza i saharoza prisutni u manjim količinama (Valverde i dr., 2015). U uzorku *A. mellea* iz Portugala dominira trehaloza (9,33 g/100g suve mase), dok je u uzorku iz Srbije dominantan manitol (5,45 g/100g suve mase). Takođe, osim trehaloze, uzorak iz Portugala sadrži i manitol (5,45 g/100g suve mase) i arabinozu (0,78 g/100g suve mase) (Vaz i dr., 2011) Istraživanja su pokazala da se kod samoniklih vrsta u odnosu na poreklo uzorka, vrsta šećera i njihova zastupljenost razlikuju (Stajić, 2015). Trehaloza je takođe dominantan šećer u plodonosnim telima *L. piperatus* poreklom iz Portugala. Opseg vrednosti sadržaja trehaloze u različitim fazama zrelosti plodonosnog tela *L. piperatus* iznosio je 0,83 – 1,20 g/100g (Barros i dr., 2007b). Trehaloza je takođe dominantan šećer i u uzorku iz Srbije ali u dosta većoj količini (17,78 g/100g suve mase). Alkoholni šećeri, pre svega manitol, su odgovorni za čvrstinu i volumen plodonosnog tela gljiva, što objašnjava veći sadržaj manitola u zrelijim plodonosnim telima *L. piperatus* (Barros i dr., 2007b; Stajić 2015). Reis i dr. (2011) su saopštili da bazidiokarpi vrste *L. quietus* sadrže 9,84 g/100g suve mase manitola i 4,73 g/100g suve mase trehaloze, dok su vrednosti pomenutih šećera u testiranom uzorku iz Srbije znatno niže (Tabela 7). Za razliku od sadržaja šećera kod vrsta *L. piperatus* i *L. quietus*, bazidiokarpi *L. vellereus* poreklom iz Portugala su bogatiji manitolom (24,77 g/100 g suve mase), dok je trehaloza zastupljena u manjoj količini (2,41 g/100 g suve mase) (Heleno i dr., 2012). Na osnovu navedenih istraživanja može se zaključiti da su plodonosna tela *L. vellereus* najbogatija manitolom, dok su bazidiokarpi *L. quietus* najbogatiji trehalozom. Od testiranih vrsta roda *Lactarius*, *L. vellereus* je takođe najbogatija manitolom, ali za razliku od uzorka *L. piperatus* iz Portugala, testirani uzorak vrste *L. piperatus* iz Srbije sadrži najviše trehaloze. Ukupan sadržaj šećera u plodonosnim telima uzoraka iz Portugala po opadajućem redosledu je: *L. vellereus* > *L. quietus* > *L. piperatus*; dok je ukupan sadržaj šećera u plodonosnim telima testiranih uzoraka iz Srbije sledeći: *L. piperatus* > *L. vellereus* > *L. quietus*. Malobrojni su literaturni podaci o sadržaju šećera testiranih vrsta roda *Russula*. Butkhuip i dr. (2017) ispitivali su sadržaj šećera 9 vrsta roda *Russula* (među njima i *R. nigricans*), poreklom sa Tajlanda. Rezultati su pokazali da je u uzorku *R. nigricans* manitol jako zastupljen šećer (98,03 g/kg suve mase) dok su pored njega detektovani u manjim količinama i arabitol (38,12 g/kg suve mase), glukoza (23,86 g/kg suve mase), sukroza (4,58 g/kg suve mase), fruktoza (1,52 g/kg suve mase), sorbitol (1,06 g/kg suve mase) i ksilitol (0,89 g/kg suve mase). Manitol (20,14 g/100g suve mase) je jedini šećer prisutan u plodonosnom telu *R. sardonis* poreklom iz Portugala (Reis i dr., 2011).

Kvalitativna i kvantitativna analiza šećera je važna iz nekoliko razloga. Prvo, jer utiču na ukus jestivih makromiceta (povećanje osećaja slatkog ukusa) i jer je količina šećera važan pokazatelj uslova skladištenja i čuvanja (Cardoso i dr., 2019; Sławińska i dr., 2021). Osim toga,

manitol kao najzastupljeniji šećer kod većine makromiceta ima važnu ulogu u regulaciji osmotskog pritiska u ćelijama i uklanjanju RONS-a (Zhao i dr., 2019).

Tabela 7. Sadržaj šećera u bazidiokarpima testiranih vrsta makromiceta (g/100g suve mase ± SD).

Šećeri	Testirane makromicete						
	<i>Armillaria mellea</i>	<i>Lactarius piperatus</i>	<i>Lactarius quietus</i>	<i>Lactarius vellereus</i>	<i>Russula integra</i>	<i>Russula nigricans</i>	<i>Russula rosea</i>
Fruktoza	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	0,347 ± 0,002	0,39 ± 0,01	n.i.
Manitol	5,92 ± 0,2	5,81 ± 0,28	3,67 ± 0,04	13,47 ± 0,04	14,6 ± 0,3	34 ± 1	25,84 ± 0,26
Trehaloza	1,72 ± 0,01	17,78 ± 0,25	0,34 ± 0,01	0,77 ± 0,00	0,202 ± 0,004	7,2 ± 0,5	n.i.
Ukupni sadržaj	7,65 ± 0,2	23,59 ± 0,04	4,01 ± 0,03	14,24 ± 0,40	15,2 ± 0,3	42 ± 1	25,84 ± 0,26

*n.i. – nije identifikovan

4.4.2. Sadržaj tokoferola u bazidiokarpima testiranih vrsta

Rezultati analize sadržaja različitih izoformi tokoferola 7 testiranih vrsta makromiceta su prikazani u Tabeli 8. Analizirano je prisustvo i sadržaj četiri izoformi tokoferola: α , β , γ i δ . Od ukupno 7 testiranih vrsta sadržaj α - tokoferola je izmeren kod četiri vrste: *L. piperatus*, *R. integra*, *R. nigricans* i *R. rosea*. Među njima, najveća vrednost je zabeležena kod vrste *R. nigricans* (100 $\mu\text{g}/100\text{g}$ suve mase). Sadržaj β -tokoferola je izmeren kod sve tri vrste roda *Lactarius* i kod *R. integra*, dok kod ostalih ispitivanih vrsta ova izoforma tokoferola nije zabeležena. Opseg vrednosti β -tokoferola je iznosio 15,8 $\mu\text{g}/100\text{g}$ suve mase (*R. integra*) – 1391 $\mu\text{g}/100\text{g}$ suve mase (*L. vellereus*). γ -tokoferol je nađen u bazidiokarpima kod samo dve vrste testiranih makromiceta: *L. piperatus* (22,06 $\mu\text{g}/100\text{g}$ suve mase) i *R. integra* (766 $\mu\text{g}/100\text{g}$ suve mase). δ -tokoferol zastupljen u uzorcima *A. mellea* (42,41 $\mu\text{g}/100\text{g}$ suve mase), *L. piperatus* (3,1 $\mu\text{g}/100\text{g}$ suve mase), *R. integra* (15,7 $\mu\text{g}/100\text{g}$ suve mase) i *R. nigricans* (42 $\mu\text{g}/100\text{g}$ suve mase). Jedino je kod vrsta *L. piperatus* i *R. integra* zabeleženo prisustvo svih izoformi tokoferola, pri čemu je β -tokoferol dominantna izoforma *L. piperatus*, a γ -tokoferol *R. integra*. Dobijeni rezultati su pokazali da ukupni sadržaj identifikovanih izoformi tokoferola testiranih makromiceta varira u širokom opsegu od 3,75 $\mu\text{g}/100\text{g}$ suve mase (*L. piperatus*) do 1319 $\mu\text{g}/100\text{g}$ suve mase (*L. vellereus*).

Plodonosna tela *A. mellea* poreklom iz Portugala od 4 testirane izoforme tokoferola sadrže dve i to α - i γ -tokoferol u količinama 9,06 $\mu\text{g}/100\text{g}$ suve mase, odnosno 57,96 $\mu\text{g}/100\text{g}$ suve mase (Vaz i dr., 2011), dok je δ - tokoferol dominantan u testiranom uzorku iz Srbije (Tabela 8). Prema navodima Reis i dr. (2011), uzorak *L. quietus* sadrži 3 izoforme tokoferola (α -, γ - i δ - tokoferol) od kojih je dominantna izoforma α -tokoferol (47,98 $\mu\text{g}/100\text{g}$ suve mase), suprotno uzorku iz Srbije u kome je zastupljen samo β - tokoferol (69 $\mu\text{g}/100\text{g}$ suve mase). Međutim, u uzorku *L. vellereus* poreklom iz Portugala zastupljene su 4 izoforme tokoferola, pri čemu je dominantna forma β -tokoferol (242,41 $\mu\text{g}/100\text{g}$ suve mase) (Heleno i dr., 2012), dok je uzorak iz Srbije neobično bogat jedino β - tokoferolom (1391,1 $\mu\text{g}/100\text{g}$ suve mase). Prema podacima iz literature, dominantne izoforme u okviru roda *Lactarius* su promenljive zavisno od vrste, kao i ukupan sadržaj tokoferola koji varira između 15 $\mu\text{g}/100\text{g}$ do 316 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (Heleno i dr., 2010, 2012; Reis i dr., 2011; Vieira i dr., 2014). Literaturni podaci o sadržaju tokoferola testiranih vrsta roda *Russula* su oskudni. Reis i dr. (2011) su pokazali da plodonosna tela *R. sardonica* jedino ne sadrže β - tokoferol, dok je γ -tokoferol dominantna izoforma u uzorku (52,85 $\mu\text{g}/100\text{g}$ suve mase). Za razliku od visokog sadržaja tokoferola u testiranim vrstama roda *Russula*, uzorci vrsta *R. delica* i *R. vesca* iz Portugala su pokazali niske vrednosti ukupnih tokoferola (0,74 $\mu\text{g}/\text{g}$, odnosno 0,88 $\mu\text{g}/\text{g}$) (Heleno i dr., 2010). Tako, oba uzorka sadrže 3 izoforme tokoferola (α -, β - i γ -), pri čemu je u uzorku *R. delica* dominantan γ -tokoferol (0,57 $\mu\text{g}/\text{g}$), a u uzorku *R. vesca* β - tokoferol (0,49 $\mu\text{g}/\text{g}$).

Tabela 8. Sadržaj tokoferola u bazidiokarpima testiranih vrsta makromiceta ($\mu\text{g}/100\text{g}$ suve mase \pm SD).

Tokoferoli	Testirane makromicete						
	<i>Armillaria mellea</i>	<i>Lactarius piperatus</i>	<i>Lactarius quietus</i>	<i>Lactarius vellereus</i>	<i>Russula integra</i>	<i>Russula nigricans</i>	<i>Russula rosea</i>
α -tokoferol	n.i.	3,79 \pm 1,0	n.i.	n.i.	13,1 \pm 0,4	100 \pm 3	19,5 \pm 0,3
β - tokoferol	n.i.	47,43 \pm 1,51	69,0 \pm 0,8	1391,1 \pm 21,4	15,8 \pm 0,8	n.i.	n.i.
γ - tokoferol	n.i.	26,06 \pm 0,11	n.i.	n.i.	766 \pm 2	n.i.	n.i.
δ - tokoferol	42,41 \pm 4,10	3,1 \pm 0,70	n.i.	n.i.	15,7 \pm 0,4	42 \pm 4	n.i.
Ukupni sadržaj	42,41 \pm 4,10	80,38 \pm 3,3	69,0 \pm 0,8	1391,1 \pm 21,4	810 \pm 3	142 \pm 1	19,5 \pm 0,3

*n.i. – nije identifikovan

4.4.3. Sadržaj organskih kiselina u bazidiokarpima testiranih vrsta

Bazidiokarpi testiranih vrsta iz rodova *Armillaria*, *Lactarius*, i *Russula* analizirani su sa ciljem utvrđivanja prisustva ukupnog sadržaja organskih kiselina (Tabela 9). Analizirano je prisustvo i sadržaj oksalne, kininske, jabučne, limunske i fumarne kiseline. Oksalna kiselina je zabeležena u bazidiokarpima svih vrsta osim *R. nigricans*. Opseg vrednosti oksalne kiseline bio je 0,029 (*A. mellea*) – 3,9 g/100g suve mase (*L. vellereus*). Kininska kiselina je identifikovana u bazidiokarpima tri vrste, a najvišu vrednost je imala u uzorku *R. nigricans* (11,26 g/100 g suve mase). U bazidiokarpima ostalih vrsta je zabeležena znatno niža vrednost kininske kiseline i to 0,33 g/100 g suve mase kod *L. piperatus* i 1,56 g/100 g suve mase kod *R. integra*. Za razliku od oksalne i kininske kiseline, jabučna kiselina je bila zastupljena u većini testiranih uzorka, osim *L. quietus* i *L. vellereus*. Opseg vrednosti jabučne kiseline bio je 0,60 (*R. nigricans*) – 6,32 g/100g suve mase (*L. piperatus*). Limunska kiselina je u malim količinama nađena u bazidiokarpima *A. mellea* (0,57 g/100g suve mase) i *L. piperatus* (0,52g/100g suve mase), dok je samo kod *L. vellereus* prisutna u većoj količini (8,5 g/100g suve mase). Takođe, i fumarina kiselina je u bazidiokarpima testiranih vrsta zastupljena u malim količinama: 0,02 g/100g suve mase (*R. nigricans*); 0,08 g/100g suve mase (*R. integra*); 0,33 g/100g suve mase (*L. piperatus*) i 0,52 g/100g suve mase (*A. mellea*), dok je kod vrsta *L. quietus*, *L. vellereus* i *R. nigricans* prisutna samo u tragovima. Jedino je kod vrste *L. piperatus* zabeleženo prisustvo svih testiranih organskih kiselina, pri čemu je jabučna kiselina bila najzastupljenija. Dobijeni rezultati su pokazali da ukupni sadržaj identifikovanih organskih kiselina testiranih makromiceta varira u širokom opsegu od 3,04 g/100 g suve mase kod *R. integra* do 12,4 g/100 g suve mase kod *L. vellereus*.

Pregledom literature nađeno je samo nekoliko istraživanja koja se odnose na sadržaj organskih kiselina proučavanih vrsta. Dominantna kiselina u uzorku *A. mellea* poreklom iz Portugala je jabučna (13,77 mg/g suve mase), dok su oksalna, kininska i fumarina prisutne u znatno manjim količinama (Barros i dr., 2013). Jabučna kiselina je dominantna i u uzorku iz Srbije (Kostić i dr., 2017), ali za razliku od uzorka iz Portugala identifikovana je i limunska kiselina, dok kininska kiselina nije detektovana. Ukupni sadržaj organskih kiselina u oba uzorka se znatno razlikovao. Uzorak iz Portugala je ukupno sadržao 26,12 mg/g suve mase organskih kiselina, dok je u uzorku iz Srbije ukupni sadržaj znatno viši (6,76 g/100g suve mase). Za većinu testiranih vrsta u ovoj disertaciji (*L. piperatus*, *L. quietus* i *L. vellereus*) nisu nađeni podaci o sadržaju organskih kiselina bazidiokarpa. Međutim postoje podaci o profilu organskih kiselina kod drugih vrsta roda *Lactarius*. Naime, Vieira i dr. (2014) su u uzorcima bazidiokarpa vrsta *Lactarius turpis* i *L. citrolens* identifikovali i kvantifikovali oksalnu, jabučnu, fumarinu i kininsku kiselinu, pri čemu je oksalna kiselina bila dominantna u uzorku *L. turpis* a jabučna i fumarina u uzorku *L. citrolens*. Isti autori navode da je kininska kiselina detektovana samo u uzorku *L. citrolens*. Takođe, ispitivan je sadržaj organskih kiselina i kod vrsta *Lactarius volemus* i *L. deliciosus* poreklom iz Portugala, i istraživanja su pokazala da je jabučna kiselina dominantna u oba uzorka (Valentão i dr., 2007; Barros i dr., 2013). *Russula delica* i *R. olivacea*, najproučavanije vrste roda *Russula* u svojim plodonosnim telima sadrže oksalnu, jabučnu i fumarinu kiselinu, pri čemu je jabučna kiselina dominantna organska kiselina u oba uzorka poreklom iz Portugala (Barros i dr., 2013). Ribeiro i dr. (2008a) ispitivali su da li se sadržaj i sastav organskih kiselina *R. cyanoxantha*, poreklom iz Portugala, razlikuje zavisno od dela plodonosnog tela (drška, šešir i celo plodonosno telo). Ova istraživanja su pokazala da su jabučna i kininska kiselina dominantne u sva tri ispitivana uzorka, pri čemu su otkrili da je sadržaj limunske i kininske kiseline viši u šeširu gljive, dok je vrednost jabučne kiseline znatno niži nego u uzorku drške.

Jabučna kiselina se prirodno nalazi u svim vrstama voća i povrća. Zaslužna je za kiselkasti ukus voća, a često se koristi i kao aditiv u industriji hrane (Barros i dr., 2013). Fumarina kiselina koja je u malim količinama prisutna u bazidiokarpima svih testiranih vrsta je značajna zbog svog antioksidantnog i antimikrobnog potencijala (Ribeiro i dr., 2008b). Kininska kiselina koja se dobija iz prvenstveno biljnih proizvoda predstavlja početni materijal za sintezu mnogih novih

farmaceutskih proizvoda (Barros i dr., 2013). Dok je limunska kiselina jako važna u prevenciji tamnjenja plodonosnog tela, pri čemu produžava život gljivama jer poseduje antibakterijsku i antioksidantnu aktivnost (Ribeiro i dr., 2008b).

Tabela 9. Sadržaj organskih kiselina u bazidiokarpima testiranih vrsta makromiceta (g/100g suve mase ± SD).

Organske kiseline	Testirane makromicete						
	<i>Armillaria mellea</i>	<i>Lactarius piperatus</i>	<i>Lactarius quietus</i>	<i>Lactarius vellereus</i>	<i>Russula integra</i>	<i>Russula nigricans</i>	<i>Russula rosea</i>
Oksalna kiselina	0,029 ± 0,001	1,9 ± 0,25	3,7 ± 0,1	3,9 ± 0,2	0,110 ± 0,003	n.i.	1,7 ± 0,01
Kininska kiselina	n.i.	0,33 ± 0,14	n.i.	n.i.	1,56 ± 0,03	11,26 ± 0,01	n.i.
Jabučna kiselina	5,64 ± 0,13	6,32 ± 1,41	n.i.	n.i.	1,29 ± 0,02	0,60 ± 0,01	2,06 ± 0,09
Limunska kiselina	0,572 ± 0,005	0,52 ± 0,12	n.i.	8,5 ± 3	n.i.	n.i.	n.i.
Fumarna kiselina	0,521 ± 0,001	0,33 ± 0,03	tr.	tr.	0,080 ± 0,001	0,020 ± 0,001	tr.
Šikminska kiselina	n.i.	n.i.	n.i.	0,49 ± 0,02	n.i.	n.i.	n.i.
Ukupni sadržaj	6,76 ± 0,13	9,4 ± 1,95	3,7 ± 0,1	12,4 ± 0,4	3,04 ± 0,05	11,89 ± 0,02	3,76 ± 0,1

*n.i. – nije identifikovan; tr. – u tragovima.

4.4.4. Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktima bazidiokarpa testiranih vrsta

Rezultati analize sadržaja fenolnih kiselina u metanolnim i etanolnim ekstraktima testiranih vrsta makromiceta prikazani su u Tabeli 10. U analiziranim uzorcima identifikovane su *p*-hidroksibenzoeva kiselina, cinaminska kiselina i protokatehinska kiselina (Tabela 10). Sa oba ekstraktanta *p*-hidroksibenzoeva kiselina je identifikovana u obe vrste ekstrakata za vrste *A. mellea*, *L. quietus* i *L. vellereus*. Od pomenutih vrsta najviše vrednosti *p*-hidroksibenzoeve kiseline zabeležene su u uzorcima metanolnog (795 µg/g ekstrakta) i etanolnog (4735 µg/g ekstrakta) ekstrakta *L. quietus*. Cinaminska kiselina je identifikovana kod ME vrsta *A. mellea*, *L. piperatus*, *L. quietus*, i *R. rosea* u opsegu 8,5 – 72,89 µg/g ekstrakta. Dok je u uzorcima EE bila nađena kod vrsta *L. piperatus*, *L. quietus*, i *R. rosea*, u opsegu 5,2 – 126 µg/g ekstrakta. Protokatehinska kiselina je nađena jedino kod vrste *L. vellereus* u metanolnom (20 µg/g ekstrakta), i u etanolnom (11,4 µg/g ekstrakta) ekstraktu. Jedina vrsta kod koje ni u jednom ekstraktu nije identifikovana nijedna fenolna kiselina bila je *R. integra*.

Ekstrakti bazidiokarpa vrste *A. mellea* poreklom iz Portugala, sadržali su 4 mg/kg suve mase *p*-hidroksibenzoeve kiseline i 8,67 mg/kg suve mase cinaminske kiseline (Vaz i dr., 2011), dok je kod uzorka iz Poljske identifikovana jedino protokatehinska (2,23 mg/kg suve mase) i sinapinska kiselina (3,77 mg/kg suve mase) (Muszynska i dr., 2013). Barros i dr. (2009) su kvantifikovali jedino *p*-hidroksibenzoevu kiselinu u uzorku *L. delicious* (22,66 mg/kg suve mase), dok je u uzorku *L. quietus* iz Portugala prisutna samo cinaminska kiselina (0,70 mg/100g suve mase) (Reis i dr., 2011). Ekstrakt bazidiokarpa *L. vellereus* iz Portugala je pokazao prisustvo protokatehinske, *p*-hidroksibenzoeve, *p*-kumarne i cinaminske kiseline (Heleno i dr., 2012), dok je u analiziranim ekstraktima iz Srbije potvrđeno prisustvo protokatehinske i *p*-hidroksibenzoeve kiseline (Tabela 10). U oba slučaja dominantna je bila protokatehinska kiselina. Veliki udeo u uzorku *R. delica* poreklom iz Grčke činile su hidroksibenzoeve i hidroksicinaminske kiseline, od kojih je dominantna bila *p*-hidroksibenzoeva kiselina, odnosno *o*-kumarna kiselina (Kalogeropoulos i dr., 2013), za razliku od testiranih vrsta iz Srbije u kojima nije detektovano prisustvo navedenih fenolnih kiselina (Tabela 10). U ekstraktima iste vrste poreklom iz Portugala i Turske detektovane su *p*-hidroksibenzoeva kiselina, galna i kafeična kiselina, dok *p*-kumarna, vanilinska i cinaminska kiselina nisu detektovane, za razliku od testiranog uzorka iz Grčke (Yaltirak i dr., 2009). U plodonosnom telu vrste *R. sardonia* poreklom iz Portugala nisu detektovane hidroksibenzoeve kiseline, već samo cinaminska kiselina (Reis i dr., 2011). Tripathy i dr., (2016) su ispitivali ukupan sadržaj fenola u ME *R. nigricans* i *R. lepida* poreklom iz Indije, i pokazali su da obe vrste sadrže približno istu količinu fenolnih jedinjenja (4,55 mg/g ekstrakta odnosno 3,20 mg/g ekstrakta).

Tabela 10. Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktima bazidiokarpa testiranih vrsta makromiceta ($\mu\text{g/g}$ ekstrakta \pm SD).

Makromicete	Ekstrakt	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	Cinaminska kiselina	Protokatehinska kiselina	Ukupni sadržaj
<i>Armillaria mellea</i>	Metanolni	36,71 \pm 0,76	72,89 \pm 0,05	n.i.	109,60 \pm 0,81
	Etanolni	9,37 \pm 0,03	n.i.	n.i.	9,37 \pm 0,03
<i>Lactarius piperatus</i>	Metanolni	n.i.	8,5 \pm 0,4	n.i.	8,5 \pm 0,5
	Etanolni	n.i.	5,2 \pm 0,2	n.i.	5,2 \pm 0,2
<i>Lactarius quietus</i>	Metanolni	795 \pm 3	23,8 \pm 0	n.i.	818,8 \pm 3
	Etanolni	4735 \pm 9	126 \pm 3	n.i.	4861 \pm 9
<i>Lactarius vellereus</i>	Metanolni	2,0 \pm 0,2	n.i.	4,2 \pm 0,3	6,2 \pm 0,5
	Etanolni	2,5 \pm 0,2	n.i.	11,4 \pm 0,5	13,9 \pm 0,4
<i>Russula integra</i>	Metanolni	n.i.	n.i.	n.i.	/
	Etanolni	n.i.	n.i.	n.i.	/
<i>Russula nigricans</i>	Metanolni	n.i.	n.i.	n.i.	/
	Etanolni	101 \pm 5	n.i.	n.i.	101 \pm 5
<i>Russula rosea</i>	Metanolni	n.i.	20,0 \pm 0,1	n.i.	20,0 \pm 0,1
	Etanolni	n.i.	89 \pm 2	n.i.	89 \pm 2

*n.i. – nije identifikovan

4.4.5. Sadržaj masnih kiselina u bazidiokarpima testiranih vrsta

Analizom masnih kiselina u bazidiokarpima testiranih vrsta makromiceta identificirano je 29 masnih kiselina. Palmitinska, stearinska, oleinska i linolna kiselina su procentualno najzastupljenije masne kiseline kod svih analiziranih vrsta (Tabela 11). U bazidiokarpu *A. mellea* dominantna je linolna kiselina (63,8%), dok su oleinska (15,47%), palmitinska (12,63%) i stearinska (2,84%) znatno manje zastupljene. Analiza uzoraka vrsta roda *Lactarius* je pokazala da su kod sve tri vrste dominantne različite kiseline, kao i njihov odnos. U bazidiokarpima vrste *L. piperatus* dominantne se stearinska (42,09%) i oleinska (36,89%) kiselina, dok su linolna (11,94%) i palmitinska (4,93%) znatno manje zastupljene. Kod vrste *L. quietus* zastupljenost oleinske (40,40%) i linolne kiseline (19,2%) je slična kao kod vrste *L. piperatus*, dok je zastupljenost palmitinske (20,13%) i stearinske kiseline (10,11%) različita. U bazidiokarpu *L. vellereus* dominantna je stearinska kiselina (58,19%), dok su oleinska (17,6%), linolna (12,14%) i palmitinska (10,01%) znatno manje prisutne. Analiza bazidiokarpa tri vrste roda *Russula* je pokazala različitu procentualnu zastupljenost dominantnih masnih kiselina (linolna, stearinska, oleinska i palmitinska). Pa tako dominantna kiselina u bazidiokarpima *R. integra* i *R. nigricans* bila je linolna kiselina sa zastupljenošću od 38,2% odnosno 52%, dok su u bazidiokarpima *R. rosea* najzastupljenije bile stearinska (36,3%) i oleinska (35,74%) kiselina. Opseg vrednosti palmitinske kiseline kod sve tri vrste je iznosio 8,8% – 16,6%. Stearinska kiselina je u uzorcima *R. integra* (6,57%) i *R. nigricans* (7,8%) bila znatno manje zastupljena od ostalih opisanih masnih kiselina. Takođe, palmitinska (12%) i linolna kiselina (13,39%) su u uzorku *R. rosea* bile prisutne u sličnom procentu. Pored gorepomenutih, ostale masne kiseline su zastupljene sa udelom manjim od 2%, ili u nekim bazidiokarpima nisu ni identifikovane. Analiza odnosa ukupnog udela zasićenih, nezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina je pokazala da odnosi variraju od vrste do vrste. Pa tako, polinezasićene masne kiseline (PNZK) dominiraju u bazidiokarpima vrsta *A. mellea*, *R. integra* i *R. nigricans*; zasićene (ZMK) kod *L. piperatus*, *L. vellereus* i *R. rosea*; dok je *L. quietus* jedina vrsta gde su nezasićene masne kiseline (NZMK) dominantne (Tabela 11).

Najzastupljenija masna kiselina u bazidiokarpima *A. mellea* poreklom iz Portugala bila je oleinska kiselina (47,74%) (Vaz i dr., 2011), za razliku od uzorka iz Srbije, u kom je dominantna linolna masna kiselina (63,8%) (Tabela 11). Međutim, rezultati naših istraživanja su u korelaciji sa ispitivanjima uzoraka *A. mellea* iz Turske i SAD-a, koji su sadržali najviše linolne kiseline (Yilmaz i dr., 2006; Cox i dr., 2006). Takođe, uzorak iz Portugala je sadržao više NZMK (55,01%) (Vaz i dr., 2011), dok je uzorak iz Srbije imao veći sadržaj PNZK. Najzastupljenije masne kiseline u bazidiokarpima *L. piperatus* iz Portugala su stearinska, zatim linolna i oleinska (Barros i dr., 2007a). Takođe, ukupan sadržaj ZMK je veći od nezasićenih što je u skladu sa dobijenim vrednostima u ovoj disertaciji. Dominantne masne kiseline u bazidiokarpima *L. quietus* iz Portugala su linolna (35,15%) i oleinska (24,55%), (Reis i dr., 2011) kao i u testiranom uzorku iz Srbije (19,2%, odnosno 0,40%). Uzorak iz Portugala je bogatiji PNZK, dok uzorak bazidikarpa *L. quietus* iz Srbije sadrži više NZMK. Prema navodima Heleno i dr., (2012), dominantne masne kiseline u bazidiokarpima *L. vellereus* su stearinska (58,33%) i linolna (22,13%), takođe sadržaj ZMK u uzorku iz Portugala je znatno viši od sadržaja NZMK i PNZK. Sadržaj masnih kiselina uzorka *L. vellereus* iz Portugala je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima za bazidiokarpe *L. vellereus* iz Srbije (Tabela 11). Linolna (44,32%) i stearinska (27,10%) kiselina su dominantne masne kiseline u bazidiokarpima *R. delica* poreklom iz Grčke (Kalogeropoulos i dr., 2013), za razliku od testiranih vrsta roda *Russula* u čijim su bazidiokarpima dominantne linolna i oleinska kiselina (Tabela 11). Takođe, oleinska i linolna kiselina su dominantne kiseline kod *R. sardonica* poreklom iz Portugala (Reis i dr., 2011). Pokazano je da stearinska kiselina ima visok antibakterijski potencijal, dok je za linolnu kiselinu dokazano da je glavna aromatična komponenta većine gljiva (Vieira i dr., 2014).

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 11. Sadržaj masnih kiselina u bazidiokarpima testiranih vrsta makromiceta (% ± SD).

Masne kiseline	<i>Armillaria mellea</i>	<i>Lactarius piperatus</i>	<i>Lactarius quietus</i>	<i>Lactarius vellereus</i>	<i>Russula integra</i>	<i>Russula nigricans</i>	<i>Russula rosea</i>
Heksanska (C6:0)	0,119 ± 0,001	0,03 ± 0	0,37 ± 0,02	n.i.	n.i.	n.i.	0,39 ± 0,02
Kaprilna (C8:0)	0,074 ± 0,002	0,01 ± 0	0,13 ± 0	n.i.	0,12 ± 0,01	0,042 ± 0,001	0,085 ± 0,001
Dekanska (C10:0)	0,044 ± 0,001	0,07 ± 0	3,56 ± 0,15	n.i.	0,093 ± 0,008	0,159 ± 0,007	0,197 ± 0,001
Laurinska (C12:0)	0,62 ± 0,02	0,02 ± 0	0,272 ± 0,011	0,04 ± 0,0	2,20 ± 0,03	0,079 ± 0,05	n.i.
(C13:0)	n.i.	n.i.	0,11 ± 0	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Miristinska (C14:0)	0,32 ± 0,005	0,17 ± 0,01	0,705 ± 0,025	0,27 ± 0,01	2,53 ± 0,04	0,241 ± 0,006	0,61 ± 0,02
Miristoleinska (C14:1)	0,024 ± 0,001	n.i.	n.i.	n.i.	0,126 ± 0,006	n.i.	n.i.
Pentadekanska (C15:0)	0,66 ± 0,01	0,55 ± 0,01	2,3 ± 0,1	0,46 ± 0,01	1,1 ± 0,1	0,35 ± 0,01	0,33 ± 0,01
Palmitinska (C16:0)	12,63 ± 0,018	4,93 ± 0,03	20,133 ± 0,385	10,006 ± 0,181	16,6 ± 0,2	8,8 ± 0,3	12,0 ± 0,3
Palmitoleinska (C16:1)	1,7 ± 0,03	0,11 ± 0	1,6 ± 0,0	0,29 ± 0,01	1,55 ± 0,01	0,80 ± 0,01	n.i.
Heptadekanska (C17:0)	0,154 ± 0,002	0,12 ± 0	0,20 ± 0,04	n.i.	0,572 ± 0,006	0,127 ± 0,001	0,88 ± 0,03
Stearinska (C18:0)	2,839 ± 0,001	42,09 ± 0,14	10,11 ± 0,12	58,195 ± 0,977	6,57 ± 0,02	7,8 ± 0,3	36,3 ± 0,5
Oleinska (C18:1n9c)	15,47 ± 0,06	36,89 ± 0,41	40,40 ± 0,40	17,6 ± 0,8	21,85 ± 0,04	27,1 ± 0,1	35,74 ± 0,06
Linolna (C18:2n6c)	63,8 ± 0,16	11,94 ± 0,16	19,2 ± 0,01	12,147 ± 0,018	38,2 ± 0,2	52,0 ± 0,7	13,39 ± 0,06
α-Linoleinska (C18:3n3)	0,09 ± 0,01	0,02 ± 0	n.i.	0,2 ± 0,0	1,45 ± 0,03	0,061 ± 0,001	n.i.
γ-Linoleinska (C18:3n6)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	3,27 ± 0,09	n.i.	n.i.
Arahidinska (C20:0)	0,105 ± 0,001	1,21 ± 0,04	n.i.	0,20 ± 0,0	1,98 ± 0,01	0,210 ± 0,004	n.i.

REZULTATI I DISKUSIJA

cis-11-Eikozenoinska (C20:1)	0,091 ± 0,001	0,13 ± 0	n.i.	n.i.	0,082 ± 0,001	0,247 ± 0,002	n.i.
cis-11,14-Eikozenoinska (C20:2)	0,037 ± 0,001	0,02 ± 0	n.i.	n.i.	0,58 ± 0,03	0,11 ± 0,01	n.i.
Eikozetrionska (C20:3n3)	0,08 ± 0 02	0,02 ± 0	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
cis-8,11,14-Eikozetrionska (C20:3n6)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	0,274 ± 0,001	n.i.	n.i.
Eikopentaenoinska (C20:5n3)	0,115 ± 0,004	0,01 ± 0	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Behenska (C22:0)	0,22 ± 0,01	0,5 ± 0,03	n.i.	0,29 ± 0,01	n.i.	0,264 ± 0,003	n.i.
C22:1	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	0,21 ± 0,01	0,16 ± 0,01	n.i.
Erukinska (C22:1n9)	0,026 ± 0,005	0,01 ± 0	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Cis-13,16-dokosadienoinska (C22:2)	n.i.	n.i.	0,56 ± 0,01	n.i.	n.i.	0.207±0,001	n.i.
Trikozilna (C23:0)	0,045 ± 0,003	0,04 ± 0	0,41 ± 0,01	n.i.	0,149 ± 0,006	1.17±0.06	n.i.
Lignocerinska (C24:0)	0,59 ± 0,03	1,1 ± 0,08	n.i.	0,34 ± 0,01	0.425±0.006	0.16±0.01	n.i.
Ceramid (C24:1)	0,16 ± 0,02	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Ukupne ZMK (% ukupnih MK)	18,42 ± 0,18	50,83 ± 0,25	38,30 ± 0,54	69,80 ± 0,80	32,4 ± 0,3	19,4 ± 0,6	50,9 ± 0,1
Ukupne NZMK (% ukupnih MK)	17,47 ± 0,05	37,15 ± 0,41	41,95 ± 0,40	17,89 ± 0,77	23,81 ± 0,04	28,3 ± 0,1	35,74 ± 0,06
Ukupne PNZK (% ukupnih MK)	64,12 ± 0,13	12,02 ± 0,15	19,75 ± 0,14	12,31 ± 0,02	43,8 ± 0,3	52,3 ± 0,7	13,39 ± 0,06

*n.i. – nije identifikovan; ZMK – zasićene masne kiseline; NZMK – nezasićene masne kiseline; PNZK – polinezasićene masne kiseline.

4.5. Hemijski sastav odabranih komercijalnih etarskih ulja

Analizom hemijskog sastava etarskog ulja *Origanum minutiflorum* (divlji origano), identifikovano je 25 komponenti. Dominantno jedinjenje u etarskom ulju divljeg origana je karvakrol sa zastupljenošću od 81,5%. Jedinjenja manje zastupljena u uzorku su bila: *para*-cimen (3,7%), borneol (2,3%), γ -terpinen (1,7%), terpinen-4-ol (1,5%), *cis*-kariofilen (1,4%), β -bisabolen (1,3%) i timol (1,2%). Dominantna grupa jedinjenja bili su oksidovani terpeni sa zastupljenošću od 87,92% (Tabela 12).

Na osnovu literaturnih podataka vidi se da je hemijski sastav etarskog ulja *O. minutiflorum* za razliku od ulja *O. vulgare* slabo ispitan. Baser i dr. (1993), su analizirali hemijski sastav *O. minutiflorum* etarskog ulja, poreklom sa više lokaliteta u Turskoj. Rezultati pokazuju da je dominantno jedinjenje karvakrol sa zastupljenošću 75,4 – 83,6% u uzorku, zavisno od lokaliteta, što je u saglasnosti sa rezultatima ovih istraživanja. Takođe, *p*-cimen je drugo po zastupljenosti jedinjenje u uzorcima poreklom iz Turske (Baser i dr., 1993). Slične rezultate (karvakrol 74% i *p*-cimen 7,20%) su dobili i Altundag i dr. (2011) analizom etarskog ulja divljeg origana takođe poreklom iz Turske. Sokmen i dr., (2020) hemijskom analizom su identifikovali 64 komponenti etarskog ulja *O. minutiflorum* isto poreklom iz Turske, od kojih je najzastupljeniji karvakrol sa 64,29%, zatim *p*-cimen sa 9,56%. Literaturni podaci ukazuju da sadržaj karvakrola u ulju divljeg origana, varira od uzorka do uzorka, zavisno od lokaliteta, klimatskih uslova tokom branja biljke, kao i trajanja procesa hidrodestilacije (Toker i dr., 2017; Sokmen i dr., 2020). Prema navodima brojnih autora sadržaj karvakrola u etarskom ulju divljeg origana varira od 50,04% – 90,87% (Demirel i Erdogan, 2017; Toker i dr., 2017; Albayrak i Aksoy, 2019).

Analizom hemijskog sastava etarskog ulja *Coriandrum sativum* (korijander), identifikovano je 17 komponenti. Dominantno jedinjenje u etarskom ulju korijandera je linalol sa zastupljenošću od 69,6%. Jedinjenja manje zastupljena u uzorku su bila: *para*-cimen (4,8%), α -pinen (4,6%), γ -terpinen (4,7%), limonen (4,4%), kamfor (4,5%), geraniol (2%), i geranil acetat (1,6%). Dominantna grupa jedinjenja bili su oksidovani terpeni sa zastupljenošću od 80,08%. Pored gorepomenutih, ostale komponente testiranih etarskih ulja su zastupljene sa udelom manjim od 1 %, ili nisu ni identifikovane (Tabela 12).

Etarskog ulje iz semena korijandera je najviše proučavano širom sveta, a njegov hemijski profil pokazuje da je ovo etarsko ulje, poreklom iz različitih regiona, najbogatije oksidovanim monoterpenima i to linalolom kao najzastupljenijim jedinjenjem (Laribi i dr., 2015). Tako, etarsko ulje korijandera poreklom iz Tunisa sadrži 87,54% linalola, dok je druga najzastupljenija komponenta *cis*-dihidrokarvon (2,36%) (Msaada i dr., 2007). Međutim, ulje korijandera poreklom iz Alžira pored linalola (73,1%), u visokim koncentracijama sadrži i *p*-menta-1,4-dien-7-ol (6,51%), α -pinen (3,41%) i neril acetat (3,22%) (Zoubiri, 2010). Takođe, linalol (40,9 – 79,9%), γ -terpinen (0,1 – 13,6%), α -pinen (1,2 – 7,1%) i neril acetat (2,3 – 14,2%) su najzastupljenije komponente etarskog ulja korijandera poreklom iz Irana, dok je u testiranom uzorku iz Bangladeša odnos glavnih komponenti dosta različit u odnosu na prethodno analizirane uzorke i to: linalol (37,65%), γ -terpinen (14,42%) i geranil acetat (17,57%) (Bhuiyan i dr., 2009; Nejad Ebrahimi i dr., 2010). Isto ulje poreklom iz Kanade i Brazila, je pokazalo visok procenat linalola (84,6, odnosno 77,48%), kao i visoku zastupljenost kamfora i α -pinena (De Figueiredo i dr., 2004; Zheljaskova i dr., 2008). Linalol i kamfor su dominantna jedinjenja u uzorku etarskog ulja *C. sativum* poreklom iz Srbije (Elgndi i dr., 2017). Varijacije u zastupljenosti određenih jedinjenja u etarskim uljima širom sveta posledica su različitih genetičkih, klimatskih i geografskih uslova koji su karakteristični za određeni region i koji u velikoj meri utiču na sastav etarskih ulja (Laribi i dr., 2015). Dodatna istraživanja su pokazala da vreme setve (Zheljaskova i dr., 2008), razvojna faza i stadijum zrelosti biljke (Mandal i Mandal, 2015), kao i abiotički faktori (sadržaj vode i salinitet) (Neffati i Marzouk, 2008; Hassan i Ali., 2014), kao i različite tehnike ekstrakcije mogu uticati na prinos i hemijski sastav etarskog ulja korijandera (Kosar i dr., 2005).

Etarska ulja su jako osetljiva na uslove skladištenja, zbog čega može doći do promene u sastavu usled neadekvatnog i/ili dugog skladištenja. Ukoliko se etarska ulja čuvaju na svetlosti, svetlost indukuje oksidativne procese koji dovode do modifikacija u hemijskoj strukturi terpena. Shodno tome, ove modifikacije utiču na organoleptičke osobine etarskih ulja, a mogu dovesti i do gubitka kvaliteta ulja i njegovih farmakoloških/bioloških aktivnosti (Laribi i dr., 2015).

Tabela 12. Hemijski sastav testiranih etarskih ulja (%).

RI	Komponente (%)	<i>Origanum minutiflorum</i>	<i>Coriandrum sativum</i>
904	α -Tujen	n.i.	0,9
909	α -Pinen	0,5	n.i.
910	α -Pinen	n.i.	4,6
922	Kamfen	0,3	n.i.
923	Kamfen	n.i.	0,1
949	Sabinen	n.i.	n.i.
950	β -Pinen	0,1	n.i.
951	Mircen	n.i.	0,4
969	Mircen	0,6	n.i.
980	α -Felandren	0,1	n.i.
993	α -Terpinen	0,7	n.i.
1002	<i>para</i> -Cimen	3,7	n.i.
1005	β -Felandren	0,3	n.i.
1006	Limonen	n.i.	4,4
1007	1,8-Cineol	0,2	n.i.
1021	<i>para</i> -Cimen	n.i.	4,8
1035	γ -Terpinen	1,7	n.i.
1036	γ -Terpinen	n.i.	4,7
1051	<i>cis</i> -Linalol oksid	n.i.	0,5
1064	<i>para</i> -Menta-2,4(8)-dien	0,1	n.i.
1067	<i>trans</i> -Linalol oksid	n.i.	0,4
1082	Linalol	0,2	69,6

REZULTATI I DISKUSIJA

1115	<i>dihidro</i> -Linalol	n.i.	0,6
1119	Kamfor	n.i.	4,5
1144	Borneol	2,3	n.i.
1156	Terpinen-4-ol	1,5	n.i.
1170	<i>2-metil</i> -Izoborneol	n.i.	0,4
1172	α -Terpineol	0,9	n.i.
1253	Geraniol	n.i.	2,0
1285	Timol	1,2	n.i.
1292	Karvakrol	81,5	n.i.
1345	Neril acetat	n.i.	0,6
1349	Karvakrol acetat	0,1	n.i.
1366	Geranil acetat	n.i.	1,6
1389	<i>cis</i> -Kariofilen	1,4	n.i.
1408	γ -Elemen	0,2	n.i.
1408	α -Gvajen	0,2	n.i.
1465	Germaren-D	0,2	n.i.
1480	β -Bisabolen	1,3	n.i.
1484	γ -Kadinin	0,4	n.i.
1552	Kariofilen oksid	0,1	n.i.
	<i>Monoterpenski ugljovodonici</i>	<i>8,14</i>	<i>19,92</i>
	<i>Oksidovani monoterpeni</i>	<i>87,92</i>	<i>80,08</i>
	<i>Seskviterpenski ugljovodonici</i>	<i>3,77</i>	<i>0</i>
	<i>Oksidovani seskviterpeni</i>		<i>0</i>
	<i>Ukupno identifikovano (%)</i>	<i>99,94</i>	<i>100,0</i>
	<i>Broj identifikovanih komponenti</i>	<i>25</i>	<i>17</i>

*n.i. – nije identifikovan

4.6. Biološke aktivnosti ekstrakata testiranih makromiceta

Za određivanje antibakterijske, antibiofilm, antioksidativne i citotoksične aktivnosti korišćeni su metanolni i etanolni ekstrakti 7 testiranih vrsta makromiceta.

4.6.1. Antibakterijska aktivnost ekstrakata testiranih makromiceta

Antibakterijska aktivnost je određena mikrodilucionom metodom i stepen osetljivosti 16 testiranih bakterija (izolata iz tkiva tonzila pacijenata sa dijagnozom HT) na metanolne i etanolne ekstrakte bazidiokarpa makromiceta je prikazan u tabelama 13 i 14.

Aktivnost ME je različita. Zavisno od vrste makromiceta i bakterija, MIK su detektovane za sve testirane izolate i to u opsegu 0,20 – 25 mg/mL (Tabela 13). Najosetljivije bakterije na sve testirane ME su bile: *Micrococcus luteus*, *Streptococcus agalactiae* i *S. parasanquinis* (MIK 0,20 mg/mL, MBK 0,40 mg/mL). ME *Armillaria mellea* je najbolje inhibirao rast *M. luteus*, *S. parasanquinis* (MIK 0,20 mg/mL) i *S. constellatus* i *S. salivarius* (MIK 0,40 mg/mL, MBK 0,80 mg/mL), dok je najslabiju aktivnost pokazao na rast vrsta roda *Staphylococcus* (MIK 3,1 – 25 mg/mL, MBK 12,5 – 50 mg/mL) kao i na rast testiranih G (–) bakterija (MIK 3,1 – 25 mg/mL). Na dejstvo ME vrsta roda *Lactarius* najosetljiviji su bili: *S. agalactiae* i *S. parasanquinis* (MIK 0,20 – 0,80 mg/mL, MBK 0,8 – 1,6 mg/mL), dok su najrezistentiji *Staphylococcus aureus* (MIK 12,5 – 30 mg/mL, MBK 25 – 30 mg/mL) i *Stenotrophomonas maltophilia* (MIK 6,25 – 25 mg/mL, MBK 12,5 – 50 mg/mL). Ispitivanjem bakteriostatske aktivnosti ME vrsta roda *Russula* pokazano je da *M. luteus* (MIK 0,20 – 0,78 mg/mL) i *S. pyogenes* (0,40 – 0,80 mg/mL) su bili najosetljiviji sojevi, dok su najrezistentiji *S. hominis* (15 – 30 mg/mL) i *S. maltophilia* (12,5 – 25 mg/mL).

Inhibitorna aktivnost EE bazidiokarpa se kretala u opsegu 0,20 – 25 mg/mL, u zavisnosti od vrste makromiceta kao i vrste bakterija (Tabela 14). Najosetljivije bakterije na sve testirane EE su bile: *M. luteus*, *R. mucilaginosa*, *S. dysgalactiae* i *S. parasanquinis* (MIK 0,20 – 0,40 mg/mL, MBK 0,40 – 0,80 mg/mL). EE *A. mellea* je najbolje inhibirao rast *M. luteus*, *S. constellatus*, *S. dysgalactiae* i *S. pyogenes* (MIK 0,80 mg/mL, MBK 1,6 mg/mL), dok je najslabiju aktivnost pokazao na rast vrsta roda *Staphylococcus* (MIK 6,25 – 30 mg/mL, MBK 12,5 – 30 mg/mL) i na rast testiranih G (–) bakterija (MIK 7,5 – 30 mg/mL, MBK 15 – 60 mg/mL). Na osnovu pregleda rezultata dobijenih dejstvom EE vrsta roda *Lactarius* zapaža se da su najsenzitivnije bakterije: *Rothia mucilaginosa*, *S. agalactiae*, *S. anginosus*, *S. dysgalactiae*, *S. parasanquinis* i *S. pyogenes* (MIK 0,60 – 0,80 mg/mL), dok su *S. aureus* (MIK 12,5 – 25 mg/mL, MBK 25 – 50 mg/mL) i *S. maltophilia* (MIK 12,5 – 25 mg/mL, MBK 25 – 50 mg/mL) bile najotpornije. EE vrsta roda *Russula* pokazali su najbolju aktivnost na: *M. luteus*, *R. mucilaginosa*, *S. agalactiae*, *S. anginosus*, *S. dysgalactiae*, *S. oralis*, *S. parasanquinis* i *S. pseudopneumoniae* (MIK 0,20 – 0,80 mg/mL, MBK 0,40 – 1,60 mg/mL), a najslabiju aktivnost na: *S. hominis* (MIK 15 – 30 mg/mL, MBK 15 – 60 mg/mL) i *S. maltophilia* (MIK 12,5 – 25 mg/mL, MBK 12,5 – 25 mg/mL). U odnosu na testirane ekstrakte, komercijalni antibiotici amoksicilin sa klavulonskom kiselinom i cefiksim čije su MIK vrednosti u opsegu 0,0002 – 0,028 mg/mL (MBK 0,0004 – 0,056 mg/mL) odnosno 0,0002 – 0,013 mg/mL (MBK 0,0004 – 0,027 mg/mL) su pokazali bolju antibakterijsku aktivnost na sve testirane bakterije. U poređenju analizom bakteriostatskog i baktericidnog efekta testiranih makromiceta na izolovane bakterije, može se zaključiti da su ME pokazali malo bolju aktivnost u odnosu na EE testiranih vrsta. Poređenjem antibakterijske aktivnosti ME među vrstama rodova *Lactarius* i *Russula*, nema značajnih razlika, obe vrste ekstrakta su pokazale ujednačenu aktivnost. Takođe, uočena je ujednačena antibakterijska aktivnost i kod EE rodova *Lactarius* i *Russula*.

Etanolni ekstrakti micelije *A. mellea* poreklom iz Turske slabo su uticali na rast različitih vrsta bakterija i kvasnica, testirani disk difuzionom metodom. Najveća zona inhibicije je izmerena kod *Salmonella Typhimurium* (10 mm), umerena zona inhibicije (8 mm) je izmerena kod vrsta *E. coli*, *S. lutea* i *C. albicans*, dok kod vrsta *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. vulgaris*, *B. subtilis*, *B. cereus* i *E. cloacae* ekstrakt nije pokazao inhibitornu aktivnost (Kalyoncu i dr., 2010). S druge strane Kostić

i dr. (2017), su ispitivali antimikrobnu aktivnost ME *A. mellea* mikrodilucionom metodom. Zabeležili su umerenu antibakterijsku aktivnost ME *A. mellea* prema sledećim bakterijskim vrstama: *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus flavus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, i *Enterobacter cloacae*, čije su bakteriostatske vrednosti bile u opsegu 3,12 – 15 mg/mL. Vrednosti za *S. aureus* (ATCC 6538) dobijene u radu Kostić i dr. (2017) su u skladu sa MIK vrednostima dobijenim u ovoj disertaciji. Armilarna kiselina je pokazala antimikrobnu aktivnost protiv G (+) bakterija i nekih kvasnica. Takođe, seskviterpen meleoid K, izolovan iz plodonosnog tela *A. mellea* je pokazao antimikrobnu aktivnost (Wen Gao i dr., 2009). Metanolni ekstrakt *L. piperatus* poreklom iz Portugala inhibirao je rast različitih vrsta patogenih bakterija, uključujući i *S. aureus* (MIK 0,5 – 50 mg/mL, zona inhibicije 6 – >9 mm) (Barros i dr., 2007c), dok je ekstrakt *L. piperatus* iz Srbije pokazao bolju inhibitornu aktivnost (MIK opseg vrednost 0,039 – 0,156 mg/mL), uključujući i *S. aureus* (MIK 0,039 mg/mL) (Kosanić i dr., 2020). MIK vrednosti dobijene za *L. piperatus* uzorke iz Portugala su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji. Različiti ekstrakti (metanolni, acetatni i hloroform) *L. vellereus* poreklom iz Turske su jako dobro inhibirali rast G (+) i G (–) bakterija, opseg vrednosti MIK 0,0048 – 0,078 mg/mL. U istom radu, najbolju aktivnost je imao acetatni ekstrakt *L. vellereus* na *B. subtilis* (MIK 0,0048 mg/mL) i *K. pneumoniae* (MIK 0,019 mg/mL). U slučaju inhibicije rasta *S. aureus* i *S. pyogenes*, sva tri testirana ekstrakta su pokazala istu aktivnost (MIK 0,039 mg/mL) (Dogan i Aydın, 2013). Vrednosti antimikrobne aktivnosti za uzorak koji je testiran u ovoj tezi su više u odnosu na testirani uzorak iz Turske. Razlozi drugačijih MIK vrednosti mogu biti: poreklo vrste, način skladištenja i metodologija ekstrakcije.

Tabela 13. Antibakterijska aktivnost metanolnih ekstrakata testiranih vrsta makromiceta (mg/mL).

Bakterija		Ekstrakt makromiceta							Antibiotik	
		<i>Armillaria mellea</i>	<i>Lactarius piperatus</i>	<i>Lactarius quietus</i>	<i>Lactarius vellereus</i>	<i>Russula integra</i>	<i>Russula nigricans</i>	<i>Russula rosea</i>	Amoksicilin i klavulonska kiselina	Cefiksim
<i>Micrococcus luteus</i>	MIK	0,2	0,8	3,1	1,5	0,80	0,8	0,2	0,0002	0,002
	MBK	0,4	1,6	6,2	3,1	1,56	1,6	0,4	0,0004	0,003
<i>Rothia mucilagenosa</i>	MIK	3,1	0,8	6,25	1,6	3,12	1,6	3,1	0,007	0,002
	MBK	6,2	1,6	12,5	3,1	6,25	3,1	6,25	0,014	0,003
<i>Streptococcus agalactiae</i>	MIK	3,1	0,4	0,2	0,8	3,1	1,6	3,1	0,007	0,002
	MBK	6,2	0,8	0,4	1,6	6,25	3,1	6,25	0,014	0,004
<i>Streptococcus anginosus</i>	MIK	1,6	12,5	3,1	0,8	1,5	1,6	6,25	0,028	0,0002
	MBK	3,1	25	6,25	1,6	3,1	3,1	12,5	0,056	0,0004
<i>Streptococcus constellatus</i>	MIK	0,4	0,8	1,56	1,56	3,1	0,8	3,12	0,0002	0,0002
	MBK	0,8	1,56	3,1	3,1	6,25	1,56	6,25	0,0004	0,0004
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	MIK	3,1	0,4	1,5	1,5	3,1	3,1	0,4	0,007	0,0002
	MBK	6,25	0,8	3,1	3,1	6,25	6,25	0,8	0,014	0,0004
<i>Streptococcus oralis</i>	MIK	6,25	6,2	0,8	6,25	0,4	3,1	6,25	0,0004	0,002
	MBK	12,5	12,5	1,6	12,5	0,8	6,25	12,5	0,001	0,004
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	MIK	0,2	0,4	0,2	0,8	3,1	1,6	0,8	0,004	0,003
	MBK	0,4	0,8	0,4	1,6	6,2	3,1	1,6	0,01	0,006

REZULTATI I DISKUSIJA

<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	MIK	1,6	0,8	1,6	6,25	0,8	3,1	1,6	0,001	0,013
	MBK	3,2	1,6	3,1	12,5	1,6	6,25	3,1	0,002	0,027
<i>Streptococcus pyogenes</i>	MIK	3,1	3,1	0,4	3,1	0,8	0,4	0,8	0,0004	0,0008
	MBK	6,2	6,2	0,8	6,25	1,6	0,8	1,6	0,001	0,002
<i>Streptococcus salivarius</i>	MIK	0,4	1,6	0,4	6,25	6,25	6,25	3,1	0,01	0,013
	MBK	0,8	3,1	0,8	12,5	12,5	12,5	6,25	0,014	0,027
<i>Staphylococcus aureus</i>	MIK	25	12,5	12,5	25	12,5	12,5	12,5	0,001	0,003
	MBK	50	25	25	30	25	25	25	0,002	0,006
<i>Staphylococcus hominis</i>	MIK	15	15	3,75	7,5	30	15	15	0,004	0,002
	MBK	30	30	7,5	15	60	30	30	0,007	0,004
<i>Staphylococcus warnerii</i>	MIK	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	3,1	0,001	0,003
	MBK	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	6,25	0,002	0,006
<i>Enterobacter cloacae</i>	MIK	12,5	12,5	6,25	6,25	25	3,1	6,25	0,028	0,003
	MBK	25	25	12,5	12,5	50	6,25	12,5	0,056	0,007
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	MIK	25	25	6,25	25	25	12,5	25	0,003	0,003
	MBK	50	50	12,5	50	50	25	50	0,007	0,006

Tabela 14. Antibakterijska aktivnost etanolnih ekstrakata odabranih vrsta makromiceta (mg/mL).

Bakterija		Ekstrakt makromiceta							Antibiotik	
		<i>Armillaria mellea</i>	<i>Lactarius piperatus</i>	<i>Lactarius quietus</i>	<i>Lactarius vellereus</i>	<i>Russula integra</i>	<i>Russula nigricans</i>	<i>Russula rosea</i>	Amoksicilin i klavulonska kiselina	Cefiksim
<i>Micrococcus luteus</i>	MIK	0,8	6,25	3,1	1,5	3,1	3,1	0,4	0,0002	0,002
	MBK	1,6	12,5	6,25	3,1	6,25	6,25	0,8	0,0004	0,003
<i>Rothia mucilagenosa</i>	MIK	3,75	3,1	0,6	0,8	0,8	1,6	0,4	0,007	0,002
	MBK	7,5	6,25	3,1	1,6	1,6	3,1	0,8	0,014	0,003
<i>Streptococcus agalactiae</i>	MIK	7,5	3,1	0,6	0,8	1,5	1,6	0,8	0,007	0,002
	MBK	15	6,25	3,1	1,6	3,1	3,1	1,6	0,014	0,004
<i>Streptococcus anginosus</i>	MIK	7,5	3,1	3,1	0,8	3,1	3,1	0,8	0,028	0,0002
	MBK	15	6,25	6,2	1,6	6,2	6,25	1,6	0,056	0,0004
<i>Streptococcus constellatus</i>	MIK	0,8	6,25	3,1	1,56	6,25	6,25	6,25	0,0002	0,0002
	MBK	1,6	12,5	6,2	3,1	12,5	12,5	12,5	0,0004	0,0004
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	MIK	0,8	1,5	0,8	1,5	6,25	3,1	0,2	0,007	0,0002
	MBK	1,6	3,1	1,6	3,1	12,5	6,25	0,4	0,014	0,0004
<i>Streptococcus oralis</i>	MIK	7,5	3,1	3,1	3,1	0,8	3,1	3,1	0,0004	0,002
	MBK	15	6,25	6,2	6,25	1,6	6,25	6,25	0,001	0,004

REZULTATI I DISKUSIJA

<i>Streptococcus parasanquinis</i>	MIK	3,7	3,1	0,6	0,8	6,25	1,6	0,4	0,004	0,003
	MBK	7,5	6,25	3,1	1,6	12,5	3,1	0,8	0,01	0,006
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	MIK	3,75	3,1	6,2	1,6	0,8	1,6	0,8	0,001	0,013
	MBK	7,5	6,25	12,5	3,1	1,6	3,1	1,6	0,002	0,027
<i>Streptococcus pyogenes</i>	MIK	0,8	0,8	6,25	0,8	3,1	3,1	3,1	0,0004	0,0008
	MBK	1,6	1,6	12,5	1,6	6,25	6,25	6,25	0,001	0,002
<i>Streptococcus salivarius</i>	MIK	7,5	1,6	3,1	3,1	6,25	6,25	3,1	0,01	0,013
	MBK	15	3,1	6,2	6,25	12,5	12,5	6,25	0,014	0,027
<i>Staphylococcus aureus</i>	MIK	15	25	12,5	12,5	12,5	6,25	12,5	0,001	0,003
	MBK	30	50	25	25	25	12,5	25	0,002	0,006
<i>Staphylococcus hominis</i>	MIK	15	15	3,75	7,5	7,5	7,5	30	0,004	0,002
	MBK	30	30	7,5	15	15	15	60	0,007	0,004
<i>Staphylococcus. warnerii</i>	MIK	6,25	6,25	3,1	12,5	6,25	3,1	6,25	0,001	0,003
	MBK	12,5	12,5	6,25	25	12,5	6,25	12,5	0,002	0,006
<i>Enterobacter cloacae</i>	MIK	7,5	25	3,1	1,6	3,1	1,6	6,25	0,028	0,003
	MBK	15	50	6,2	3,1	6,25	3,1	12,5	0,056	0,007
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	MIK	30	25	25	12,5	12,5	6,25	12,5	0,003	0,003
	MBK	60	50	50	25	25	12,5	25	0,007	0,006

4.6.2. Antibiofilm aktivnost ekstrakata testiranih makromiceta

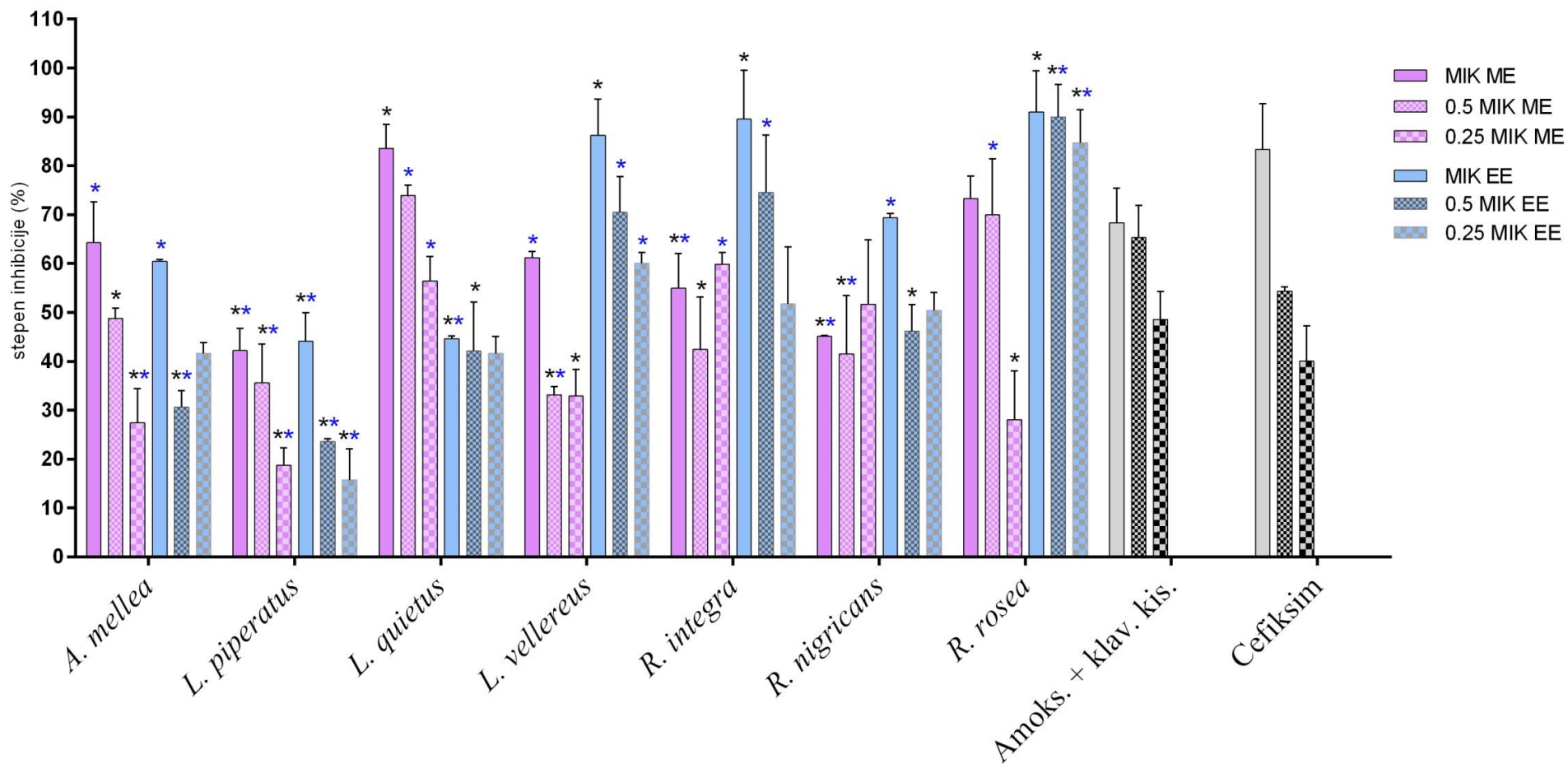
U daljem radu, a u cilju praćenja uticaja ME i EE na aktivnosti koje su regulisane QS komunikacijom sprovedeni su sledeći testovi: test za ispitivanje uticaja ekstrakata na formiranje biofilma *Staphylococcus aureus* i test za ispitivanje njihovog uticaja na već formirani biofilm izolata *S. aureus*. Ova vrsta je izabrana na osnovu rezultata histološke analize i dokazane sposobnosti da formira biofilm kao i činjenice da je jedan od glavnih uzročnika HT-a.

4.6.2.1. Efekat ekstrakata na formiranje biofilma *Staphylococcus aureus*

Za ispitivanje stepena inhibicije formiranja *S. aureus* biofilma korišćeni su ME i EE testiranih makromiceta u koncentracijama: MIK; 0,5 MIK i 0,25 MIK (Grafik 1). Dobijeni rezultati pokazali su da je inhibicija formiranja biofilma zavisila od koncentracije ekstrakta. Efekat ME-ta koji su primenjeni u vrednosti MIK-a na formiranje *S. aureus* biofilma po opadajućem redosledu je: *L. quietus* > *R. rosea* > *A. mellea* > *L. vellereus* > *R. integra* > *R. nigricans* > *L. piperatus*. Dok je dejstvo EE-ta, koji su takođe bili u vrednosti MIK-a na inhibiciju formiranja *S. aureus* biofilma, po opadajućem redosledu bio sledeći: *R. rosea* > *R. integra* > *L. vellereus* > *R. nigricans* > *A. mellea* > *L. quietus* > *L. piperatus*. Ekstrakti testiranih vrsta, osim *L. piperatus* (ME – 42,2% i EE – 44,15%), *L. quietus* (EE, 44,7%) i *R. nigricans* (ME, 45,12%), pokazali su dobar inhibitorni efekat na formiranje biofilma *S. aureus* (>50%) pri primenjenim MIK vrednostima. Najbolji efekat pri svim testiranim koncentracijama (MIK, 0,5 MIK i 0,25 MIK) su pokazali ME *L. quietus* (83,58%; 73,97% i 56,39%) i EE vrsta: *L. vellereus* (86,2%; 70,47%; 60,1%), *R. integra* (89,5%; 74,55%, 51,72%) i *R. rosea* (90,97%; 89,98% i 84,73%) (Grafik 1).

Testirani ekstrakti su pokazali sličnu aktivnost u poređenju sa komercijalnim antibioticima čiji je inhibitorni efekat pri MIK vrednostima iznosio 68,30% za amoksicilin i klavulonsku kiselinu i 83,35% za cefiksim. Uoprednom analizom je pokazano da ME *L. quietus*, EE *L. vellereus*, EE *R. integra* i oba testirana ekstrakta vrste *R. rosea* imaju bolji efekat na inhibiciju formiranja biofilma od testiranog amoksicilina sa klavulonskom kiselinom ($p < 0,05$). Dok su u slučaju cefiksima bolji efekat pokazali ME *L. quietus*, EE *L. vellereus*, EE *R. integra* i EE *R. rosea* (Grafik 1).

Biofilm predstavlja složenu zajednicu mikroorganizama, koja im pruža zaštitu od delovanja antibiotika, što je najčešći uzrok pojave hroničnih infekcija i rezistentnih sojeva (Alves i dr., 2014a). Mikroorganizmi u biofilmu su otporniji na antimikrobne agense od planktonskih ćelija, pa stoga tretiranje biofilma standardnim dozama komercijalnih antibiotika je često nedelotvorno jer je poznato da je za inhibiciju rasta i formiranja biofilma potrebno i do 1000 puta veća doza u odnosu na dozu antibiotika koja je potrebna za inhibiciju rasta planktonskih ćelija (Alves i dr., 2014a; 2014b). Zato, ekstrakti makromiceta, koje su nedovoljno istražene u pogledu inhibicije formiranja biofilma, predstavljaju dragocen resurs u potrazi za novim biološki aktivnim ekstraktima/jedinjenjima koji bi mogli inhibitorno uticati na formiranje biofilma bolje od antibiotika. Čuvalová i dr., (2018) su ispitivali potencijal vodenih ekstrakata različitih makromiceta na inhibiciju formiranja *S. aureus* biofilma. Pokazali su da najbolju aktivnost ima *A. mellea* (70,87%), zatim *P. ostreatus* (67%), *L. sulphureus* (64,14%) i *A. auricula-judae* (62,77%), dok je *M. procera* pokazala najniži procenat redukcije biofilma (47,72%). Metanolni ekstrakt *R. delica* uzorka iz Portugala je testiran na inhibiciju formiranja biofilma sledećih bakterija: *P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. mirabilis* i *A. baumannii*. Opseg vrednosti inhibicije formiranja biofilma je bio 28,59 (*A. baumannii*) – 60,31% (*P. mirabilis*) (Alves i dr., 2014a).

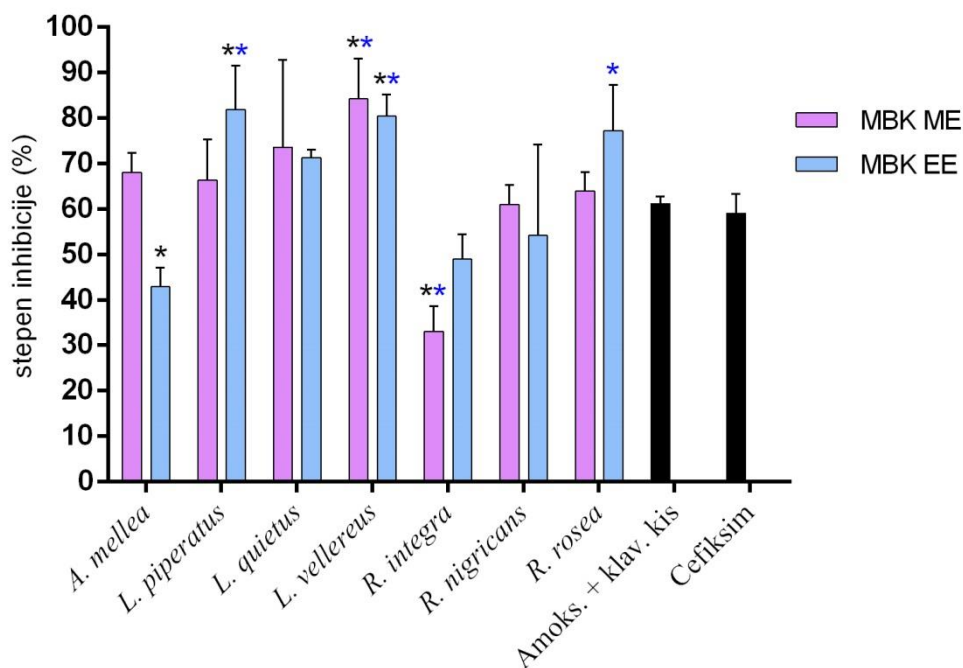


Grafik 1. Uticaj minimalnih inhibitornih i sub-inhibitornih koncentracija metanolnih i etanolnih ekstrakta testiranih vrsta makromiceta na stepen inhibicije (%) formiranja biofilma *Staphylococcus aureus* (* $p < 0,05$ u poređenju amoksicilina sa klavulonskom kiselinom i ekstrakata; * $p < 0,05$ u poređenju cefiksima sa ekstraktima).

4.6.2.2. Efekat ekstrakata na formirani biofilm *Staphylococcus aureus*

Efekat ME i EE testiranih makromiceta nakon tretmana (30 s) minimalnim baktericidnim vrednostima na formirani *S. aureus* biofilm prikazan je na grafiku 2. Dejstvo ME koji su primenjeni u vrednosti MBK-a na formirani *S. aureus* biofilm, po opadajućem redosledu je sledeći: *L. vellereus* > *L. quietus* > *A. mellea* > *L. piperatus* > *R. rosea* > *R. nigricans* > *R. integra*. Dok je efekat EE, nakon 30 s primene na formirani *S. aureus* biofilm, po opadajućem redosledu bio sledeći: *L. piperatus* > *L. vellereus* > *R. rosea* > *L. quietus* > *R. nigricans* > *R. integra* > *A. mellea*. Poređenjem aktivnosti između testiranih vrsta, zaključeno je da ekstrakti vrsta roda *Lactarius* deluju najbolje na već formirani *S. aureus* biofilm. Takođe, poređenjem rezultata u okviru roda *Lactarius*, na inhibiciju formiranog biofilma najbolje su delovali ekstrakti vrste *L. vellereus* (ME – 84,2% i EE – 80,4%). U okviru roda *Russula* najbolju aktivnost pokazali su ekstrakti *R. rosea* (78,73%, odnosno 81,73%), dok su ekstrakti *A. mellea* pokazali nešto slabiju aktivnost u odnosu na vrste roda *Lactarius* ali bolju aktivnost u odnosu na vrste roda *Russula* (Grafik 2).

Svi testirani ekstrakti su pokazali sličan, a u pojedinim slučajevima i bolji efekat na formirani biofilm u poređenju sa komercijalnim antibioticima čiji je inhibitorni efekat pri MBK vrednostima iznosio 61,14% za amoksicilin i klavulonsku kiselinu i 59,05% za cefiksim. U poređnom analizom je pokazano da EE *L. piperatus*, ME i EE *L. vellereus*, EE *R. rosea* ($p < 0,05$) imaju bolji efekat na inhibiciju formiranog biofilma od testiranih antibiotika (Grafik 2). Pregledom dostupne literature nismo našli podatke o inhibirajućem efektu različitih ekstrakata testiranih makromiceta na već formirani biofilm *S. aureus*.



Grafik 2. Efekat minimalnih baktericidnih koncentracija metanolnih i etanolnih ekstrakata testiranih vrsta makromiceta na stepen inhibicije (%) već formiranog biofilma *Staphylococcus aureus* (* $p < 0,05$ u poređenju amoksicilina sa klavulonskom kiselinom i ekstrakata; * $p < 0,05$ u poređenju cefiksima sa ekstraktima).

4.6.3. Antioksidativna aktivnost ekstrakata testiranih makromiceta

Antioksidativna aktivnost ekstrakata testiranih makromiceta procenjena je na osnovu njihove sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije (TBARS test) i inhibicije oksidantne hemolize (OxHLIA test) (Tabela 15). Rezultati lipidne peroksidacije pokazali su izuzetnu aktivnost testiranih

ekstrakata (Tabela 15). Najbolja aktivnost je zabeležena za EE *R. nigricans* (IC_{50} je 0,017 mg/mL), koja je bila bolja i od aktivnosti kontrole (IC_{50} je 0,0196 mg/mL). U okviru roda *Lactarius* najbolju aktivnost su pokazali ME i EE *L. quietus* (IC_{50} vrednost za ME je iznosila 0,17 mg/mL, odnosno IC_{50} EE 0,23 mg/mL), dok je najniža aktivnost zabeležena za EE *L. piperatus* (IC_{50} 1,39 mg/mL). S obzirom da su organske i fenolne kiseline odgovorne za antioksidativnu aktivnost ekstrakata makromiceta, rezultati hemijske karakterizacije testiranih vrsta (Odeljci 4.4.3. i 4.4.4.) su u skladu sa dobijenim TBARS vrednostima u okviru roda *Lactarius*. Testirane vrste roda *Russula* su pokazale bolju antioksidativnu aktivnost u odnosu na *A. mellea* i vrste roda *Lactarius*. Najbolju aktivnost su pokazali ME *R. rosea* i EE vrste *R. nigricans* (IC_{50} vrednost za ME je iznosila 0,09 mg/mL, odnosno IC_{50} EE 0,017 mg/mL). Dok je najniža aktivnost zabeležena za ME *R. integra* (IC_{50} 1,72 mg/mL). Takođe, i u slučaju roda *Russula* postoji korelacija između ukupnog sadržaja fenolnih kiselina (Odeljak 4.4.4), i organskih kiselina (Odeljak 4.4.3.). Na osnovu potencijala inhibicije lipidne peroksidacije ME testiranih vrsta po rastućem redosledu je sledeći: *R. rosea* < *R. nigricans* < *L. quietus* < *L. vellereus* < *L. piperatus* < *R. integra* < *A. mellea*, pri čemu najniža vrednost označava najbolju aktivnost. Dok je efekat EE testiranih makromiceta po rastućem redosledu bio: *R. nigricans* < *R. rosea* < *L. quietus* < *L. vellereus* < *A. mellea* < *R. integra* < *L. piperatus*. Na osnovu dobijenih rezultata, EE svih testiranih vrsta su imali bolju antioksidativnu aktivnost detektovanu TBARS testom od ME.

Rezultati OxHLIA testa prikazani su u Tabeli 15, data koncentracija ekstrakta predstavlja vrednost koja je potrebna da se zaštiti 50% populacije eritrocita od hemolize u vremenu od 10, 30 i 60 minuta. Niže vrednosti IC_{50} ukazuju na višu antihemolitičku sposobnost testiranih ekstrakata. Nakon 10 min praćenja, najnižu IC_{50} vrednost imala su oba testirana ekstrakta *R. nigricans* (0,001 i 0,0091 mg/mL). Međutim, ovi ekstrakti nisu pokazali antihemolitički efekat nakon dužeg vremena. Uzrok tome je verovatno činjenica da su antioksidansi prisutni u ekstraktima iscrpljeni vrlo brzo i da zato vremenom nisu pružali zaštitu eritrocitima. U slučaju ekstrakata vrsta *R. integra* i *R. nigricans*, EE su pokazali bolju protektivnu aktivnost od ME, gde je EE *R. nigricans* imao bolju aktivnost od kontrole. Takođe, jedino je *R. integra* EE bio sposoban da zaštiti eritrocite u vremenima 30 i 60 minuta (0,069 i 0,139 mg/mL). U okviru roda *Lactarius*, jedino su ekstrakti *L. vellereus* pokazali aktivnost nakon 10 minuta dok je u kasnijim merenjima aktivnost ekstrakata odsustvovala (Tabela 15).

Etanolni i polisaharidni ekstrakti bazidiokarpa *A. mellea* poreklom iz Portugala su pokazali slab efekat u neutralizaciji slobodnih radikala (DPPH metoda), redukcionoj sposobnosti kao i umerenu inhibiciju lipidne peroksidacije (primenom metode izbeljivanja β -karotena). Poređenjem ova dva ekstrakta *A. mellea*, polisaharidni ekstrakt je pokazao bolju antioksidativnu aktivnost (Vaz i dr., 2011). Metanolni ekstrakt bazidiokarpa *A. mellea* poreklom iz Srbije, primenom istih metoda merenja, je imao sličnu antioksidativnu aktivnost kao i uzorak iz Portugala (Kostić i dr., 2017). Metanolni ekstrakt bazidiokarpa *L. piperatus* poreklom iz Indije pokazao je umerenu antioksidativnu aktivnost (DPPH IC_{50} 1,57 mg/mL) (Ao i Deb, 2019), dok je acetonski ekstrakt uzorka iz Srbije imao najbolju aktivnost (DPPH IC_{50} 0,033 mg/mL) (Kosanić i dr., 2020). Fenolne i polisaharidne frakcije uzorka *L. vellereus* poreklom iz Portugala su pokazale slabiju antioksidativnu aktivnost (TBARS EC_{50} je iznosio 3,12 odnosno 1,21 mg/mL) (Heleno i dr., 2012) u odnosu na aktivnost ME i EE dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji (TBARS EC_{50} je iznosio 0,32 odnosno 0,30 mg/mL). Navodi brojnih autora ukazuju na jaku antioksidativnu aktivnost roda *Lactarius* (TBARS 0,57 – 1,21 mg/mL) (Heleno i dr., 2012; Vieira i dr., 2014). Metanolni ekstrakti *R. brevipes*, *R. nigricans* i *R. lepida* poreklom iz Turske su imali različitu sposobnost uklanjanja slobodnih radikala (DPPH EC_{50} 10 – 28 mg/mL) i redukujuću aktivnost (EC_{50} 1,5 – 5 mg/mL) (Tripathy i dr., 2016). Kalogeropoulos i dr. (2013) su ispitivali antioksidativnu aktivnost ME različitih vrsta roda *Lactarius* i *Russula*. Osim umerene antioksidativne aktivnosti koju su ME pokazali, autori su utvrdili da postoji dobra korelacija između sadržaja fenolnih kiselina i DPPH i FRAP metoda za ispitivanje antioksidativne aktivnosti (Kalogeropoulos i dr., 2013).

Za ispitivanje antioksidativne aktivnosti se koriste različiti testovi kao što su: Fericijanid metoda, koja je zasnovana na redukciji kompleksa Fe^{3+} /fericijanid; DPPH i ABTS metode kojima se određuje sposobnost hvatanja (uklanjanja) radikala; β -karoten/linolna kiselina test kojim se antioksidativna aktivnost ekstrakta meri praćenjem inhibicije dekolorizacije rastvora β -karotena; TBARS metoda koja se koristi za detekciju lipidne peroksidacije u uzorku (Barros i dr., 2007c). Međutim, poslednjih godina se za ispitivanje antioksidativne aktivnosti koristi i OxHLIA metoda, koja se široko primenjuje za analizu različitih biljnih ekstrakata, dok podataka o primeni ove metode u ispitivanju ekstrakata makromiceta i etarskih ulja još uvek nema. Brojna istraživanja ukazuju da je visok sadržaj fenolnih jedinjenja, flavonoida, tokoferola, organskih kiselina u plodonosnim telima makromiceta odgovoran za jako dobro antioksidativnu ali i antiinflamatornu i imunomodulirajuću aktivnost, što je od izuzetnog značaja za upotrebu makromiceta u farmaciji (Sánchez, 2017; Ao i Deb, 2019).

Tabela 15. Antioksidantna aktivnost metanolnih i etanolnih ekstrakta testiranih vrsta makromiceta (srednja vrednost \pm SD).

Makromicete	Ekstrakti	OxHLIA (mg/mL)			TBARS (mg/mL)
		$\Delta t = 10$ min	$\Delta t = 30$ min	$\Delta t = 60$ min	
<i>Armillaria mellea</i>	Metanolni	-	-	-	$6,19 \pm 0,47^*$
	Etanolni	-	-	-	$0,52 \pm 0,01$
<i>Lactarius piperatus</i>	Metanolni	-	-	-	$0,41 \pm 0,08$
	Etanolni	-	-	-	$1,39 \pm 0,06^*$
<i>Lactarius quietus</i>	Metanolni	-	-	-	$0,17 \pm 0,01$
	Etanolni	-	-	-	$0,23 \pm 0,02$
<i>Lactarius vellereus</i>	Metanolni	$0,223 \pm 0,6^*$	-	-	$0,32 \pm 0,01$
	Etanolni	$0,023 \pm 0,2$	-	-	$0,30 \pm 0,01$
<i>Russula integra</i>	Metanolni	$0,111 \pm 0,4^*$	-	-	$1,72 \pm 0,01^*$
	Etanolni	$0,023 \pm 0,1$	$0,069 \pm 2$	$0,139 \pm 0,3$	$0,96 \pm 0,02^*$
<i>Russula nigricans</i>	Metanolni	$0,0091 \pm 0,7$	-	-	$0,12 \pm 0,02$
	Etanolni	$0,001 \pm 0,07$	-	-	$0,017 \pm 0,002$
<i>Russula rosea</i>	Metanolni	-	-	-	$0,09 \pm 0,0004$
	Etanolni	-	-	-	$0,116 \pm 0,004$
Troloks		$0,0031 \pm 0,3$	$0,008 \pm 0,2$	$0,0206 \pm 0,7$	$0,0196 \pm 0,01$

* $p < 0,05$

4.6.4. Citotoksična aktivnost ekstrakata testiranih makromiceta

Za evaluaciju citotoksičnosti ekstrakata korišćene su primarne ćelije jetre svinje (PLP2) jer su slične humanim. Utvrđivanje citotoksične aktivnosti testiranih ekstrakata važno je zbog njihove moguće primene u prevenciji HT-a. Ekstrakti proučavanih vrsta su pokazali nižu citotoksičnu aktivnost na testiranu ćelijsku liniju kancera (NCI – H460) i ćelijsku kulturu PLP2 u poređenju sa elipticinom koji je korišćen kao pozitivna kontola (Tabela 16). Poredeći aktivnost različitih ekstrakata, može se zaključiti da su PLP2 ćelije jetre jedino osetljive na ME *L. quietus* (347,27 µg/mL) i EE *L. vellereus* (163,02 µg/mL). Od svih testiranih makromiceta, najbolju aktivnost na NCI–H460 pokazao je EE *L. vellereus* sa GI₅₀ vrednošću 82,99 µg/mL. U poređenju sa elipticinom, čija je aktivnost u opsegu 2,3 µg/mL za PLP2 i 1,03 µg/mL za NCI – H460, proučavani ekstrakti su pokazali znatno slabiji efekat.

Primena određenih ekstrakata ili jedinjenja sa pokazanom biološkom aktivnošću u tretmanu različitih bolesti moguća je ukoliko su manje štetni po zdravlje ljudi od citostatika i zato je neophodno testirati njihovu citotoksičnost. Imajući u vidu da bronhitis kao jedna od čestih komplikacija HT-a, predstavlja faktor rizika za pojavu karcinoma pluća (Gardner i dr., 2018) ispitivan je efekat ekstrakata na humanu tumorsku ćelijsku liniju NCI-H460 (uzročnik nesitnoćelijskog karcinoma pluća). Metanolni ekstrakt *A. mellea*, uzorka iz Srbije nije pokazao citotoksičnu aktivnost na ispitivanim tumorskim ćelijskim linijama MCF-7, HepG2 i HCT-15 (Kostić i dr., 2017). Međutim, jedinjenja armilarikin i armilaridin su imala značajnu antiproliferativnu aktivnost protiv Huh 7, HepG2 i HA22 T ćelijskih linija (Chen i dr., 2016). Acetonski ekstrakt *L. piperatus* je pokazao jako dobru citotoksičnu aktivnost (IC₅₀ 37,83 – 65,94 µg/mL) na više različitih ćelijskih linija (HeLa, LS174, A549) (Kosanić i dr., 2020). Dok ME *L. turpis* poreklom iz Portugala nije pokazao citotoksičnu aktivnost na testiranim zdravim ćelijama jetre (PLP2) (Vieira i dr., 2014). Terpenoid izolovan iz *R. lepida* i *R. amarissima* je pokazao antiproliferativnu aktivnost na ćelijske linije A594 i CAKI 1 (IC₅₀ 90,3 µM odnosno 85,4 µM) (Clericuzio i dr., 2012). Ispitivanjem citotoksične aktivnosti ME i EE vrsta roda *Russula* na tumorske ćelijske linije, Kostić i dr. (2020b) su pokazali da ME *R. integra*, *R. nigricans* i *R. rosea* poseduju aktivnost na MCF-7, HepG2 i HeLa. Zhao i dr. (2011), su demonstrirali citotoksičnu aktivnost ergona izolovanog iz plodonosnog tela *R. cyanoxantha* na HepG2 ćelijsku liniju, dok su Zhang i dr. (2010), pokazali da lektin vrste *R. lepida* poseduje antiproliferativnu aktivnost na HepG2 i MCF-7 ćelijske linije.

Tabela 16. Citotoksična aktivnost metanolnih i etanolnih ekstrakata testiranih makromiceta (GI₅₀ (µg/mL) ± SD).

Makromicete	Ekstrakt	PLP2	NCI – H460
<i>Armillaria mellea</i>	Metanolni	>400	>400
	Etanolni	>400	304 ± 10
<i>Lactarius piperatus</i>	Metanolni	>400	>400
	Etanolni	>400	>400
<i>Lactarius quietus</i>	Metanolni	347,27 ± 12,45	220,38 ± 5,65
	Etanolni	>400	>400
<i>Lactarius vellereus</i>	Metanolni	>400	330,71 ± 3,25
	Etanolni	163,02 ± 6,54	82,99 ± 3,21

<i>Russula integra</i>	Metanolni	>400	236,14 ± 3,18
	Etanolni	>400	280,94 ± 9,10
<i>Russula nigricans</i>	Metanolni	>400	>400
	Etanolni	>400	>400
<i>Russula rosea</i>	Metanolni	>400	323,11 ± 6,85
	Etanolni	>400	>400
Elipticin		2,3 ± 0,1	1,03 ± 0,09

Makromicete imaju dugu tradiciju upotrebe u lekovite svrhe u različitim kulturama, ali sada, nakon brojnih naučnih ispitivanja i dokaza o njihovom blagotvornom efektu na ljudski organizam potražnja za konzumacijom je veća. Mnoge studije su već strukturno istražile brojna jedinjenja izolovana iz gljiva, stoga fokus budućih istraživanja bi trebao biti detaljna analiza mehanizma delovanja izolovanih jedinjenja, posebno ukoliko bi se takva jedinjenja mogla primeniti u terapiji hroničnih bolesti, ili kao pomoćna sredstva u hemioterapiji (Patel i Goyal, 2012).

4.7. Biološke aktivnosti testiranih etarskih ulja

Pored analize biološke aktivnosti ekstrakata makromiceta, ispitivana je i biološka aktivnost etarskih ulja *Origanum minutiflorum* (divlji origano) i *Coriandrum sativum* (korijander), sa ciljem njihove potencijalne primene u tretmanu uzročnika HT-a.

4.7.1. Antibakterijska aktivnost testiranih etarskih ulja

Antibakterijska aktivnost je određena mikrodilucionom metodom i stepen osetljivosti 16 testiranih vrsta bakterija na odabrana etarska ulja je prikazan u tabeli 17. Etarsko ulje *O. minutiflorum* je pokazalo različitu antibakterijsku aktivnost. MIK bile su u opsegu 0,028 – 1,38 mg/mL (Tabela 17). Najosetljivije vrste su bile: *S. dysgalactiae* (MIK 0,055 mg/mL, MBK 0,11 mg/mL) i *S. hominis* (MIK 0,028 mg/mL, MBK 0,05 mg/mL), dok je najrezistentnija bakterija bila *S. aureus* (MIK 1,38 mg/mL, MBK 2,77 mg/mL). *C. sativum* etarsko ulje je imalo nešto slabiju antibakterijsku aktivnost u odnosu na etarsko ulje *O. minutiflorum* (Tabela 17). Etarsko ulje korijandera je najbolje inhibiralo rast vrsta roda *Streptococcus* (opseg MIK-a 0,24 – 2,41 mg/mL). *S. agalactiae* i *S. dysgalactiae* (MIK 0,24 mg/mL, MBK 0,56 mg/mL) su najosetljivije na delovanje etarskog ulja korijandera, dok su *M. luteus* (MIK 4,82 mg/mL, MBK 9,65 mg/mL) i *S. hominis* (MIK 5,07 mg/mL, MBK 9,65 mg/mL) najrezistentnije. Generalno, G (+) bakterije su pokazale veću osetljivost na testirana ulja u odnosu na G (–) bakterije. U odnosu na testirana etarska ulja, komercijalni antibiotici amoksicilin sa klavulonskom kiselinom i cefiksim čije su MIK vrednosti u opsegu 0,0002 – 0,028 mg/mL odnosno 0,0002 – 0,013 mg/mL, su pokazali bolju antibakterijsku aktivnost na sve testirane bakterije.

Trenutno u literaturi nisu pronađeni podaci o antibakterijskoj aktivnosti etarskog ulja *O. minutiflorum* na patogene GRT-a (tonzila) koji su testirani u ovoj disertaciji. Međutim, dosadašnji podaci o etarskom ulju *O. vulgare* ukazuju na jako dobru antimikrobnu aktivnost ulja iz roda *Origanum*. Lombrea i dr. (2020) su pokazali da *O. vulgare* etarsko ulje poseduje dobru inhibirajuću aktivnost protiv *S. aureus* (MIK 0,08 – 1,193 mg/mL), *S. pyogenes* (MIK 0,5 mg/mL), i *S. pneumoniae* (MIK 2,5 – 10 mg/mL). Dok etarsko ulje semena korijandera poseduje dobru antibakterijsku aktivnost protiv *K. pneumoniae* (MIK 2,65 mg/mL), *P. aeruginosa* (MIK 3,2 mg/mL) i *S. aureus* (MIK 1,3 mg/mL) (Zardini i dr., 2012). Takođe, Pawar i dr. (2013), su

primenom disk difuzione i mikrodilucione metode pokazali da korijander etarsko ulje poseduje umerenu antibakterijsku aktivnost na oralne patogene (*Lactobacillus acidophilus*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*). Aelenei i dr. (2019) su ispitali uticaj korijander ulja na inhibiciju rasta *S. aureus* izolata osetljivih na meticilin i izolata rezistentih na meticilin, pri čemu su se dobijene MIK značajno razlikovale (5,44 – 11,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Uočavaju se odstupanja u MIK vrednostima dobijenim u našoj studiji i drugim istraživanjama i mogu se pripisati drugačijem odnosu zastupljenih komponenti u etarskom ulju, različitim eksperimentalnim protokolima, kao i /ili različitim sojevima bakterija koje su korišćene (Aelenei i dr., 2019).

Najčešći mehanizmi delovanja etarskih ulja su oštećenje membrana, curenje sadržaja iz bakterijskih ćelija i inhibicija aktivnosti određenih enzima. Za neka jedinjenja etarskih ulja su poznata tačna mesta delovanja, dok je detaljan mehanizam delovanja i dalje nepoznanica (Langeveld i dr., 2014). Pa tako, poznato je da origano ulje vrši inhibiciju enzima (lipaza i koagulaza), dok karvakrol oštećuje membranu bakterijskih ćelija i izaziva inhibiciju ATPazne aktivnosti i curenje jona iz ćelija. Pokazano je i da *p*-cimen utiče na disrupciju membrane bakterijskih ćelija. Carnerio de Barros i dr. (2009), pokazali su da origano ulje smanjuje aktivnost lipaza i koagulaza *S. aureus* izolata iz hrane. Smatra se da je za dobru antibakterijsku aktivnost etarskog ulja korijandera zaslužan linalol koji je najzastupljenije jedinjenje. Pokazano je da linalol povećava propustljivost membrana G (+) i G (–) bakterija. Mehanizam delovanja linalola podrazumeva njegovu interakciju sa fosfolipidima membrane bakterijskih ćelija, kao i membranskim proteinima, čime menja propustljivost i dovodi do gubitka ćelijskih elemenata (Aelenei i dr., 2019). Istraživanja su pokazala da i ostale komponente etarskog ulja korijandera (kamfor, geranil-acetat, D-limonen, γ -terpinen, α -pinen) poseduju dobru antibakterijsku aktivnost (Soković i dr., 2010). Poput ostalih monoterpena i ova jedinjenja difunduju kroz membranu bakterijskih ćelija, menjajući njenu propustljivost, dovodeći do promena u radu efluks pumpi i gubitka jona iz ćelija (Aelenei i dr., 2019).

Dosadašnja istraživanja etarskih ulja origana i korijandera su se uglavnom bazirala na ispitivanju njihove antibakterijske aktivnosti na patogene hrane, ali postoje brojne studije koje su ispitali antimikrobnu aktivnost različitih etarskih ulja na oralne patogene i koje su pokazale da etarska ulja jako dobro inhibiraju i rast različitih vrsta oralnih patogena (vrste roda *Streptococcus* i *Staphylococcus*), što nam ukazuje da različita etarska ulja osim u industriji hrane, mogu naći primenu i u otorinolaringologiji (Nikolić i dr., 2014a; 2014b; 2017).

Tabela 17. Antibakterijska aktivnost odabranih etarskih ulja (mg/mL).

Bakterija		Etarsko ulje		Antibiotik	
		<i>Origanum minutiflorum</i>	<i>Coriandrum sativum</i>	Amoksisicilin + klavulonska kis.	Cefiksim
<i>Micrococcus luteus</i>	MIK	0,23	4,82	0,0002	0,002
	MBK	0,46	9,65	0,0004	0,003
<i>Rothia mucilagenosa</i>	MIK	0,69	0,60	0,007	0,002
	MBK	1,38	1,21	0,014	0,003
<i>Streptococcus agalactiae</i>	MIK	0,35	0,24	0,007	0,002
	MBK	0,69	0,56	0,014	0,004

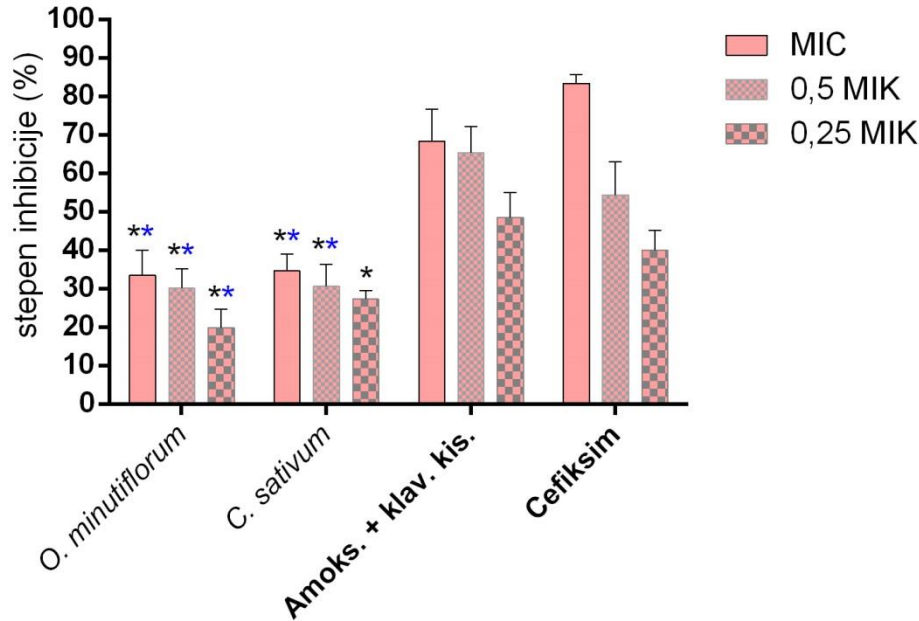
REZULTATI I DISKUSIJA

<i>Streptococcus anginosus</i>	MIK	0,35	0,60	0,028	0,0002
	MBK	0,69	1,21	0,056	0,0003
<i>Streptococcus constellatus</i>	MIK	0,69	0,60	0,0002	0,0002
	MBK	1,38	1,21	0,0004	0,0004
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	MIK	0,055	0,24	0,007	0,0002
	MBK	0,11	0,56	0,014	0,0004
<i>Streptococcus oralis</i>	MIK	0,35	0,60	0,0004	0,002
	MBK	0,69	1,21	0,001	0,003
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	MIK	0,69	1,21	0,004	0,003
	MBK	1,38	2,41	0,007	0,006
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	MIK	0,69	1,21	0,001	0,013
	MBK	1,38	2,41	0,002	0,027
<i>Streptococcus pyogenes</i>	MIK	0,23	2,41	0,0004	0,0008
	MBK	0,46	4,82	0,0008	0,002
<i>Streptococcus salivarius</i>	MIK	0,69	1,20	0,01	0,013
	MBK	1,38	2,41	0,014	0,027
<i>Staphylococcus aureus</i>	MIK	1,38	2,49	0,001	0,00
	MBK	2,77	5,03	0,002	0,006
<i>Staphylococcus hominis</i>	MIK	0,028	5,07	0,004	0,002
	MBK	0,05	9,65	0,007	0,003
<i>Staphylococcus warnerii</i>	MIK	0,46	2,41	0,0001	0,003
	MBK	0,92	4,82	0,002	0,006
<i>Enterobacter cloacae</i>	MIK	0,69	1,20	0,028	0,003
	MBK	1,38	2,41	0,056	0,006
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	MIK	0,69	1,20	0,003	0,003
	MBK	1,38	2,41	0,007	0,006

4.7.2. Antibiofilm aktivnost testiranih etarskih ulja

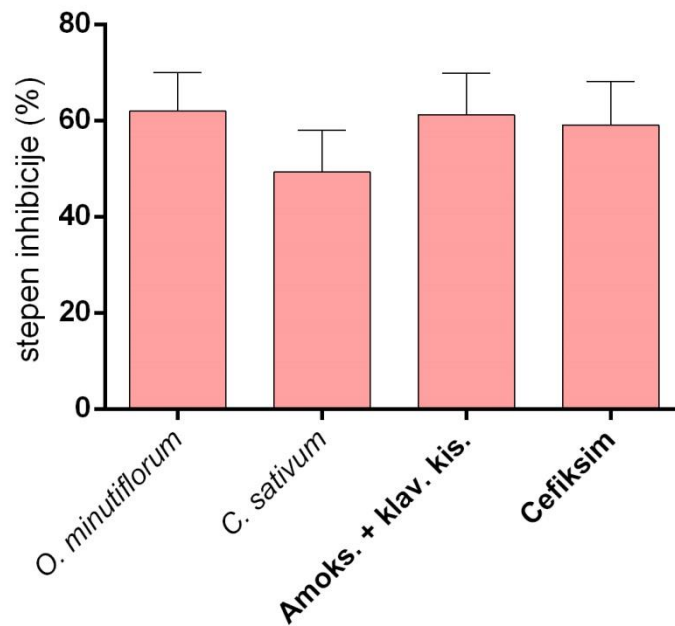
Ispitivan je i potencijal komercijalnih etarskih ulja da inhibiraju proces formiranja *S. aureus* biofilma, kao i njihov uticaj na već formirani *S. aureus* biofilm. Inhibitorni efekat testiranih komercijalnih etarskih ulja u koncentracijama: MIK; 0,5 MIK i 0,25 MIK, prikazan je na Grafiku 3.

Dobijeni rezultati pokazuju da je inhibicija formiranja biofilma zavisila od koncentracije etarskog ulja. Etarska ulja koja su primenjena u vrednosti MIK-a pokazala su sličnu aktivnost na inhibiciju formiranja *S. aureus* biofilma. Etarsko ulje *O. minutiflorum* testirano u koncentracijama MIK; 0,5 MIK i 0,25 MIK inhibiralo je formiranje *S. aureus* biofilma 33,46%, 30,16%, 19,86%, dok je antibiofilm aktivnost etarskog ulja *C. sativum* iznosila 34,63%, 30,64%, 27,25% (Grafik 3). Etarska ulja su pokazala slabiju aktivnost u poređenju sa komercijalnim antibioticima čiji je inhibitorni efekat pri MIK vrednostima iznosio 68,30% za amoksicilin i klavulonsku kiselinu i 83,35% za cefiksim (Grafik 3).



Grafik 3. Uticaj minimalnih inhibitornih i sub-inhibitornih koncentracija odabranih etarskih ulja na stepen inhibicije (%) formiranja biofilma *Staphylococcus aureus* (* $p < 0,05$ u poređenju amoksicilina sa klavulonskom kiselinom i etarskih ulja; * $p < 0,05$ u poređenju cefiksima i etarskih ulja).

Efekat testiranih etarskih ulja nakon tretmana (30 s) MBK vrednostima formiranog *S. aureus* biofilma prikazan je na grafiku 4. Etarsko ulje divljeg origana u odnosu na etarsko ulje korijandera, kao i u odnosu na testirane antibiotike je pokazalo bolji destruktivni efekat. Naime, nakon 30 s tretmana etarskim uljem divljeg origana, inhibicija formiranog *S. aureus* biofilma je iznosila 61,96%. Antibiotici su imali sličan inhibitorni efekat (61,14%, odnosno 59,05%), dok je etarsko ulje korijandera pokazalo da najslabije inhibira rast *S.aureus* u već formiranom biofilmu (49,28%) u poređenju sa etarskim uljem divljeg origana i antibioticima (Grafik 4).



Grafik 4. Efekti minimalnih baktericidnih koncentracija etarskih ulja na stepen inhibicije već formiranog biofilma *Staphylococcus aureus*.

Trenutno, u literaturi nisu predstavljeni podaci o antibiofilm aktivnosti etarskog ulja *O. minutiflorum* na *S. aureus*. Međutim, ispitivana je aktivnost etarskog ulja *O. majorana* na sprečavanje formiranja biofilma kao i na inhibiciju već formiranog biofilma MRSA izolata. Pokazano je da *O. majorana* ulje ima odličan efekat na inhibiciju formiranja (10,29 – 95,9%) i na destrukciju već formiranog biofilma (98,01%) (Ben Abdallah i dr., 2020). Međutim, iako je veći procenat inhibicije već formiranog biofilma to je zapaženo samo kod jednog soja, dok posmatrajući svih 30 testiranih sojeva, ovo ulje ima veći efekat na inhibiciju formiranja biofilma nego na inhibiciju već formiranog biofilma (Ben Abdallah i dr., 2020). Bazargani i Rohloff (2016), su ispitivali uticaj etarskog ulja *C. sativum* na inhibiciju formiranja biofilma *S. aureus* kao i metaboličku aktivnost biofilma. Autori su pokazali da etarsko ulje korijandera ima dobru antibiofilm aktivnost (procenat inhibicije 91%), ali i da je jako efikasno u slabljenju metaboličke aktivnosti ćelija *S. aureus* adheriranih u biofilm (38,3 – 72,6%) što je u skladu sa dobijenim rezultatima u ovoj disertaciji.

4.7.3. Antibakterijska aktivnost smeše etarskih ulja i antibiotika

U cilju smanjenja primene antibiotika kao i pojave rezistencije na antibiotike, ispitivan je antibakterijski efekat različitih kombinacija etarskih ulja sa antibioticima, kao i kombinacija 2 etarska ulja. Interakcija dve testirane supstance (u ovom slučaju etarsko ulje+antibiotik; etarsko ulje+etarsko ulje) određena je FIKI indeksom koji opisuje sinergistički ($FIKI < 0,5$), aditivni ($0,5 < FIKI \leq 1$), indiferentni ($1 < FIKI \leq 4$) i antagonistički odnos ($FIKI > 4$). Na inhibiciju rasta *S. aureus* etarsko ulje *O. minutiflorum* u kombinaciji sa antibiotikom amoksicilin i klavulonska kiselina ispoljava indiferentni efekat, kao i u kombinaciji sa cefimiksinom ($FIKI = 1,0078$, odnosno 2) (Tabela 18). Takođe, etarsko ulje korijandera u kombinaciji sa komercijalnim antibioticima ispoljava indiferentni efekat, dok etarska ulja u kombinaciji međusobno, ispoljavaju aditivnu aktivnost (Tabela 18). Kada je efekat testirane kombinacije sinergistički omogućeno je smanjenje koncentracije antibiotika prilikom kombinacije sa etarskim uljem, pri čemu je antibakterijski efekat primenjene kombinacije ekvivalentan individualnom antibiotičkom tretmanu, ali za čije je ostvarivanje bila potrebna znatno veća doza antibiotika. Indiferentan efekat u interakciji pokazuje da postoji odsustvo interakcije između testiranih agenasa, dok aditivan efekat pokazuje da je efekat

kombinacije određenih agenasa jednak sumi efekata koje agensi ostvaruju pojedinačno. Antagonistički efekat u interakciji pokazuje da je efekat etarskog ulja ili antibiotika slabiji kada se oba agensa primenjuju u kombinaciji, u odnosu na efekat koji ostvaruju pojedinačno (Bassolé i Juliani, 2012).

Na osnovu literaturnih podataka ulje origana u kombinaciji sa gentamicinom je pokazalo sinergistički efekat na *B. cereus*, *B. subtilis* i *S. aureus* (Langeveld i dr., 2014). Takođe, isti autori ističu da dominantna komponenta origana – karvakrol u kombinaciji sa ampicilinom, penicilinom, kao i sa bacitracinom pokazao je sinergistički antibakterijski efekat protiv *S. aureus*, dok je u kombinaciji sa eritromicinom bio efikasan protiv *S. pyogenes*. S obzirom da etarska ulja kao i njihova pojedinačna jedinjenja generalno dovode do oštećenja membrana ćelija, a većina antibiotika ima specifična mesta delovanja (inhibicija DNK sinteze ili specifičnih proteina), smatra se da je sinergizam upravo posledica njihovog delovanja na više mesta u ćeliji (Langeveld i dr., 2014). Aelenei i dr. (2019), su pokazali da etarsko ulje korijandera u kombinaciji sa amoksicilinom i gentamicinom deluje sinergistički na MRSA izolate. Takođe su utvrdili i sinergistički efekat ulja korijandera i oksacilina i tetraciklina na inhibiciju rasta *S. aureus* ATCC 33591. Naime, isti autori su ispitivali i interakciju linalola, kao najzastupljenije komponente etarskog ulja i različitih antibiotika i došli su do zaključka da je efekat interakcije linalola i oksacilina/amoksicilina/gentamicina/tetraciklina ili ciprofloksacina sinergistički u inhibiciji rasta MRSA izolata. Takođe, kao što je pokazano u interakciji etarskog ulja korijandera i gentamicina, i u kombinaciji linalola i gentamicina, linalol povećava osetljivost *S. aureus* (tj. smanjuje MIK), za razliku od podataka dobijenim u ovoj tezi gde nije zabeležen sinergizam između etarskog ulja i antibiotika.

Tabela 18. Antibakterijska aktivnost smeše testiranih etarskih ulja i antibiotika na *Staphylococcus aureus*.

Smeša etarskih ulja i antibiotika	FIKI	Efekat u interakciji
<i>Origanum minutiflorum</i> + Amoksicilin i klavulonska kiselina	1,0078	Indiferentni
<i>Origanum minutiflorum</i> + cefiksim	2	Indiferentni
<i>Coriandrum sativum</i> + Amoksicilin i klavulonska kiselina	1,0087	Indiferentni
<i>Coriandrum sativum</i> + cefiksim	2	Indiferentni
<i>Origanum minutiflorum</i> + <i>Coriandrum sativum</i>	0,65	Aditivni

4.7.4. Antioksidativna aktivnost testiranih etarskih ulja

Rezultati lipidne peroksidacije pokazali su da samo etarsko ulje divljeg origana poseduje antioksidativnu aktivnost (Tabela 19) i ima umerenu inhibiciju lipidne peroksidacije (0,25 mg/mL). Oba analizirana etarska ulja nisu pokazala antihemolitičku sposobnost koja je testirana OxHLIA testom.

Antioksidativna aktivnost etarskog ulja divljeg origana je nedovoljno istražena za razliku od *O. vulgare* etarskog ulja, za koje postoje podaci o njegovoj antioksidativnoj aktivnosti (Pezzani i dr., 2017). Međutim, za razliku od etarskog ulja *O. minutiflorum*, antioksidativna aktivnost različitih ekstrakata (heksanski, etil acetatni i *n*-butanolni) ove vrste jeste ispitivana. Pa tako, pokazano je da *n*-butanolni ekstrakt *O. minutiflorum* ima najbolju antioksidativnu aktivnost koja je testirana DPPH i ABTS metodama (Elmastas i dr., 2018).

Elgndi i dr. (2017) ispitivali su antioksidativnu aktivnost etarskog ulja *C. sativum* iz Srbije DPPH metodom i pokazali da etarsko ulje semena korijandera ima jako slabu antioksidativnu aktivnost ($IC_{50} = 39,15 \mu\text{g/mL}$), dok je uzorak iz Indije pokazao još nižu aktivnost ($IC_{50} = 47,2 \mu\text{g/mL}$) (Singh i dr., 2015). Poređenjem antioksidativne aktivnosti etarskog ulja korijandera dobijenog iz semena i etarskog ulja dobijenog iz listova, utvrđeno je da etarsko ulje semena poseduju bolju aktivnost (sposobnost hvatanja radikala). Smatra se da je razlog bolje aktivnosti veći procenat linalola u etarskom ulju dobijenom iz semena korijandera (Nadeem i dr., 2013). Naime, pored linalola, za snažnu antioksidativnu aktivnost etarskog ulja korijandera odgovorni i limonen, kamfor i α -pinen (Nadeem i dr., 2013).

Tabela 19. Antioksidativna aktivnost testiranih ulja (srednja vrednost \pm SD).

Etarska ulja	TBARS (mg/mL)
<i>Origanum minutiflorum</i>	$0,25 \pm 0,004$
<i>Coriandrum sativum</i>	>400
Troloks	$0,0196 \pm 0,01$

4.7.5. Citotoksična aktivnost testiranih etarskih ulja

Etarska ulja divljeg origana i korijandera su pokazala nižu, ali ipak značajnu citotoksičnu aktivnost na testiranu tumorsku ćelijsku liniju i ćelijsku kulturu PLP2 u poređenju sa elipticinom koji je korišćen kao pozitivna kontrola (Tabela 20). Poredeći vrednosti oba testirana ulja, može se zaključiti da etarsko ulje korijandera poseduje bolju citotoksičnu aktivnost ($GI_{50} 74,46 \mu\text{g/mL}$) na testiranu NCI – H460 ćelijsku liniju, nego ulje divljeg origana ($GI_{50} 81,44 \mu\text{g/mL}$).

Pokazano je da *O. minutiflorum* ulje poseduje visoku citotoksičnu aktivnost na HepG2, A549 i MCF-7 tumorske linije (Sokmen i dr., 2020). Han i Parker (2017), su pokazali da *O. vulgare* etarsko ulje menja gensku ekspresiju i signalne puteve koji su bitni za signalne procese razvoja tumora. Takođe, pokazano je da *O. vulgare*, značajno smanjuje proliferaciju tumorskih A549 ćelija nakon 24h u *in vitro* uslovima (Pezzani i dr., 2017). Koparal i Zeytinoglu (2003) su dokazali da karvakrol inhibira rast ćelija A549 ćelijske linije karcinoma pluća. Međutim, rezultati istraživanja Sharifi-Rad i dr. (2018) ističu da karvakrol u određenim dozama može biti toksičan za zdrave ćelije. Elgndi i dr. (2017) istraživali su citotoksičnost ulja *Satureja montana*, *Coriandrum sativum* i *Ocimum basilicum* i istakli da ulje korijandera pokazuje najmanju toksičnost na HeLa ćelije ($292,85 \mu\text{g/mL}$), dok na tumorske ćelijske linije (MRC-5, K562) nije pokazalo aktivnost.

S obzirom da su testirana etarska ulja pokazala određenu citotoksičnost na zdravim ćelijama jetre, koja je u poređenju sa citotoksičnom aktivnošću na tumorskoj liniji niža, to ukazuje da bi testirana ulja mogla naći primenu kao dodatna sredstva u antitumorskoj terapiji. Ipak, zbog pokazane *in vitro* citotoksične aktivnosti testiranih etarskih ulja, prilikom njihove primene, treba dodatno obratiti pažnju kako ne bi došlo do pojave neželjenih dejstava.

Tabela 20. Citotoksična aktivnost testiranih etarskih ulja (GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm SD).

Etarska ulja	PLP2	NCI – H460
<i>Origanum minutiflorum</i>	151,18 \pm 4,09	81,44 \pm 3,99
<i>Coriandrum sativum</i>	139,72 \pm 6,56	74,46 \pm 2,03
Elipticin	2,3 \pm 0,1	1,03 \pm 0,09

5. OPŠTA DISKUSIJA

Oralna mukoza je primarno mesto kolonizacije mikroorganizama iz spoljašnje sredine. Pored oralne mukoze, tonzile su pogodno mesto za rast i kolonizaciju mikroorganizama, zbog postojanja kripti (invaginacije epitela). Infekcije tonzila su perzistentne i antibiotska terapija je često nedovoljno efikasna, zbog čega dolazi do ponovljenih infekcija koje značajno utiču na kvalitet života i tada je jedini vid terapije hiruško uklanjanje tonzila. Usled neefikasnosti medikamenata, istražuje se potencijal prirodnih proizvoda različitog porekla koji bi mogli biti dodatna terapija u lečenju uzročnika HT-a (Mitchell i dr., 2019; Kostić i dr., 2020a).

U cilju detekcije mikroorganizama iz inficiranog tonzilarnog tkiva, prikupljeno je 79 uzoraka (nepčanih tonzila i adenoida) iz kojih su izolovana i identifikovana 82 bakterijska izolata. Većina identifikovanih G (+) bakterija pripada rodovima *Streptococcus* i *Staphylococcus*, dok su od ukupnog broja bakterija izolovane 2 vrste G (-) bakterija: *Enterobacter cloacae* i *Stenotrophomonas maltophilia*. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus oralis* i *S. parasanguinis* su bakterijske vrste koje su u najvećem broju izolovane iz tkiva nepčanih tonzila i adenoida, što su potvrdili i Kalaiarasi i dr., (2018). Patogena vrsta *S. aureus* je odgovorna za veliki broj infekcija (od površinskih kožnih do bakteremija) koje ukoliko se ne leče adekvatno mogu životno ugroziti obolelog. Faktori virulencije koji su zaslužni za patogenost ove vrste su njena sposobnost da formira biofilm kao i lučenje ekstracelularnih enzima koji naknadno oštećuju tkivo domaćina (Foster i dr., 2014; Kong i dr., 2016; Suresh i dr., 2019). Prisustvo *S. aureus* u nepčanom tkivu tonzila je potvrđeno i histološkom analizom u ovoj doktorskoj disertaciji. Nalaz *S. aureus* kod infekcija tonzila, kao i njena perzistencija u tonzilarnom tkivu nakon inflamatornog procesa objašnjava se njenom sposobnošću da formira biofilm (Kalaiarasi i dr., 2018).

Odabranih 7 vrsta makromiceta su u ovom radu prvi put okarakterisane u pogledu nutritivnog sastava i metabolita kao i u pogledu biološke aktivnosti. Testirane vrste karakteriše visok sadržaj ugljenih hidrata i proteina i nizak sadržaj masti i pepela. Ugljene hidrate makromiceta u najvećoj meri čine manitol od prostih ugljenih hidrata, koji ne utiču na nivo insulina u krvi, kao i β -glukani koji su odgovorni za značajnu biološku aktivnost (pre svega utiču na poboljšanje funkcije imunskog sistema, kao i za normalno funkcionisanje digestivnog sistema) (Rahi i Malik, 2016). Testirane vrste poseduju i nisku energetska vrednost što ih čini značajnom hranom u posebnim režimima ishrane. Pored visokog sadržaja makronutrijenata, ispitivane vrste odlikuje i visok sadržaj tokoferola, organskih i fenolnih kiselina. Visok sadržaj pomenutih jedinjenja je odgovoran za antioksidantnu i antimikrobnu aktivnost testiranih makromiceta (Alves i dr., 2013b).

S obzirom da je pokazano da bakterije mogu biti uzročnici HT-a, kao i da oksidativni stres utiče na povećanu inflamaciju i samim tim pojačan imunski odgovor kod HT-a (Kaygusuz i dr., 2003; Cvetković i dr., 2009), u ovom radu je ispitivan *in vitro* antibakterijski i antioksidantni potencijal makromiceta i etarskih ulja. Rezultati antimikrobne aktivnosti su pokazali da ekstrakti imaju slabiju antibakterijsku aktivnost od antibiotika. Takođe, izbor rastvarača utiče na antimikrobnu aktivnost; metanolni ekstrakti su pokazali bolju antimikrobnu aktivnost od etanolnih. Ekstrakti su demonstrirali i antibiofilm aktivnost. U slučaju ME *L. quietus*, EE *L. vellereus*, EE *R. integra* i ME i EE *R. rosea*, antibiofilm aktivnost je bila bolja u poređenju sa aktivnošću kontrole. Dobijeni rezultati ukazuju na perspektivu upotrebe makromiceta kao antibakterijskih i antibiofilm agenasa, posebno ukoliko se detaljno okarakterišu jedinjenja odgovorna za pomenute aktivnosti kao i njihov tačan mehanizam delovanja. Pored antimikrobne aktivnosti, testirani ekstrakti su pokazali i dobru antioksidantnu aktivnost, u slučaju *R. nigricans*, EE je pokazao bolju antioksidantnu aktivnost od kontrole (Trolox). Analiza citotoksičnosti je pokazala da ME i EE ekstrakti testiranih makromiceta imaju umerenu do slabu citotoksičnu aktivnost u odnosu na korišćenu kontrolu (Elipticin) na testiranu NCI – H460 tumorsku ćelijsku liniju.

Osim ispitivanja biološkog potencijala ekstrakata makromiceta ispitan je i biološki potencijal komercijalnih etarskih ulja. Za razliku od makromiceta, koje do sada nisu istraživane u kontekstu moguće primene u tretmanu uzročnika različitih infekcija, ulje divljeg origana se primenjuje u lečenju prvenstveno urinarnih infekcija. Ispitivana etarska ulja su pokazala bolju antibakterijsku aktivnost od testiranih makromiceta, ali ipak su imala slabiju aktivnost od antibiotika. Umerena aktivnost testiranih etarskih ulja je posledica prisustva visokog sadržaja karvakrola (*O. minutiflorum*) i linalola (*C. sativum*). Pored antibakterijske, ulja su pokazala i dobru antibiofilm aktivnost. Međutim, samo je etarsko ulje *O. minutiflorum* pokazalo antioksidanti potencijal. Analiza citotoksičnosti je pokazala da ispitivana etarska ulja imaju umerenu citotoksičnu aktivnost u odnosu na korišćenu kontrolu (Elipticin) na testiranu NCI – H460 tumorsku ćelijsku liniju.

Zbog prisustva biološki aktivnih jedinjenja, ekstrakti plodonosnih tela gljiva i etarska ulja ispoljavaju različite biološke aktivnosti, zato istraživanje do sada ne testiranih vrsta makromiceta i etarskih ulja doprinosi razvoju novih lekova koji će biti bazirani na njihovim biološki aktivnim jedinjenjima (Chatterjee i dr., 2017). Na osnovu predstavljenih rezultata hemijske analize i biološke aktivnosti makromiceta može se zaključiti da testirane makromicete predstavljaju dobar potencijal za razvoj lekova, ali da je potrebno *in vivo* ispitivanjima potvrditi dobijene rezultate *in vitro*. Sa druge strane, ispitivanja biološkog potencijala etarskih ulja potvrđuje aktivnosti zbog kojih se navedena ulja primenjuju u alternativnoj medicini. Međutim, ova doktorska disertacija ukazuje da se ulja *O. minutiflorum* i *C. sativum* mogu koristiti ne samo protiv urinarnih patogena i kontaminenata hrane, već i u slučaju infekcija GRT-a, posebno tonzila.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja hemijskog sastava i *in vitro* bioloških aktivnosti različitih vrsta makromiceta i etarskih ulja divljeg origana i korijandera na uzročnike hroničnog tonzilitisa, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- sakupljeni su uzorci tonzila od ukupno 75 pacijenata, koji su na osnovu uzrasta podeljeni u dve grupe.
- prvu grupu pacijenata su činile pretežno osobe ženskog pola (60%), prosečnog uzrasta 28,13 godina, dok su drugu grupu operisanih pacijenata činile 23 osobe muškog pola (51,11%), i 22 osobe ženskog pola (48,89%) prosečnog uzrasta 5,56 godina.
- na osnovu istorije bolesti prosečan godišnji broj upala grla kod svih pacijenata je >3. Najčešći simptom kod pacijenata Grupe I bio je bol u grlu, dok su dominantni simptomi kod Grupe II bili otežano disanje, prisustvo gustog sekreta u nosu i hrkanje.
- analiza orofaringoskopskog statusa je pokazala da su svi pacijenti zbog hiperemičnih, hipertrofičnih, kriptičnih tonzila zahtevali operaciju. Kod određenih pacijenata Grupe II urađena je i adenotomija jer su uočene asimetrične režnjevite tonzile sa hiperemijom nepčanih lukova, uvećan adenoid, kao i zamućene i netransparentne bubne opne, takođe indikacije za operaciju.
- iz tkiva nepčanih tonzila i adenoida izolovano je i identifikovano ukupno 82 izolata bakterija (Grupa I – 35 izolata; Grupa II – 47 izolata). *S. aureus* je najčešća vrsta u Grupi I, dok je *S. oralis* najviše izolovana vrsta Grupe II.
- histološka analiza tkiva posoperativnih tonzila potvrdila je prisustvo bakterija u tkivu i nakon terapije antibioticima. Potvrđeno je prisustvo *S. aureus* u tkivu nepčanih tonzila, dok je prisustvo *S. maltophilia* potvrđeno u uzorku tkiva adenoida.
- analiza nutritivne vrednosti testiranih makromiceta je pokazala najveću zastupljenost ugljenih hidrata (70,56 – 87,52 g/100 g suve mase), zatim proteina (1,81 – 21,3 g/100 g suve mase), za njima slede pepeo sa mineralnim elementima (3,71 – 8,84 g/100 g suve mase) i masti (0,55 g/100 g – 2,73 g/100 g suve mase). Energetska vrednost je pokazala da su testirane makromicete niskokalorijske namirnice (372 – 396,13 g/100 g suve mase).
- analiza odabranih šećera u plodonosnim telima makromiceta pokazala je prisustvo fruktoze, manitola i trehaloze. *R. rosea* je vrsta sa najvišim sadržajem šećera (25,84 g/100 g suve mase).
- identifikovane su α -, β -, γ - i δ - izoforme tokoferola u testiranim uzorcima. Najviša izmerena vrednost β -tokoferola bila je u uzorku *L. vellereus* (1391,1 μ g/100 g suve mase) što je ujedno i najveća vrednost ukupnih tokoferola.
- analiza sadržaja organskih kiselina je pokazala da su testirane makromicete značajan izvor organskih kiselina (0,020 – 85g/100 g suve mase), pri čemu je najveći sadržaj pojedinačne organske kiseline izmeren u uzorku *L. vellereus* (limunska kiselina, 85g/100 g suve mase).
- ukupni sadržaj fenolnih kiselina je varirao u opsegu 5,2 μ g/g ekstrakta (EE *L. piperatus*) do 4861 μ g/g ekstrakta (EE *L. quietus*), što je posledica visokog sadržaja *p*-hidroksibenzoeve kiseline u ovom uzorku (4735 μ g/g ekstrakta).
- analiza sadržaja masnih kiselina u testiranim uzorcima je pokazala da ukupna zastupljenost polinezasićenih, zasićenih i nezasićenih masnih kiselina varira u zavisnosti od uzorka. Linolna, stearinska, oleinska i palmitinska masna kiselina su najzastupljenije masne kiseline u svim uzorcima, ali su prisutne u različitim procentima.
- analizom hemijskog sastava etarskog ulja *O. minutiflorum*, identifikovano je dominantno jedinjenje karvakrol sa zastupljenošću od 81,5%. Dok je kod *C. sativum* linalol dominantno jedinjenje sa zastupljenošću od 69,6%. Dominantna grupa jedinjenja kod oba etarska ulja su oksidovani terpeni sa zastupljenošću od 87,92%, odnosno 80,08%.
- antibakterijska aktivnost ME i EE makromiceta okarakterisana je vrednostima MIK 0,20 – 25 mg/mL, odnosno MBK 0,40 – 50 mg/mL. Najosetljivije bakterije na sve testirane ME su

- bile: *M. luteus*, *S. agalactiae* i *S. parasanquinis* (MIK 0,20 mg/mL, MBK 0,40 mg/mL), dok su najosetljivije bakterije na sve testirane EE: *M. luteus*, *R. mucilaginosa*, *S. dysgalactiae* i *S. parasanquinis* (MIK 0,20 – 0,40 mg/mL, MBK 0,40 – 0,80 mg/mL). Svi testirani ekstrakti su pokazali slabiju antibakterijsku aktivnost od komercijalno testiranih antibiotika.
- etarsko ulje *O. minutiflorum* je pokazalo različitu antibakterijsku aktivnost (MIK 0,028 – 1,38 mg/mL, MBK 0,05 – 2,77 mg/mL). Najosetljivije bakterije su: *S. dysgalactiae* (MIK 0,055 mg/mL, MBK 0,11 mg/mL) i *S. hominis* (MIK 0,028 mg/mL, MBK 0,05 mg/mL), dok je najrezistentnija bakterija *S. aureus* (MIK 1,38 mg/mL, MBK 2,77 mg/mL). U odnosu na etarsko ulje divljeg origana, ulje korijanera je pokazalo nešto slabiju aktivnost (MIK 0,24 – 5,07 mg/mL, MBK 0,56– 9,65 mg/mL). *S. agalactiae* i *S. dysgalactiae* (MIK 0,24 mg/mL, MBK 0,56 mg/mL) su najosetljivije na delovanje etarskog ulja korijandera, dok su *M. luteus* (MIK 4,82 mg/mL, MBK 9,65 mg/mL) i *S. hominis* (MIK 5,07 mg/mL, MBK 9,65 mg/mL) najrezistentnije. Testirana ulja su pokazala slabiji antibakterijski efekat od komercijalno testiranih antibiotika.
 - metanolni i etanolni ekstrakti testiranih makromiceta pri MIK vrednostima efikasno su inhibirali formiranje *S. aureus* biofilma. Najbolji inhibitorni efekat su pokazali ME *L. quietus* (83,58%) i EE *R. rosea* (90,97%).
 - ispitivanjem efekta ME i EE testiranih makromiceta nakon tretmana (30 s) MBK na formirani *S. aureus* biofilm pokazano je da EE *L. piperatus*, ME i EE *L. vellereus*, EE *R. rosea* imaju bolji efekat na inhibiciju već formiranog biofilma od testiranih antibiotika.
 - etarsko ulje *O. minutiflorum* inhibiralo je formiranje *S. aureus* biofilma 33,46%, dok je antibiofilm aktivnost etarskog ulja *C. sativum* iznosila 34,63%, Etarska ulja su pokazala slabiju aktivnost u poređenju sa komercijalnim antibioticima.
 - etarsko ulje divljeg origana u odnosu na etarsko ulje korijandera, kao i u odnosu na testirane antibiotike je pokazalo bolju inhibiciju već formiranog biofilma.
 - testirane smeše etarskog ulja i antibiotika u različitim kombinacijama ispoljavaju indiferentni efekat na inhibiciju rasta *S. aureus*, dok je smeša etarskih ulja pokazala aditivnu aktivnost.
 - rezultati TBARS analize pokazali su da je najbolja aktivnost EE *R. nigricans* (IC₅₀ je 0,017 mg/mL), čiji je potencijal bolji i od aktivnosti pozitivne kontrole (IC₅₀ je 0,0196 mg/mL), dok su rezultati OxHLIA analize pokazali da najbolji antihemolitički efekat imaju ME i EE *R. nigricans* (IC₅₀ je 0,00102 i 0,091 mg/mL).
 - rezultati TBARS analize pokazali su da etarsko ulje divljeg origana poseduje umerenu antioksidativnu aktivnost (0,25 mg/mL) za razliku od ulja korijandera koje nije imalo antioksidantnu aktivnost. Testirana etarska ulja nisu pokazala antihemolitičku sposobnost koja je testirana OxHLIA testom.
 - testirani ekstrakti su slabiji citotoksični agensi od komercijalnog citostatika elipticina. Najbolju citotoksičnu aktivnost na NCI-H460 pokazao je EE *L. vellereus* sa GI₅₀ vrednošću 82,99 µg/mL.
 - etarska ulja divljeg origana i korijandera su pokazala značajnu citotoksičnost prema ćelijskoj liniji NCI – H460.
 - rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na antibakterijski efekat testiranih ekstrakata makromiceta i etarskih ulja protiv patogenih bakterija, uzročnika hroničnih infekcija tonzila. Ovo ohrabruje dalja istraživanja u cilju identifikacije aktivnih supstanci i rasvetljavanja molekularnih mehanizama na kojima se uočena aktivnost ostvaruje.

7. LITERATURA

- Adams, R. P. (2009). Identification of essential oil compounds by gas chromatography and mass spectrometry (4th ed.). Carol Stream: Allured Publishing Corporation.
- Adhikari, Sanjeev & Poudel, Ananta & Chandra, Subash. (2011). Nutritional Values and Preservation Techniques of Mushrooms. Foodwave Annual Bulletin, CCT, Tribhuvan University – 2010 (V - 8).
- Aelenei, P., Rimbu, C. M., Guguianu, E., Dimitriu, G., Aprotosoiaie, A. C., Brebu, M., Horhoge, C. E., Miron, A. (2019). Coriander essential oil and linalool – interactions with antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Letters in Applied Microbiology, 68(2), 156–164.
- Albayrak, S., Aksoy, A. (2019). Phenolic contents and biological activity of endemic *Origanum minutiflorum* grown in Turkey. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 53(1), 160–170.
- Aleksić, V. i Knezevic, P. (2014). Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. Microbiological Research, 169, 4, 240–254.
- Alliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet, 344, 721e4.
- Al-Mazrou, K.A., Al-Khattaf, A.S. (2008). Adherent biofilms in adenotonsillar diseases in children. Archives Otolaryngology Head Neck Surgery, 134 (1), 20–23.
- Altundag, S., Aslim, B., Ozturk, S. (2011). *In vitro* antimicrobial activities of essential oils from *Origanum minutiflorum* and *Sideritis erytrantha* subsp. *erytrantha* on phytopathogenic bacteria. Journal of Essential Oil Research, 23(1), 4–8.
- Alves Carneiro, V., Soares Melo, R., Mateus Gomes Pereira, A., Maria Albuquerque Azevedo, Á., Nágila Carneiro Matos, M., Mesquita Bastos Cavalcante, R., Rhonalty Rocha, R., de Queiroz Albuquerque, V., Alberto Pérez Guerrero, J., Eduardo Aragão Catunda Junior, F. (2020). Essential Oils as an innovative approach against biofilm of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. Bacterial Biofilms. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91833>
- Alves, M. J., Ferreira, I. C., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., Pintado, M. (2012). A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. Planta Medica, 78(16), 1707-18.
- Alves, M. J., Ferreira, I. C. F. R., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A. (2013a). A review on antifungal activity of mushroom (basidiomycetes) extracts and isolated compounds. Current topics in Medicinal Chemistry, 13, 2648–2659.
- Alves, M. J., Ferreira, I. C. F. R., Froufe, H. J. C., Abreu, R. M. V., Martins, A., Pintado, M. (2013b). Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. Journal of Applied Microbiology, 115(2), 346–357.
- Alves, M. J., Ferreira, I. C. F. R., Lourenço, I., Costa, E., Martins, A., Pintado, M. (2014a). Wild mushroom extracts as inhibitors of bacterial biofilm formation. Pathogens, 3(3), 667–679.
- Alves, M. J., Ferreira, I. C. F. R., Lourenço, I., Castro, A., Pereira, L., Martins, A., Pintado, M. (2014b). Wild mushroom extracts potentiate the action of standard antibiotics against multiresistant bacteria. Journal of Applied Microbiology, 116(1), 32–38.

- An, S., Lu, W., Zhang, Y., Yuan, Q., Wang, D. (2017). Pharmacological basis for use of *Armillaria mellea* polysaccharides in Alzheimer's Disease: Antiapoptosis and Antioxidation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 4184562.
- Ao, T., Deb, C. R. (2019). Nutritional and antioxidant potential of some wild edible mushrooms of Nagaland, India. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 1084–1089.
- Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E., Shirtliff, M. E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*, 2(5), 445–459.
- Astani, A., Reichling, J., Schnitzler, P., (2011). Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nep187>.
- Badalyan, S. (2012). Medicinal Aspects of Edible Ectomycorrhizal Mushrooms. 317–334.
- Bakar, M. A., McKimm, J., Haque, S. Z., Majumder, M. A. A., Haque, M. (2018). Chronic tonsillitis and biofilms: A brief overview of treatment modalities. *Journal of Inflammation Research*, 11, 329–337.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475.
- Bancroft, J. D., Layton, C. The Hematoxylin and Eosin. U: Suvarna S.K., Layton C., Bancroft J.D., editors. *Theory Practice of Histological Techniques*. 7th ed. Elsevier; Oxford, UK: 2013. pp. 173–186.
- Barroetaveña, C., Toledo, C.V. (2017). The Nutritional Benefits of Mushrooms. U: Ferreira, I.C.F.R., Morales, P. and Barros, L. (Eds). *Wild Plants, Mushroom and Nuts. Functional Food Properties and Applications*, Wiley Blackwell, pp 65-81.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Morais, J. S., Ferreira, I. C. F. R. (2007a). Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4781–4788.
- Barros, L., Baptista, P., Estevinho, L. M., Ferreira, I. C. F. R. (2007b). Effect of fruiting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of *Lactarius* sp. mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8766–8771.
- Barros, L., Baptista, P., Ferreira, I.C.F.R. (2007c). Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1731–1737.
- Barros, L. (2008). Chemical Characterization and Bioactive Properties of Portuguese Wild Edible Mushrooms. (Tesis de doctorado), Universidad de Salamanca - Facultad de Farmacia.
- Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L. M., Ferreira, I. C. F. R. (2008). Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology*, 46(8), 2742–2747.

- Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I. C., Baptista, P., Santos-Buelga, C. (2009). Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1076–9.
- Barros, L., Pereira, C., Ferreira, I. C. F. R. (2013). Optimized analysis of organic acids in edible mushrooms from Portugal by ultra fast liquid chromatography and photodiode array detection. *Food Analytical Methods*, 6(1), 309–316.
- Baser, K. H. C., Özek, T., Tümen, G., Sezik, E. (1993). Composition of the essential oils of Turkish *Origanum* species with commercial importance. *Journal of Essential Oil Research*, 5(6), 619–623.
- Bassolé, I. H. N., Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17, 3989–4006.
- Bauer Petrovska, B. (2001). Protein Fraction in Edible Macedonian Mushrooms. *European Food Research and Technology*, 212, 469–472.
- Baugh, R. F., Archer, S. M., Mitchell, R. B., Rosenfeld, R. M., Amin, R., Burns, J. J., Darrow, D. H., Giordano, T., Litman, R. S., Li, K. K., Mannix, M. E., Schwartz, R. H., Setzen, G., Wald, E. R., Wall, E., Sandberg, G., Patel, M. M. (2011). Clinical practice guideline: Tonsillectomy in children. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 144(SUPPL.1). <https://doi.org/10.1177/0194599810389949>
- Bazargani, M. M., Rohloff, J. (2016). Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*, 61, 156–164.
- Beatrix, B., Roman, K., Christian-Adrien, R. (2014). Pharyngeal Infections. *The Amplifon Monographs*, Paris, No. 56.
- Bellussi, L. M., Passali, F. M., Ralli, M., Vincentiis, M. D. E., Greco, A. (2019). An overview on upper respiratory tract infections and bacteriotherapy as innovative therapeutic strategy. *European review for Medicinal and Pharmacological science*, 23, 27–38.
- Ben Abdallah, F., Lagha, R., Gaber, A. (2020). Biofilm inhibition and eradication properties of medicinal plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Pharmaceuticals*, 13(11), 1–15.
- Bhuiyan, N. I., Begum, J., Sultana, M. (2009). Chemical composition of leaf and seed essential oil of *Coriandrum sativum* L. from Bangladesh. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 4, 150–153.
- Brook, I., Shah, K., Jackson, W. (2000). Microbiology of healthy and diseased adenoids. *Laryngoscope*, 110(6), 994–999.
- Bross, M., Hilger, C. S., Klamann, J. D., Schoneseiffen, J., Steglich, W., Sterner, O. (1987). Alkaloids from toadstools and mushrooms. U: Chemistry and biotechnology of biologically active natural products. Proceedings of 4th international conference, Budapest.
- Burdock, G.A., Carabin, I.G. (2009). Safety assessment of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil as a food ingredient. *Food Chemistry and Toxicology*, 47, 22–34.
- Butkhup, L., Samappito, W., Jorjong, S. (2017). Evaluation of bioactivities and phenolic contents of wild edible mushrooms from northeastern Thailand. *Food science and biotechnology*, 27(1), 193–202.

- Byars, S. G., Stearns, S. C., Boomsma, J. J. (2018). Association of long-term risk of respiratory, allergic, and infectious diseases with removal of adenoids and tonsils in childhood. *JAMA Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 144(7), 594–603.
- Calhella, R. C., Falcão, S., Queiroz, M. J. R. P., Vilas-Boas, M., Ferreira, I. C. F. R. (2014). Cytotoxicity of Portuguese Propolis: the proximity of the *in vitro* doses for tumor and normal cell lines. *Biomed Research International*, 1–7.
- Cardoso, R. V. C., Fernandes, Â., Barreira, J. C. M., Verde, S. C., Antonio, A. L., González-Paramás, A. M., Barros, L., Ferreira I. C. F. R. (2019). Effectiveness of gamma and electron beam irradiation as preserving technologies of fresh *Agaricus bisporus* Portobello: a comparative study. *Food Chemistry*, 278, 760–766.
- Carneiro de Barros J., da Conceicao M. L., Gomes Neto N. J., i dr. (2009). Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 1139–43.
- Casetti, F., Bartelke, S., Biehler, K., Augustin, M., Schempp, C.M., Frank, U. (2012). Antimicrobial activity against bacteria with dermatological relevance and skin tolerance of the essential oil from *Coriandrum sativum* L. fruits. *Phytotherapy Research*, 26(3), 420–424.
- Cavalcanti, V. P., Camargo, L. A. de Moura, F. S., Fernandes, E. J. de M., Lamaro-Cardoso, J., Braga, C. A. da S. B., André, M. C. P. (2019). *Staphylococcus aureus* in tonsils of patients with recurrent tonsillitis: prevalence, susceptibility profile, and genotypic characterization. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 23(1), 8–14.
- Chang, S. T., Wasser, S. P. (2012). The role of culinary – medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 14(2), 95–134.
- Chatterjee, S., Sarma, M. K., Deb, U., Steinhäuser, G., Walther, C., Gupta, D. K. (2017). Mushrooms: from nutrition to mycoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 19480–19493.
- Chen, C. C., Kuo, Y. H., Cheng, J. J., Sung, P. J., Ni, C. L., Chen, C. C., Shen, C. C. (2015). Three new sesquiterpene aryl esters from the Mycelium of *Armillaria mellea*. *Molecules*, 20(6), 9994–10003.
- Chen, Y. J., Chen, C. C., Huang, H. L. (2016). Induction of apoptosis by *Armillaria mellea* constituent armillaridin in human hepatocellular carcinoma. *Oncotargets and Therapy*, 9, 4773–4783.
- Cheng, J. J., Lin, C. Y., Lur, H. S., Chen, H. P., Lu, M. K. (2008). Properties and biological functions of polysaccharides and ethanolic extracts isolated from medicinal fungus, *Fomitopsis pinicola*. *Process Biochemistry*, 43(8), 829–834.
- Cheung, P. C. K. (2010). The nutritional and health benefits of mushrooms. *Nutrition Bulletin*, 35(4), 292–299.
- Chi, C. W., Chen, C. C., Chen, Y. J. (2013). Therapeutic and radiosensitizing effects of armillaridin on human esophageal cancer cells. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine*, 2013, 459271.

- Chole, R. A., Faddis, B. T. (2003). Anatomical Evidence of Microbial Biofilms in Tonsillar Tissues. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 129(6), 634.
- Cioanca, O., Hritcu, L., Mihasan, M., Hancianu, M. (2013). Cognitive-enhancing and antioxidant activities of inhaled coriander volatile oil in amyloid β (1-42) rat model of Alzheimer's disease. *Physiology & Behavior*, 120, 193–202.
- Clark, S. E. (2020). Commensal bacteria in the upper respiratory tract regulate susceptibility to infection. *Current Opinion in Immunology*, 66, 42–49.
- Clericuzio, M., Cassino, C., Corana, F., Vidari, G. (2012). Terpenoids from *Russula lepida* and *R. amarissima* (Basidiomycota, Russulaceae). *Phytochemistry*, 84, 154–159.
- Cox, K. D., Scherm H, Riley M. B. (2006). Characterization of *Armillaria* spp. from peach orchards in the southeastern United States using fatty acid methyl ester profiling. *Mycological Research*, 110(Pt 4), 414-22.
- Cvetković, T.; Vlahović, P.; Todorović, M.; Stanković, M. (2009). Investigation of oxidative stress in patients with chronic tonsillitis. *Auris Nasus Larynx*, 36, 340–344.
- Čuvalová, A., Strapáč, I., Handrová, L., & Kmeť, V. (2018). Antibiofilm activity of mushroom extracts against *Staphylococcus aureus*. *Annales Universitatis Paedagogicae Cracoviensis Studia Naturae*, 3, 17–23.
- Darughe, F., Barzegar, M., Sahari, M. A. (2012). Antioxidant and antifungal activity of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil in cake. *International Food Research Journal*, 19(3), 1253-1260.
- De Figueiredo, R. O., Marques, M. O. M., Nakagawa, J., Ming, L. C. (2004). Composition of coriander essential oil from Brazil. *Acta Horticulturae*, 629, 135-137.
- Dell'Aringa, A. R., Juares, A. J., Melo, C.d, Nardi J. C, Kobari, K., Perches Filho, R. M. (2005). Histological analysis of tonsillectomy and adenoidectomy specimens-January 2001 to May 2003. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 71(1), 18-22.
- De Mastro, G., Tarraf, W., Verdini, L., Brunetti, G., Ruta, C. (2017). Essential oil diversity of *Origanum vulgare* L. populations from southern Italy. *Food Chemistry*, 235, 1–6.
- De Silva, D. D., Rapior, S., Sudarman, E., Stadler, M., Xu, J., Aisyah Alias, S., Hyde, K. D. (2013). Bioactive metabolites from macrofungi: Ethnopharmacology, biological activities and chemistry. *Fungal Diversity*, 62(1), 1–40.
- Demirel, N., Erdogan, C. (2017). Insecticidal effects of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored pea seeds. *Entomology and Applied Science Letters*, 4, 13–19.
- Dhanapakiam, P., Joseph, J. M., Ramaswamy, V. K., Moorthi, M., Kumar, A. S. (2008) The cholesterol lowering property of coriander seeds (*Coriandrum sativum*): mechanism of action. *Journal of Environmental Biology*, 29(1), 53-6.
- Dogan, H. H., Aydin, S. (2013). Some biological activities of *Lactarius vellereus* (Fr.) Fr. in Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16(21), 1279–1286.

- Dubois, D., Grare, M., Prere, M., Segonds, C., Marty, N., Oswald, E. (2012). Performances of the Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry System for Rapid. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(8), 2568–2576.
- Dziedzic, A., Wojtyczka, R. D. W., Kubina, R. (2015). Inhibition of oral streptococci growth induced by the complementary action of berberine chloride and antibacterial compounds. *Molecules*, 20(8), 13705–13724.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. (2013). Scientific opinion on the safety of “coriander seed oil” as a novel food ingredient. *EFSA Journal*, <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3422>.
- Elgndi, M. A., Filip, S., Pavlič, B., Vladić, J., Stanojković, T., Žižak, Ž., Zeković, Z. (2017). Antioxidative and cytotoxic activity of essential oils and extracts of *Satureja montana* L., *Coriandrum sativum* L. and *Ocimum basilicum* L. obtained by supercritical fluid extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 128, 128–137.
- Elmastas, M., Isildak, O., Turkecul, I., Temur, N. (2007). Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3–4), 337–345.
- Elmastas, M., Celik, S. M., Genc, N., Aksit, H., Erenler, R., Gulcin, İ. (2018). Antioxidant activity of an anatolian herbal tea *Origanum minutiflorum*: Isolation and characterization of its secondary metabolites. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 374–384.
- Elsayed, E. A., El Enshasy, H., Wadaan, M. A. M., Aziz, R. (2014). Mushrooms: A potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications. *Mediators of Inflammation*, 2014, 805841.
- Erickson, B. K., Larson, D. R., St Sauver, J. L., Meverden, R. A., Orvidas, L. J. (2009). Changes in incidence and indications of tonsillectomy and adenotonsillectomy, 1970–2005. *Otolaryngology Head Neck Surgery*, 140(6), 894–901.
- Eslahi, H., Fahimi, N., Sardarian, A. R. (2018). Chemical composition of essential oils. *Essential oils in food processing: Chemistry, Safety, and applications*. 1st ed., Eds. Baghee Hashemi, S. M., Khaneghah, A. M., de Souza Sant Ana, A. John Wiley & Sons Ltd.
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clin. Microbiol. Infect.* 2003, 9, ix–xv.
- Fernandes, A., Barros, L., Antonio, A. L., Barreira, J. C. M., Oliveira, M. B. P. P., Martins, A., Ferreira, I. C. F. R. (2014). Using gamma irradiation to attenuate the effects caused by drying or freezing in *Macrolepiota procera* organic acids and phenolic compounds. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 3012–3021.
- Fernandes, Â., Petrović, J., Stojković, D., Barros, L., Glamočlija, J., Soković, M., Ferreira, I. C. F. R. (2016). *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr from different origins: Chemical characterization, screening of the bioactive properties and specific antimicrobial effects against *Pseudomonas aeruginosa*. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 91–97.
- Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Abreu, R. (2009). Antioxidants in Wild Mushrooms. *Current*

Medicinal Chemistry, 16(12), 1543–1560.

- Ferreira, I. C. F. R., Dias, J., Martins, A., Pintado, M. (2012). A Review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Medica*, 1707–1718.
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., Hook, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 49–62.
- Freires, I. d. A., Murata, R. M., Furletti, V. F., Sartoratto, A., de Alencar, S. M., Figueira, G. M., Rodrigues, J. A. d. O., Duarte, M. C. T., Rosalen, P. L. (2014). *Coriandrum sativum* L. (Coriander) essential oil: antifungal activity and mode of action on *Candida* spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. *PLOS ONE* 9(6), e99086.
- Furletti, V. F., Teixeira, I. P., Obando-Pereda, G., Mardegan, R. C., Sartoratto, A., Figueira, G. M., Duarte, R. M. T., Rehder, V. L. G., Duarte, M. C. T., Höfling, J. F. (2011). Action of *Coriandrum sativum* L. Essential oil upon oral *Candida albicans* biofilm formation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 8–10.
- Galli, J., Calò, L., Ardito, F., Imperiali, M., Bassotti, E., Fadda, G., Paludetti, G. (2007). Biofilm formation by *Haemophilus influenzae* isolated from adeno-tonsil tissue samples, and its role in recurrent adenotonsillitis. *Acta Otorhinolaryngologica Italica : Organo Ufficiale Della Società Italiana Di Otorinolaringologia e Chirurgia Cervico-Facciale*, 27(3), 134–138.
- Ganesan, P., Phaiphon, A., Murugan, Y., Baharin, B. S. (2013). Comparative study of bioactive compounds in curry and coriander leaves: an update. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5, 590–4.
- García-Rodríguez, J. A., Fresnadillo Martínez, M. J. (2002). Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50 Suppl S2:59–73.
- Gardner L. D., Loffredo C. A., Langenberg P., George D. M. S., Deepak J., Harris C., Amr S. (2018). Associations between history of chronic lung disease and non-small cell lung carcinoma in Maryland: variations by sex and race. *Annals of Epidemiology*, 28(8), 543–548.
- Gautam, N., Mantha, A. K., Mittal, S. (2014). Essential oils and their constituents as anticancer agents: A mechanistic view. *BioMed Research International*, 2014, 154106.
- Glamočlija, J., Ćirić, A., Nikolić, M., Fernandes, A., Barros, L., Calhelha, R. C., Ferreira, I. C. F. R., Soković, M., van Griensven, L. J. L. D. (2015). Chemical characterization and biological activity of Chaga (*Inonotus obliquus*), a medicinal “mushroom”. *Journal of Ethnopharmacology*, 162, 323–332.
- Glamočlija, J., Kostić, M., Soković, M. (2019). Antimicrobial and hepatoprotective activities of edible mushrooms, Chapter 4 pp 81-113, *U: “Biology of macrofungi”*, Eds. Bhim Pratap Singh, Lallawmsanga Chhakchhuak, Ajit Kumar Passari, Springer International publishing AG, Gewerbestrasse 11, 6330 Cham, Switzerland eBook ISBN 978-3-030-02622-6 Hardcover ISBN 978-3-030-02621-9; DOI 10.1007/978-3-030-02622-6 Series ISSN 2198-7777; Copyright 2019
- Gupta, S., Raghuvanshi, M., Jain, D. (2010). Comparative studies on anti-inflammatory activity of *Coriandrum sativum*, *Datura stramonium* and *Azadirachta indica*. *Asian Journal of*

Experimental Biological Sciences, 1 (1), 151–154.

- Hadžić, I., Vukojević, J. (2008). Ilustrovani rečnik sveta gljiva. Blaženčić, J., Nikšić, M. (Eds), NNK.
- Haidara, A. W., Sidibé, Y., Samaké, D., Coulibaly, A., Touré, M. K., Coulibaly, B. B., Soumaoro, S., Guindo, B., Diarra, K., Coulibaly, K., Sanogo, B., Kéïta, M., & Mohamed, A. A. (2019). Tonsillitis and Their Complications: Epidemiological, Clinical and Therapeutic Profiles. *International Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery*, 08(03), 98–105.
- Hall, M. J., Schwartzman, A., Zhang, J., Liu, X. (2017). Ambulatory surgery data from hospitals and ambulatory surgery centers: United States, 2010. *National Health Statistics Report*, 102, 1–15.
- Han, X., Parker, T. L. (2017). Anti-inflammatory, tissue remodeling, immunomodulatory, and anticancer activities of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil in a human skin disease model. *Biochimie Open*, 4, 73–77.
- Hassan, F. A. S., Ali, E. F. (2014). Impact of different water regimes based on class-A pan on growth, yield and oil content of *Coriandrum sativum* L. plant. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 13(2), 155–161.
- Heleno, S. A., Barros, L., Sousa, M. J., Martins, A., Ferreira, I. C. F. R. (2009). Study and characterization of selected nutrients in wild mushrooms from Portugal by gas chromatography and high performance liquid chromatography. *Microchemical Journal*, 93(2), 195–199.
- 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(4), 1443–1450.
- Heleno, S. A., Barros, L., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R. (2012). Phenolic, polysaccharidic, and lipidic fractions of mushrooms from northeastern Portugal: Chemical compounds with antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(18), 4634–4640.
- Hibbert, P., Stephens, J. H., de Wet, C., Williams, H., Hallahan, A., Wheaton, G. R., Dalton, C., Ting, H. P., Arnolda, G., Braithwaite, J. (2019). Assessing the Quality of the Management of Tonsillitis among Australian Children: A Population-Based Sample Survey. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)*, 160(1), 137–144.
- Horwitz, W., Latimer, G. (Eds.) *AOAC Official Methods of Analysis of AOAC International*; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA, 2016.
- Hur, J. S., Choi, Y. S., Lim, Q. B. (2012). *In vitro* Anti-Inflammatory activity of *Russula virescens* in the macrophage like cell RAW 264.7 activated by lipopolysaccharide. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 2, 4.
- Idaomar, M., El Hamss, R., Bakkali, F., Mezzoug, N., Zhiri, A., Baudoux, D., Munoz-Serrano, A., Liemans, V., Alonso-Moraga, A. (2002). Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis*, 513, 61–68.
- Jacqueline, C., Navas, D., Batard, E., Miegerville, A. F., Le Mabecque, V., Kergueris, M. F., Bugnon, D., Potel, G., Caillon, J. (2005). *In vitro* and *in vivo* synergistic activities of linezolid

- 264 combined with subinhibitory concentrations of imipenem against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy journal*, 49, 45–51.
- Janszky, I., Mukamal, K.J., Dalman, C., Hammar, N., Ahnve S. (2011). Childhood appendectomy, tonsillectomy, and risk for premature acute myocardial infarction – a nationwide population-based cohort study. *European Heart Journal*, 32, 2290–2296.
- Jeong, J. H., Lee, D. W., Ryu, R. A., Lee, Y. S., Lee, S. H., Kang, J. O., Tae, K. (2007). Bacteriologic comparison of tonsil core in recurrent tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *Laryngoscope*, 117, 2146–2151.
- Johnson, M. M. (2018). Ear, Nose, and Throat Infections. In *Diagnostic Pathology of Infectious Disease (Second Edi)*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44585-6.00007-2>
- Johnston, J. J., Douglas, R. (2018). Adenotonsillar microbiome : an update. *Postgraduate Medicinal Journal*, 1–6.
- Júnior, E., Fernandes, D. M., Lamaro-cardoso, J., Afonso, C., Braga, B., Cláudia, M., André, P. (2019). Original article *Staphylococcus aureus* in tonsils of patients with recurrent tonsillitis : prevalence, susceptibility profile, and genotypic characterization. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 23(1), 8–14.
- Kalač, P. (2013). A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 209–218.
- Kalaiarasi, R., Subramanian, K. S., Vijayakumar, C., Venkataramanan, R. (2018). Microbiological profile of chronic tonsillitis in the pediatric age group. *Cureus*, 10(9). <https://doi.org/10.7759/cureus.3343>
- Kalogeropoulos, N., Yanni, A. E., Koutrotsios, G., Aloupi, M. (2013). Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the island of Lesbos, Greece. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 378–385.
- Kalyoncu, F., Oskay, M., Sağlam, H., Erdoğan, T. F., Tamer, A. U. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of mycelia of 10 wild mushroom species. *Journal of Medicinal Food*, 13(2), 415–419.
- Kania, R. E., Lamers, G. E., Vonk, M. J., Huy, P. T., Hiemstra, P. S., Bloemberg, G. V., Grote, J. J. (2007). Demonstration of bacterial cells and glycocalyx in biofilms on human tonsils. *Archives Otolaryngology Head Neck Surgery*, 133 (2), 115–121.
- Karlowisky, J. A., Hoban, D. J., Zhanel, G. G., Goldstein, B. P. (2006). *In vitro* interactions of anidulafungin with azole antifungals, amphotericin B and 5-fluorocytosine against *Candida* species. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27, 174–177.
- Katkowska, M., Garbacz, K., Ozef, J. (2016). *Staphylococcus aureus* isolated from tonsillectomized adult patients with recurrent tonsillitis. *Acta pathologica, microbiologica et immunologica scandinavica*, 1–6.
- Kaygusuz, R., Nevin, I. (2003). Free radicals and scavenging enzymes in chronic tonsillitis. *Otolaryngology – Head Neck Surgery*, 5998(02).
- Khan, I. U., Dubey, W., Gupta, V. (2014). Taxonomical Aspect of Coriander (*Coriandrum sativum* L.). *International Journal of Current Research*, 6(11), 9926–9930.

- Khan, M., Khan, S. T., Khan, M., Mousa, A. A., Mahmood, A., Alkhatlan, H. Z. (2019). Chemical diversity in leaf and stem essential oils of *Origanum vulgare* L. and their effects on microbicidal activities. *AMB Express*, 9, 176.
- Khatua, S., Dutta, A. K., Chandra, S., Paloi, S., Das, K., Acharya, K. (2017). Introducing a novel mushroom from mycophagy community with emphasis on biomedical potency. *PLoS ONE*, 12, e0178050.
- Kong, C., Neoh, H. M., Nathan, S. (2016). Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: A potential form of anti-virulence therapy. *Toxins (Basel)*, 15, 8(3), E72.
- Koparal, A. T., Zeytinoglu, M. (2003). Effects of carvacrol on a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, A549. *Cytotechnology*, 43(1–3), 149–154.
- Kosanić, M., Petrović, N., Milošević-Djordjević, O., Grujičić, D., Tubić, J., Marković, A., Stanojković, T. (2020). The health promoting effects of the fruiting bodies extract of the peppery milk cap mushroom *Lactarius piperatus* (Agaricomycetes) from Serbia. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 22(4), 347–357.
- Kosar, M., Ozek, T., Goger, F., Kurkcuglu, M., Baser, K. H. C. (2005). Comparison of microwave assisted hydrodistillation and hydrodistillation methods for the analysis of volatile secondary metabolites. *Pharmaceutical Biology*, 43(6), 491–495.
- Koskenkorva, T., Koivunen, P., Alho, O. (2016). Predictive factors for medical consultation for sore throat in adults with recurrent pharyngotonsillitis. *International Journal of Otolaryngology*, 1–5.
- Kostić, M., Smiljković, M., Petrović, J., Glamočlija, J., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., Ćirić, A., Soković, M. (2017). Chemical, nutritive composition and a wide range of bioactive properties of honey mushroom: *Armillaria mellea* (Vahl: Fr.) Kummer. *Food and Function*, 8(9).
- Kostić, M., Ivanov, M., Babić, S. S., Petrović, J., Soković, M., Ćirić, A. (2020a). An Up-to-date review on bio-resource therapeutics effective against bacterial species frequently associated with chronic sinusitis and tonsillitis. *Current Medicinal Chemistry*, 27(41), 6892–6909.
- Kostić, M., Ivanov, M., Fernandes, Â., Pinela, J., Calhelha, R. C., Glamočlija, J., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., Soković, M., Ćirić, A. (2020b). Antioxidant extracts of three *Russula* genus species express diverse biological activity. *Molecules*, 25, 4336.
- Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Vrvić, M. M., Todorović, N., van Griensven, L. J. L. D., Jakovljević, D. (2012). Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26, 144–153.
- Kozarski, M., Klaus, A., Jakovljević, D., Todorović, N., Vunduk, J., Petrović, P., Nikšić, M., Vrvić, M. M., Van Griensven, L. (2015). Antioxidants of edible mushrooms. *Molecules*, 20(10), 19489–19525.
- Kumpitsch, C., Koskinen, K., Schöpf, V., Moissl-eichinger, C. (2019). The microbiome of the upper respiratory tract in health and disease. *BMC Biology*, 1–20.
- Lahlou, M. (2013). The Success of Natural Products in Drug Discovery. *Pharmacology & Pharmacy*, 4, 17–31.

- Langeveld, W. T., Veldhuizen, E. J. A., Burt, S. A. (2014). Synergy between essential oil components and antibiotics: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 40(1), 76–94.
- Laribi, B., Kouki, K., M'Hamdi, M., Bettaieb, T. (2015). Coriander (*Coriandrum sativum* L.) and its bioactive constituents. *Fitoterapia*, 103, 9–26.
- Lescanne, E., Chiron, B., Constant, I., Couloigner, V., Fauroux, B., Hassani, Y., Jouffroy, L., Lesage, V., Mondain, M., Nowak, C., Orliaguet, G., Viot, A. (2012). Pediatric tonsillectomy: Clinical practice guidelines (AFCA), French Society for Anaesthesia, Intensive Care (SFAR). *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, 129(5), 264–271.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., Abete P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Intervention in Aging*, 13, 757–772.
- Lister, J. L. i Horswill, A. R. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 178.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods : Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126.
- Lombrea, A., Antal, D., Ardelean, F., Avram, S., Pavel, I. Z., Vlaia, L., Mut, A. M., Diaconeasa, Z., Dehelean, C. A., Soica, C., Danciu, C. (2020). A recent insight regarding the phytochemistry and bioactivity of *Origanum vulgare* L. essential oil. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 1–28.
- Lu, M., Dai, T., Murray, C. K., Wu, M.X. (2018). Bactericidal property of oregano oil against multidrug-resistant clinical isolates. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2329.
- Lunny, C., Knopp-Sihota, J. A., Fraser, S. N. (2013). Surgery and risk for multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *BMC Neurology*, 13, 41.
- Luo, D. Q., Wang, F., Bian, X. Y., Liu, J. K. (2005). Rufuslactone, a new antifungal sesquiterpene from the fruiting bodies of the Basidiomycete *Lactarius rufus*. *Journal of Antibiotics*, 58, 456–459.
- Maeda, K., Nagata, H., Kuboniwa, M., Ojima, M., Osaki, T., Minamino, N., Amano, A. (2013). Identification and Characterization of *Porphyromonas gingivalis* Client Proteins That Bind to *Streptococcus oralis* Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. *Infection and Immunity*, 81, 753–763.
- Man, W. H., De Steenhuijsen Pijters, W. A. A., Bogaert, D. (2017). The microbiota of the respiratory tract: Gatekeeper to respiratory health. *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), 259–270.
- Mandal, S., Mandal, M. (2015). Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: Chemistry and biological activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(6), 421–428.
- Manzi, P., Marconi, S., Aguzzi, A., Pizzoferrato, L. (2004). Commercial mushrooms: Nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry*, 84 (2), 201–206.
- Maruyama, H., Ikekawa, T. (2007). Immunomodulation and antitumor activity of a mushroom product, proflamin, isolated from *Flammulina velutipes* (W.Curt.:Fr.) Singer (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 9, 109–22.

- Mezzoug, N., Elhadri, A., Dallouh, A., Amkiss, S., Skali, N.S., Zhiri, A., Abrini, J., Bau-doux, D., Diallo, B., Jaziri, M.E., Idaomar, M. (2007). Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 629, 100–110.
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules*, 15(12), 9252–9287.
- Mihailović, M., Arambašić Jovanović, J., Uskoković, A., Grdović, N., Dinić, S., Vidović, S., Poznanović, G., Mujić, I., Vidaković, M. (2015). Protective effects of the mushroom *Lactarius deterrimus* extract on systemic oxidative stress and pancreatic islets in streptozocin-induced diabetic rats. *Journal of Systemic Diabetes Research*, 2015, 576276.
- Misiek, M., Williams, J., Schmich, K., Hüttel, W., Merfort, I., Salomon, C., Aldrich, C. A., Hoffmeister, D. (2009). Structure and cytotoxicity of Arniamial and related fungal sesquiterpene aryl esters. *Journal of Natural Products*, 72, 1888–1891.
- Mitchell, R. B., Archer, S. M., Ishman, S. L., Rosenfeld, R. M., Coles, S., Finestone, S. A., Friedman, N. R., Giordano, T., Hildrew, D. M., Kim, T. W., Lloyd, R. M., Parikh, S. R., Shulman, S. T., Walner, D. L., Walsh, S. A., Nnacheta, L. C. (2019). Clinical Practice Guideline: Tonsillectomy in Children (Update)—Executive Summary. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)*, 160(2), 187–205.
- Mogoantă, C. A., Ioniță, E., Pirici, D., Mitroi, M., Anghelina, F., Ciolofan, S., Pătru, E. (2008). Chronic tonsillitis: Histological and immunohistochemical aspects. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 49(3), 381–386.
- Moormeier, D. E., Bayles, K. W. (2017). *Staphylococcus aureus* Biofilm: A Complex Developmental Organism Graphical Abstract HHS Public Access. *Mol Microbiol*, 104(3), 365–376.
- Moro, C., Palacios, I., Lozano, M., D'Arrigo, M., Guillamón, E., Villares, A., Martínez, J. A., García-Lafuente, A. (2012). Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages. *Food Chemistry*, 130(2), 350–355.
- Msaada, K., Hosni, K., Ben Taarit, M., Chahed, T., Kchouk, M.E., Marzouk, B., 2007. Changes on essential oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits during three stages of maturity. *Food Chemistry*, 102, 1131–1134.
- Mujić, I., Zeković, Z., Vidović, S., Radojković, M., Živković J., Gođevac, D. (2011). Fatty acids profiles of four wild mushrooms and their potential benefits for hypertension treatment. *Journal of medicinal Food*, 1330–1337.
- Muszynska, B., Sulkowska-Ziaja, K., Ekiert, H. (2013). Phenolic acids in selected edible basidiomycota species: *Armillaria mellea*, *Boletus badius*, *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarius*, *Lactarius deliciosus* and *Pleurotus ostreatus*. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 12, 107–116.
- Nadeem, M., Anjum, F. M., Khan, M. I., Tehseen, S., El-Ghorab, A., Sultan, J. I. (2013). Nutritional and medicinal aspects of coriander (*Coriandrum sativum* L.): A review. *British Food Journal*, 115(5), 743–755.

- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria, *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474.
- Neffati, M., Marzouk, B. (2008). Changes in essential oil and fatty acid composition in coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves under saline conditions. *Industrial Crops and Products*, 28, 137–142.
- Nejad Ebrahimi, S., Hadian, J., Ranjbar, H. (2010). Essential oil compositions of different accessions of *Coriandrum sativum* L. from Iran. *Natural Product Research*, 24(14), 1287–1294.
- Nemati, S., Mohammadghasemi, F., Mojtahedi, A., Habibi, A. F., Rouhi, S., Leili, E. K. N., Moroosi, M. (2020). The effects of radiofrequency on the bacteriological and histological characteristics of tonsils in patients with chronic and persistent tonsillitis. *American Journal of Otolaryngology*, 41(6), 102657.
- Ng, L. T., Wu, S. J., Tsai, J. Y., Lai, M. N. (2007). Antioxidant activities of cultured *Armillariella mellea*. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol*, 43, 495–500.
- Ng, H., Wong, E., Curotta, J., Trapani, S., Cheng, A. T. (2019). Tertiary hospital retrospective observational audit of tonsillectomy. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 20–25.
- Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Fernandes, Â., Marković, T., Marković, D., Giweli, A., Soković, M. (2014a). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183–190.
- Nikolić, M., Jovanović, K. K., Marković, T., Marković, D., Gligorijević, N., Radulović, S., Soković, M. (2014b). Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxic properties of five Lamiaceae essential oils. *Industrial Crops and Products*, 61, 225–232.
- Nikolić, M. M., Jovanović, K. K., Marković, T. L., Marković, D. L., Gligorijević, N. N., Radulović, S. S., Kostić, M., Glamočlija, J. M., Soković, M. D. (2017). Antimicrobial synergism and cytotoxic properties of *Citrus limon* L., *Piper nigrum* L. and *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel essential oils. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(11).
- Obuchi, T., Kondoh, H., Watanabe, N., Tamai, M., Omura, S., Yang, J. S., Liang, X. T. (1990). Armillaric acid, a new antibiotic produced by *Armillaria mellea*. *Planta Medica*, 56, 198–201.
- Oussalah, M., Caillet, S., Lacroix, M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69(5), 1046–1055.
- Ouzouni, P. K., Petridis, D., Koller, W. D., Riganakos, K. A. (2009). Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chemistry*, 115(4), 1575–1580.
- Pandeya, K. B., Tripathi, I. P., Mishra, M. K., Dwivedi, N., Pardhi, Y., Kamal, A., i dr. (2013). A critical review on traditional herbal drugs: an emerging alternative drug for diabetes. *International Journal of Organic Chemistry*, 3, 1-22.
- Parker, N. P., Walner, D. L. (2011). Trends in the indications for pediatric tonsillectomy or adenotonsillectomy. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 75(2), 282–285.

- Patel, S., Goyal, A. (2012). Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech*, 2(1), 1–15.
- Pawar, V. A., Bhagat, T. B., Toshniwal, M. R., Mokashi, N. D., Khandelwal, K. R. (2013). Formulation and evaluation of dental gel containing essential oil of coriander against oral pathogens. *International research journal of pharmacy*, 4(10), 48–54.
- Perry, M., Whyte, A. (1998). Immunology of the tonsils. *Immunology Today*, 19(9), 414–421.
- Petrović, J., Stojković, D., Reis, F.S., Barros, L., Glamočlija, J., Ćirić, A., Ferreira, I. C. F. R., Soković, M. (2014). Study on chemical, bioactive and food preserving properties of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. *Food & Function*, 5(7), 1441–51.
- Petrović J. (2018). Biološki potencijal i analiza metabolita jestivih i lekovitih gljiva iz rodova *Agrocybe*, *Laetiporus*, *Pleurotus* i *Polyporus*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet
- Pezzani, R., Vitalini, S., Iriti, M. (2017). Bioactivities of *Origanum vulgare* L.: an update. *Phytochemistry Reviews*, 16(6), 1253–1268.
- Phillips, R. (2006). *Mushrooms*, Frith-Macdonald, C.(Ed), Macmillan Publishers Limited
- Plank, L. (2016). Tonsillitis, Chronic. *Head and Neck Pathology*, 497–501. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28618-1_1787
- Rahi, D. K., Malik, D. (2016). Diversity of mushrooms and their metabolites of nutraceutical and therapeutic significance. 2016.
- Raju, G., Selvam, E. M. (2012). Evaluation of microbial flora in chronic tonsillitis and the role of tonsillectomy. *Bangladesh Journal of Otorhinolaryngology*, 18, 109–13.
- Rathore, H., Prasad, S., Sharma, S. (2017). Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *Pharma Nutrition*, 5(2), 35–46.
- Raut, J. S., i Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250–264.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., Saller, R. (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties-an overview, *Forschende Komplement- tarmedizin*, 16(2), 79–90.
- Reis, F. S., Heleno, S. A., Barros, L., Jo, M., Martins, A., Santos-buelga, C. (2011). Toward the antioxidant and chemical characterization of mycorrhizal mushrooms from northeast Portugal. *Journal of Food Science*, 76(6), 824–30.
- Reis, F. S., Martins, A., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R. (2012). Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between *in vivo* and *in vitro* studies. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1201–1207.
- Reis, F. S., Stojković, D., Barros, L., Glamočlija, J., Ćirić, A., Soković, M., Martinis, A., Vasconcelos, H., Morales, H., Ferreira, I. C. F. R. (2014): Can *Suillus granulatus* (L.) Roussel be classified as a functional food? *Food & Function*, 5, 2861–2869.

- Reuter, J., Huyke, C., Casetti, F., Theek, C., Frank, U., Augustin, M., Schempp, C. (2008). Anti-inflammatory potential of a lipolotion containing coriander oil in the ultraviolet erythema test. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 6, 847–851.
- Ribeiro, B., Rangel, J., Valentao, P., Baptista, P., Seabra, R. M., Andrade, P. B. (2006). Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 8530–8537.
- Ribeiro, B., Lopes, R., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Gonçalves, R. F., Baptista, P., Quelhas, I., Valentão, P. (2008a). Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. *Food Chemistry*, 110(1), 47–56.
- Ribeiro, B., Andrade, P.B., Baptista, P., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., Seabra, R. M., Valentão P. (2008b). *Leucopaxillus giganteus* mycelium: effect of nitrogen source on organic acids and alkaloids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 4769–4774.
- Roland, N. J. (2001). *Key topics in otolaryngology and head and neck surgery*. Oxford, England: BIOS Scientific Publishers, 2001
- Ruthes, A. C., Carbonero, E. R., Córdova, M. M., Baggio, C. H., Santos, A. R., Sasaki, G. L., Cipriani, T. R., Gorin, P. A., Iacomini, M. (2013). *Lactarius rufus* (1→3),(1→6)-β-D-glucans: structure, antinociceptive and anti-inflammatory effects. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 129–36.
- Saad, N. Y., Muller, C. D., Lobstein, A. (2013). Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, 28(5), 269–279.
- Sadikoğlu, N., Özhatay, N. (2015). Morphological characteristics of exported taxa as Oregano from Turkey I: *Origanum*. *Journal of Pharmacy of Istanbul University*, 45(2), 87–126.
- Sánchez, C. (2017). Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(1), 13–22.
- Senska, G., Ellermann, S., Ernst, S., Lax, H., Dost, P. (2010). Recurrent tonsillitis in adults quality of life after tonsillectomy. *Deutsches Arzteblatt*, 107(36), 622–628.
- Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G. C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Tundis, R., Sharifi-Rad, M., Loizzo, M. R., Oluwaseun Ademiluyi, A., Sharifi-Rad, R., Ayatollahi, S. A., & Iriti, M. (2017). Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules*, 22(1), 70.
- Sharifi-Rad, M., Varoni, E. M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W. N., Del Mar Contreras, M., Salehi, B., Soltani-Nejad, A., Rajabi, S., Tajbakhsh, M., Sharifi-Rad, J. (2018). Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 32(9), 1675–1687.
- Sharma, S. K., Gautam, N. (2015). Chemical, bioactive, and antioxidant potential of twenty wild culinary mushroom species. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/346508>
- Singh, K., Rani, R., Bansal, P., Medhe, S., Srivastava, M. M. (2015). Antioxidant activity of essential oil of *Coriandrum sativum* and standardization of HPTLC method for the estimation of major phytomarkers. *Journal of Analytical Chemistry*, 70(2), 220–224.

- Śławińska, A., Jabłońska-Ryś, E., Stachniuk, A. (2021). High-performance liquid chromatography determination of free sugars and mannitol in mushrooms using corona charged aerosol detection. *Food Analytical Methods*, 14, 209–216.
- Smith, A. J., Jackson, M. S., Bagg, J. (2001). The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *Journal of Medical Microbiology*, 50(11), 940–946.
- Sokmen, A., Abdel-Baki, A. A. S., Al-Malki, E. S., Al-Quraishy, S., Abdel-Haleem, H. M. (2020). Constituents of essential oil of *Origanum minutiflorum* and its *in vitro* antioxidant, scolicidal and anticancer activities. *Journal of King Saud University - Science*, 32(4), 2377–2382.
- Soković, M. (2001). Antifungalna aktivnost etarskih ulja odabranih aromatičnih i lekovitih biljaka, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu.
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., Griensven, L. J. L. D. v. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. *Molecules*, 15, 7532–7546.
- Soković, M.; Ćirić, A.; Glamočlija, J.; Nikolić, M.; van Griensven, J. L. D. L. (2014). *Agaricus blazei* hot water extract shows anti quorum sensing activity in the nosocomial human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*, 19, 4189–4199.
- Soković, M., Ćirić, A., Glamočlija, J., Stojković, D. (2017). The Bioactive Properties of Mushrooms Antimicrobial Activity of Edible and Medicinal Fungi.
- Stajić, M. (2015). Nutritivna svojstva i medicinski potencijal makromiceta, Stanković, S. (Eds). Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Stajić, M., Vukojević, J., Knezević, A., Lausević, S., Milovanović, I. (2013). Antioxidant protective effects of mushroom metabolites. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13(21), 2660–2676.
- Stefanakis, M. K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H. E., Makridis, P. (2013). Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food Control*, 34(2), 539–546.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. Di, Djukić, S., Ćircović, I., Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), 891–899.
- Stešević, D., Jaćimović, Ž., Šatović, Z., Šapčanin, A., Jančan, G., Kosović, M., Damjanović-Vratnica, B. (2018). Chemical characterization of wild growing *Origanum vulgare* Populations in Montenegro. *Natural Products Communication*, 13, 1934578X1801301031.
- Stojković, D., Reis, F.S., Barros, L., Glamočlija, J., Ćirić, A., van Griensven, L., Soković, M., Ferreira, I. C. F. R. (2013): Nutrients and non-nutrients composition and bioactivity of wild and cultivated *Coprinus comatus* (O.F.Müll.) Pers. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 289–296.
- Stojković, D., Reis, F. S., Glamočlija, J., Ćirić, A., Barros, L., van Griensven, L. J. L.D., Soković, M., Ferreira, I. C. F. R. (2014). Cultivated strains of *Agaricus bisporus* and *A. brasiliensis*: Chemical characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial properties for final healthy product–Natural preservatives in yoghurt. *Food & Function*, 5, 1602–1612.

- Stojković, D., Živković, J., Stanisavljević, D., Smiljković, M., Popović, J., Stevanović, M., Glamočlija, J., Soković, M. Cytotoxicity through Molecular Targets Involved in Apoptosis. Where Should We Further Search for Mushrooms Functionalities in Future Cancer Treatment? In: *Frontiers in Natural Product Chemistry*; Atta-ur-Rahman, Ed.; Bentham Science Publishers Pte. Ltd.: Singapore, 2019; Volume 5, pp. 146–191.
- Stoodley, P., Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J. D., Lappin-Scott, H. M., Costerton, J. W. (2001). Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5608–5613.
- Suresh, M.K.; Biswas, R.; Biswas, L. (2019). An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *International Journal of Medicinal Microbiology*, 309(1), 1–12.
- Swamy, M. K., Akhtar, M. S., Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3012462>
- Swidsinski, A., Göktas, Ö., Bessler, C., Loening-Baucke, V., Hale, L. P., Andree, H., Weizenegger, M., Hölzl, M., Scherer, H., Lochs, H. (2007). Spatial organisation of microbiota in quiescent adenoiditis and tonsillitis. *Journal of Clinical Pathology*, 60(3), 253–260.
- Šumilo, D., Nichols, L., Ryan, R., Marshall, T. (2019). Incidence of indications for tonsillectomy and frequency of evidence-based surgery: A 12-year retrospective cohort study of primary care electronic records. *British Journal of General Practice*, 69(678), E33–E41.
- Takebayashi, J., Iwahashi, N., Ishimi, Y., Tai, A. (2012). Development of a simple 96-well plate method for evaluation of antioxidant activity based on the oxidative haemolysis inhibition assay (OxHLIA). *Food Chemistry*, 134(1), 606–610.
- Talpur, N., Echard, B., Ingram, C., Bagchi, D., Preuss, H. (2005). Effects of a novel formulation of essential oils on glucose-insulin metabolism in diabetic and hypertensive rats: a pilot study. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 7(2), 193–9.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N.R., Nogueira, J. M. F., Saraiva, J. A., Nunes, M. L. (2013). Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2707–2714.
- Thompson, A., Meah, D., Ahmed, N., Conniff-Jenkins, R., Chileshe, E., Phillips, C. O., Claypole, T. C., Forman, D. W., Row, P. E. (2013). Comparison of the antibacterial activity of essential oils and extracts of medicinal and culinary herbs to investigate potential new treatments for irritable bowel syndrome. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 338.
- Toker, R., Gölükcü, M., Tokgöz, H. (2017). Effects of distillation times on essential oil compositions of *Origanum minutiflorum* O. Schwarz Et. and P.H. Davis. *Journal of Essential Oil Research*, 29(4), 330–335.
- Torretta, S., Drago, L., Marchisio, P., Cappadona, M., Rinaldi, V., Nazzari, E., Pignataro, L. (2013). Recurrences in chronic tonsillitis substained by tonsillar biofilm-producing bacteria in children. Relationship with the grade of tonsillar hyperplasy. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 77(2), 200–204.

- Tripathy, S. S., Rajoriya, A., Mahapatra, A., Gupta, N. (2016). Biochemical and antioxidant properties of wild edible mushrooms used for food by tribal of eastern India. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(4), 194–199.
- Turina, A. D. V., Nolan, M. V., Zygadlo, J. A., Perillo, M. A. (2006). Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry*, 122, 2, 101–113.
- Tzelnick, S., Hilly, O., Vinker, S., Bachar, G., Mizrachi, A. (2020). Long-term outcomes of tonsillectomy for recurrent tonsillitis in adults. *Laryngoscope*, 130(2), 328–331.
- Ugulu, I., Baslar, S., Yorek, N., Dogan, Y. (2009). The investigation and quantitative ethnobotanical evaluation of medicinal plants used around Izmir province, Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(5), 345–367.
- Ultee A., i Smid, E. J. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxinproductionby *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 3, 373–378.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4, 1561–1568.
- Urquhart, D. S., Montague, M. L. (2012). When to remove tonsils and the alternatives. *Paediatrics and Child Health*, 22(1), 37–41.
- Valentão, P., Lopes, G., Valente, M., Barbosa, P., Andrade, P. B., Silva, B. M., Baptista, P., Seabra, R. M. (2007). Quantification of nine organic acids in wild mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53, 3626–3630.
- Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T., Paredes-López, O. (2015). Edible mushrooms: Improving human health and promoting quality life. *International Journal of Microbiology*, <https://doi.org/10.1155/2015/376387>
- Vanyolos, A., Kovacs, B., Bozsity, N., Zupko, I., Hohmann, J. (2015). Antiproliferative activity of some higher mushrooms from hungary against human cancer cell lines. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17(12), 1145–9.
- Vaz, A. J., Heleno, S. A., Martins, A., Almeida, M. G., Vasconcelos, M. H., Ferreira, I. C. F. R. (2010). Wild mushrooms *Clitocybe alexandri* and *Lepista inversa*: *In vitro* tumor cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2881–2884.
- Vaz, J. A., Barros, L., Martins, A., Santos-Buelga, C., Vasconcelos, M. H., Ferreira, I. C. F. R. (2011). Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. *Food Chemistry*, 126(2), 610–616. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.063>
- Vieira, V., Barros, L., Martins, A., Ferreira, I. C. F. R. (2014). Expanding current knowledge on the chemical composition and antioxidant activity of the genus *Lactarius*. *Molecules*, 19(12), 20650–20663.
- Vukojević, J., Hadžić, I. (2013): Atlas gljiva i internacionalni rečnik narodnih imena gljiva. Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet.
- Waldeyer W. (1884). Ueber den lymphatischen Apparat des Pharynx. *Dtsch Med Wochenschr* 10, 313.

- 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, Z. B., Pei, J. J., Ma, H. L., Cai, P. F., Yan, J. K. (2014). Effect of extraction media on preliminary characterizations and antioxidant activities of *Phellinus linteus* polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 109, 49–55.
- Wasser, S. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), 258–274.
- Wasser, S.P. (2010) Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved unsolved problems. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 12, 1–16.
- Wasser, S. P. (2011). Current findings , future trends , and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 1323–1332.
- Wasser, S. P. (2014). Medicinal Mushroom Science: Current Perspectives, Advances, Evidences, and Challenges. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.138318>
- Wen Gao, L., Yi Li, W., Lu Zhao, Y., Wen Wang, J. (2009). The cultivation, bioactive components and pharmacological effects of *Armillaria mellea*. *African Journal of Biotechnology*, 8(25), 7383–7390.
- Wetmore, R. F. (2017). Surgical management of the tonsillectomy and adenoidectomy patient. *World Journal of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery*, 3(3), 176–182.
- WHO (2014). Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance, 2014. Available at: www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/ (accessed 21 June 2016).
- WHO (2018). Cancer. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Wilson, M. (2010). The respiratory system and its indigenous microbiota. U: *Microbial Inhabitants of Humans*. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511735080.005>
- Wu, T. T., Tsai, C. W., Yao, H. T., Lii, C. K., Chen, H. W., Wu, Y. L., i dr. (2010). Suppressive effects of extracts from the aerial part of *Coriandrum sativum* L. on LPS- induced inflammatory responses in murine RAW 264.7 macrophages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 1846–1854.
- Wu, Y., Wang, H., Ng, T. B. (2011). Purification and characterization of a lectin with antiproliferative activity toward cancer cells from the dried fruit bodies of *Lactarius flavidulus*. *Carbohydrate Research*, 346, 2576–2581.
- Xu, Z., Fu, L., Feng, S., Yuan, M., Huang, Y., Liao, J., Zhou, L., Yang, H., Ding, C. (2019). Chemical composition, antioxidant and antihyperglycemic activities of the wild *Lactarius deliciosus* from China. *Molecules*, 24, 1357.
- Yaltirak, T., Aslim, B., Ozturk, S., Alli, H. (2009). Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 2052–2056.
- Yilmaz, N., Solmaz, M., Turkecul, I., Elmastas, M. (2006). Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. *Food Chemistry*, 99, 168–174.

- Zardini, H. Z., Tolueinia, B., Momeni, Z., Hasani, Z., Hasani, M., Branch, Y. (2012). Analysis of Antibacterial and Antifungal. *Gomal Journal of Medical Sciences*, 10(2), 167–171.
- Zautner, A. E., Krause, M., Stropahl, G., Holtfreter, S., Frickmann, H., Maletzki, C., Kreikemeyer, B., Pau, H. W., Podbielski, A. (2010). Intracellular persisting *Staphylococcus aureus* is the major pathogen in recurrent tonsillitis. *PLoS ONE*, 5(3), e9452.
- Zhang, G., Sun, J., Wang, H., Ng, T. B. (2010). First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a *Russula* mushroom. *Phytomedicine*, 17(10), 775–781.
- Zhao, Y.-Y., Shen, X., Chao, X.; Ho, C. C.; Cheng, X. L.; Zhang, Y., Lin, R.-C., Du, K.-J.; Luo, W.-J., Chen, J.-Y., Sun, W. J. (2011). Ergosta-4, 6, 8 (14), 22-tetraen-3-one induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1810(4), 384–390.
- Zhao, X., Yu, C., Zhao, Y., Liu S., Wang, H., Wang, C., Guo L., Chen, M. (2019). Changes in mannitol content, regulation of genes involved in mannitol metabolism, and the protective effect of mannitol on *Volvariella volvacea* at low temperature. *BioMed Research International*, 1493721.
- Zheljzskova, V. D., Pickett, K. M., Caldwell, C. D., Pincock, J. A., Roberts, J. C., Mapplebeck, L. (2008). Cultivar and sowing date effects on seed yield and oil composition of coriander in Atlantic Canada. *Industrial Crops and Products*, 28, 88–94.
- Zoubiri, S., Baaliouamer, A. (2010). Essential oil composition of *Coriandrum sativum* seed cultivated in Algeria as food grains protectant. *Food Chemistry*, 122, 1226–1228.

8. PRILOG

Prilog 1. Odluka Etičkog odbora

»Zvezdara« - University Medical Center
Office for Human Research Protections I
Zvezdara University Medical Center IRB 1 - Medical, No IRB00009457, IORG0007877
Approved by Federalwide Assurance - FWA00006109

Etički odbor je konstituisan i funkcioniše u skladu sa načelima ICH-GCP i lokalnom zakonskom regulativom.

Dimitrija Tucovića 161, 11000 Belgrade, Serbia
Tel: +381 11 30 88 672, fax: +381 11 30 88 673, e-mail: etikain@mts.rs

Members of the Ethics Board:

Doc. dr Marijana Nedeljković Protić, Gastroenterologist, Chairman LEC
Prof. dr Nataša Marković-Nikolić, Cardiologist, member
Prof. dr Teodora Beljić-Živković, Endocrinologist, member
Doc. dr Bojan Kovacevic, Surgery, member
Ass. dr Radoslav Aščerić, Surgery, member
Zorica Vukičević, Lawyer, external member
Slavko Babić, Lawyer, external member
Suzana Nedelkov, Bachelor economist, Secretary LEC

ODLUKA ETIČKOG ODBORA

PREDMET: Sprovođenje istraživanja u cilju izrade doktorske disertacije dr Marine Kostić

U sredu, 25. januara 2017.g održana je sednica Etičkog odbora kojoj su prisustvovali: Doc. dr Marijana Nedeljković Protić, predsednik Etičkog odbora; Prof. dr Teodora Beljić-Živković, član; Prof. Dr Nataša Marković-Nikolić, član; Ass. dr Radoslav Aščerić, član; Zorica Vukičević, dipl prav, član i Slavko Babić, dipl.prav, član.

Sednici iz opravdanih razloga nije prisustvovao Doc. Dr Bojan Kovačević, član.

Zapisničar: dipl.ecc, Suzana Nedelkov, Sekretar Etičkog odbora.

Marina Kostić, student doktorskih studija Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, obratila se Etičkom odboru sa molbom da se na Klinici za otorinolaringologiju KBC "Zvezdara" odobri sprovođenje istraživanja koje podrazumeva sakupljanje briseva sluzokože nosa i usne duplje kao i sadržaj iz sinusa pacijenata i po dogovoru postoperativno tonzile, a u cilju izrade doktorske disertacije na temu "Karakterizacija i primena metabolita gljiva i utvrđivanje potencijala novih biofungicida". Analize prikupljenih uzoraka vršiće se u mikološkoj laboratoriji Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u okviru projekta OI 173032.

Na uvid je dostavljena Saglasnost Načelnika Klinike za ORL i formular saglasnosti, odnosno informisani pristanak pacijenata-učesnika.

Lokalni Etički odbor koji je konstituisan i radi po načelima i principima ICH-GCP, predmetno kliničko istraživanje ocenio je etički podobnim i odobrio sprovođenje istog.

Datum: 25.01.2017.g



Predsednik Etičkog odbora
Doc. dr Marijana Nedeljković Protić

Prof. Univ. dr. Nataša Marković-Nikolić
spec. interne medicine-kardiolog
107034

Prilog 2. Upitnik za ispitanike

Datum: _____

Ime i Prezime: _____ Godina rođenja: _____

A.		Bez simptoma	Veoma slabo izražene tegobe	Slab izražene tegobe	Umereni Jake tegobe	Izražene tegobne	Teško podnošljive tegobe
1.	Bol u grlu	0	1	2	3	4	5
2.	Otežano gutanje	0	1	2	3	4	5
3.	Prisustvo gustog sekreta u grlu	0	1	2	3	4	5
4.	Prisustvo gustog sekreta u nosu	0	1	2	3	4	5
5.	Otežano disanje na nos	0	1	2	3	4	5
6.	Hrkanje	0	1	2	3	4	5
7.	Kašalj	0	1	2	3	4	5
8.	Neprijatan zadah (<i>foetor ex ore</i>)	0	1	2	3	4	5
Ukupan skor							

B.

- Koliko puta godišnje se javlja upala tonsila? _____
- Da li su korišćeni antibiotici u lečenju tonsilitisa? **DA NE**
(ako jesu navesti koji u poslednjih 6 meseci.....)
- Pacijent je alergičan na _____
- Da li pored upale tonsila pacijent boluje od još neke bolesti? _____

C.

Orofaringoskopski status

- Tonzile: a) hiperemične ,hipertrofične, kriptične sa detritusom u kriptama **DA NE**
 b) asimetrične, neravne sa hiperemijom nepčanih lukova **DA NE**
 . Stanje adenoidne vegetacije: a) uvećana **DA NE**
 b) sekret u nosu **DA NE**

Otoskopski nalaz

- Bubne opne: a) lividne **DA NE**
 b) zamućene **DA NE**
 c) hiperemične **DA NE**

BIOGRAFIJA

Marina Z. Kostić je rođena 09.06.1989. godine u Beogradu. Osnovnu i srednju školu je završila u Kruševcu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2008. godine, smer Biologija, diplomirala je 2013. godine a masterirala 2014. godine. Doktorske studije je upisala 2015. godine na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, modul Biologija, smer Eksperimentalna mikologija. Od 04.02.2019. zaposlena je kao istraživač saradnik u Mikološkoj laboratoriji, Odeljenja za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, a od 16.09.2019. je nastavila angažovanje kao istraživač saradnik. Dosadašnji naučno-istraživački rad Marine Z. Kostić je iz oblasti eksperimentalne mikologije, mikrobiologije i botanike. Kao prvi autor/koautor objavila je 23 naučna rada u časopisima od međunarodnog i nacionalnog značaja (4 u kategoriji M21a, 11 u kategoriji M21, 6 u kategoriji M22, 1 u kategoriji M23, 1 u kategoriji M51). Učestvovala je i sa saopštenjima na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima (15 u kategoriji M34 i 7 u kategoriji M64). Takođe, Marina Kostić je i koautor 3 poglavlja (1 u kategoriji M12/14 i 2 u kategoriji M11/13). Član je Mikološkog društva Srbije i Srpskog društva za mikrobiologiju.