

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET**



Nebojša Stilinović

**FARMAKOLOŠKE, TOKSIKOLOŠKE I BIOHEMIJSKE
OSOBINE PREPARATA GLJIVE *COPRINUS COMATUS***

Doktorska disertacija

Mentor:

Prof. dr Aleksandar Rašković

Novi Sad, 2013

UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET

Ključna dokumentacijska informacija

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska publikacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR

Autor: Nebojša Stilinović
AU

Mentori: Prof. dr Aleksandar Rašković
MN

Naslov rada: Farmakološke, toksikološke i biohemijske
NR osobine preparata gljive *Coprinus comatus*

Jezik publikacije: Srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda: Srpski/engleski
JI

Zemlja publikovanja: Republika Srbija
ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina
UGP

Godina: 2013.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: 21000 Novi Sad, Srbija, Hajduk Veljkova 3
MA

Fizički opis rada: Broj poglavlja 8, strana 120, tabela 63, grafikona 2,
FO slika 29, literaturnih navoda 134

Naučna oblast: Medicina
NO

Naučna disciplina: Farmakologija
ND

Predmetna odrednica/ključne reči: Coprinus; Eksperimentalni dijabetes melitus; Test oralnog
PO podnošenja glukoze; Hipoglikemijski agensi; Oksidativni stres

UDK 615.322.07:612.08
615.245.07

Čuva se: U biblioteci Medicinskog fakulteta u Novom Sadu
ČU 21000 Novi Sad, Srbija, Hajduk Veljkova 3

Važna napomena:
VN

Izvod:
IZ

Pomoćna lekovita sredstva, gde bi spadale i gljive, mogu značajno da umanje rizik od nastanka dijabetesa, da ga odlože ili da umanje njegove posledice. Pregledom savremene literature se uočava potencijal gljive *Coprinus comatus* da pomogne u regulisanju nivoa glukoze u krvi. S obzirom da su u Srbiji dostupni komercijalni preparati, postojala je potreba za detaljnim ispitivanjem farmakoloških i toksikoloških osobina gljive *Coprinus comatus*.

Cilj ovog istraživanja je bio da se utvrdi: 1) uticaj preparata gljive *Coprinus comatus* na glikemiju, histološke karakteristike endokrinog pankreasa i parametre toksičnosti kod ispitivanih životinja; 2) protektivno delovanje preparata gljive *Coprinus comatus* kod životinja izloženih oksidativnom stresu.

Vodena suspenzija gljive *Coprinus comatus* se primenjivala eksperimentalnim životinjama u tri različite doze (0,835 g/kg; 1,67 g/kg i 3,34 g/kg) i tokom tri vremenska intervala svakodnevno (7, 21 i 42 dana). Za ispitivanje uticaja gljive *Coprinus comatus* na glikemiju životinja korišćeni su adrenalinski test, test oralnog podnošenja glukoze i indukcija trajne hiperglikemije aloksanom. Od biohemijskih parametara u serumu je određivana koncentracija lipida, uree i kreatinina i enzimska aktivnost aspartat i alanin aminotransferaze. Antioksidantna aktivnost gljive *Coprinus comatus* je određivana i *in vitro* i *in vivo* testovima. Nakon žrtvovanja životinja, tkivo jetre i bubrega bojeno je standardnom hematoksilin i eozin metodom, a pankreasno tkivo imunohistohemijskom metodom.

Poredeći promenu telesne mase, vidi se da je ona najmanja u grupi životinja koja je dobijala gljivu u najvećoj dozi. Prateći hipoglikemijski efekat gljive, kod 42-dnevnog tretmana je uočena dozna zavisnost. Ako se uzme u obzir histološki izgled Langerhansovih ostrvaca dobija se potvrda rezultata određivanja koncentracije glukoze u krvi životinja sa aloksanskim dijabetesom. Sedmodnevni tretman gljivom *C.comatus* u dozi od 3,34 g/kg je doveo do značajnog sniženja koncentracije ukupnog holesterola kod životinja sa aloksanskim dijabetesom. Takođe, analizom HDL frakcije holesterola je uočen pozitivan efekat tretmana gljivom *C.comatus*. Iako je u većini eksperimentalnih grupa tretman gljivom uspeo da spreči porast serumske koncentracije aminotransferaza uzrokovan primenom ugljentetrahlorida, do statistički značajne promene je došlo samo u koncentraciji alanin aminotransferaze grupa 7-dnevnog tretmana. Iako se u literaturi navodi da se kod dijabetičnih životinja, nakon nekoliko nedelja od indukcije dijabetesa, patohistološkim pregledom mogu uočiti promene u glomerulima i mezengijalnom matriksu bubrega, takve nisu uočene niti kod jedne životinje u ovom ogledu. Biohemijski parametri su pokazali da je ipak došlo do oštećenja bubrega kod životinja sa aloksanskim dijabetesom i da je tretman gljivom u određenoj meri uspeo da ublaži ovaj poremećaj. Potvrda visokog antioksidativnog kapaciteta, prvobitno utvrđena DPPH i FRAP testom i određivanjem sadržaja ukupnih fenola, je dobijena i *in vivo* testovima.

Na osnovu rezultata istraživanja može se zaključiti da primena preparata gljive *Coprinus comatus*: smanjuje prirast telesne mase, ublažava poremećaj homeostaze glukoze, štiti od reaktivnih kiseoničnih vrsta, ubrzava obnovu β ćelija, utiče povoljno na lipidni status i ne izaziva toksične promene u krvi, na jetri i bubrezima ispitivanih životinja.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: 13.07.2012.

DP

Datum odbrane: _____

DO

Članovi komisije:

KO

Predsednik:

Prof. dr Ana Sabo, Medicinski fakultet Novi Sad

Član:

Prof. dr Momir Mikov, Medicinski fakultet Novi Sad

Član:

Prof. dr Mira Popović, Prirodno-matematički fakultet
Novi Sad

Član:

Prof. dr Dušan Lalošević, Medicinski fakultet Novi Sad

Član:

Prof. dr Dragan Milovanović, Medicinski fakultet
Kragujevac

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
MEDICAL FACULTY OF NOVI SAD**

Key word documentation

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

DT

Monograph documentation

Type of record:

TR

Textual printed material

Contents code:

CC

PhD thesis

Author:

AU

Nebojsa Stilinovic

Mentors:

MN

Associate Professor Aleksandar Raskovic, MD, PhD

Title:

TI

Pharmacological, toxicological and biochemical properties of *Coprinus comatus* mushroom preparation

Language of text:

LT

Serbian

Language of abstract:

LA

Serbian/English

Country of publication:

CP

Republic of Serbia

Locality of publication: Vojvodina
LP

Publication year: 2013.
PY

Publisher: Author reprint
PU

Publication place: 21000 Novi Sad, Srbija, Hajduk Veljkova 3
PP

Physical description: Number of chapters 8, pages 120, tables 63, charts 2,
PD pictures 29, references 134

Scientific field: Medicine
SF

Scientific discipline: Pharmacology
SD

Subject/key words: Coprinus; Diabetes Mellitus, Experimental; Glucose
SKW Tolerance Test; Hypoglycemic Agents; Oxidative Stress

UDC 615.322.07:612.08
615.245.07

Holding data: Library of Medical faculty of Novi Sad,
HD 21000 Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3

Note:
N

Abstract:
AB

Natural health products, including mushrooms, can significantly reduce risk of developing diabetes, to postpone it or to reduce its consequences. A contemporary literature indicates to great potential of *Coprinus comatus* mushroom to help in regulation of blood glucose level. Considering that commercial products are available in Serbia, there was a need for more detailed pharmacological and toxicological investigation of *Coprinus comatus* mushroom.

The aim of research was to determine: 1) influence of *Coprinus comatus* mushroom on glycaemia, endocrine pancreas histological features and toxicological parameters of experimental

animals; 2) protective action of *Coprinus comatus* mushroom with animals exposed to oxidative stress.

Coprinus comatus mushroom water suspension was administered to experimental animals in three different doses (0,835 g/kg; 1,67 g/kg and 3,34 g/kg) and during three time intervals every day (7, 21 and 42 days). Adrenalin test, oral glucose tolerance test and hyperglycaemia induction with alloxan were used to determine *Coprinus comatus* influence on glycaemia in animals. Also, serum lipid, urea, creatinine concentration and enzymatic activity of aspartate and alanine aminotransferase were determined. The antioxidant activity of *Coprinus comatus* mushroom was determined by using both *in vitro* and *in vivo* tests. After animals' sacrificing, liver and kidney tissues were dyed using standard hematoxylin eosin method, while pancreas tissue using immunohistochemical method.

Comparing body weight gain, it can be seen that the smallest change was in group of animals treated with the highest mushroom dose. Dose dependent hypoglycaemic effect was noticed in a 42-days mushroom treatment. Considering histological appearance of Langerhans islets confirmation of blood glucose concentration in alloxan diabetic animals was obtained. Seven days' treatment of *C.comatus* mushroom in dose of 3,34 g/kg led to a significant total cholesterol decrease in alloxan diabetic animals. Also, by HDL cholesterol fraction analysis positive effect of *C.comatus* mushroom treatment was noticed. Mushroom treatment succeeded in preventing serum aminotransferases increase in majority of experimental groups. Only by measuring concentration of alanine aminotransferase in seven days' treatment group of animals, statistically significant change was obtained. Though it was stated in the literature that pathohistological examination can show changes in glomeruls and mesangial matrix in kidneys of diabetic animals, those changes were not found in animals in this experiment. Biochemical parameters showed that, after all, there were still kidney damage in alloxan diabetic animals and that mushroom treatment alleviated this disorder in a certain degree. The confirmation of high antioxidant capacity, primarily determined by DPPH and FRAP tests and total phenolic content measurement, was reached using *in vivo* tests, as well.

Based on research results it can be concluded that administration of *Coprinus comatus* mushroom preparation: lowers body weight gain, alleviates glucose homeostasis disorder, protects from reactive oxygen species, accelerates β cells regeneration, affects positively on lipid profile and does not cause toxic changes in blood, liver and kidneys of experimental animals.

Accepted on Scientific Board on: 13.07.2012.

AS

Defended: _____

DE

Thesis Defend Board:

DB

President: Professor Ana Sabo MD, PhD, Medical faculty of Novi Sad

Member: Professor Momir Mikov, MD, PhD, Medical faculty of Novi Sad

Member: Professor Mira Popovic, MD, PhD, Faculty of Sciences Novi Sad

Member: Professor Dusan Lalošević, MD, PhD, Medical faculty of Novi Sad

Member: Professor Dragan Milovanovic, MD, PhD, Medical faculty of Kragujevac

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Carstvo gljiva	1
1.2. Gljive kao funkcionalna hrana	2
1.3. Medicinske gljive	3
1.4. <i>Coprinus comatus</i>	4
1.5. Dijabetes melitus – epidemija 21. veka	7
1.6. Oksidativni stres	14
1.7. Značaj ispitivanja	16
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	18
3. RADNE HIPOTEZE	19
4. MATERIJAL I METODE	20
4.1. Eksperimentalne životinje	20
4.2. Komercijalni preparat gljive	20
4.3. Tretman i podela eksperimentalnih grupa	20
4.4. Farmakodinamska ispitivanja	22
4.5. Biohemijska i toksikološka ispitivanja	24
4.6. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti	26
4.7. Morfološka ispitivanja	29
4.8. Statistička obrada rezultata	30
5. REZULTATI	31
5.1. FARMAKODINAMSKA ISPITIVANJA	31
5.1.1. Vrednosti telesne mase	31
5.1.2. Aloksanski dijabetes	36
5.1.3. Test oralnog podnošenja glukoze	39
5.1.4. Adrenalinski test	41
5.2. BIOHEMIJSKA I TOKSIKOLOŠKA ISPITIVANJA	43
5.2.1. Lipidni status	43
5.2.2. Parametri jetrene funkcije	49
5.2.3. Parametri bubrežne funkcije	53

5.3. ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI	57
5.3.1. <i>In vitro</i> antioksidativna aktivnost	57
5.3.2. <i>In vivo</i> antioksidativna aktivnost	59
5.4. MORFOLOŠKA ISPITIVANJA	73
5.4.1. Životinje tretirane fiziološkim rastvorom	73
5.4.2. Životinje tretirane aloksanom	74
5.4.3. Životinje tretirane ugljen-tetrahloridom	76
5.4.4. Životinje tretirane gljivom <i>Coprinus comatus</i>	78
5.4.5. Životinje tretirane aloksanom i gljivom <i>Coprinus comatus</i>	80
5.4.6. Životinje tretirane gljivom <i>Coprinus comatus</i> i ugljen-tetrahloridom	81
6. DISKUSIJA	84
6.1. Uticaj na telesnu masu	84
6.2. Uticaj na koncentraciju šećera u krvi	85
6.3. Uticaj na koncentraciju lipida u krvi	89
6.4. Uticaj na funkciju jetre i bubrega	94
6.5. Uticaj na parametre oksidativnog stresa	98
7. ZAKLJUČCI	109
8. LITERATURA	110

1. UVOD

1.1. Carstvo gljiva

Dugo se smatralo da gljive pripadaju carstvu biljaka i tek krajem šezdesetih godina prošlog veka one su postale zasebno carstvo, zahvaljujući Whittaker-ovoj klasifikaciji živog sveta. Do tada gljive su označavane nazivima koji ukazuju na to da pripadaju biljkama, npr. *Dermatophyte* (u prevodu sa grčkog, „kožne biljke“). Postoje izvesne sličnosti sa biljnim organizmima, ali i značajne razlike. Takođe, gljive imaju dosta sličnosti i sa životinjskim organizmima, ali isto tako i razlika. Osnovni razlozi zašto su gljive kao eukariotski organizmi svrstani u zasebno carstvo, odnosno što su izdvojene iz carstva biljaka, jesu sledeći:

- za razliku od životinja imaju ćelijski zid, a za razliku od biljaka taj ćelijski zid uglavnom ne sačinjava celuloza, nego hitin, koji je deo egzoskeleta nekih beskičmenjaka;
- glukozu skladište u obliku glikogena, kao i životinje, a ne u obliku skroba kao biljke;
- hrane se gotovom organskom materijom, odnosno gljive su heterotrofni organizmi, jer nemaju pigment za fotosintezu koji poseduju biljke, hlorofil (Whittaker R. H., 1969; Cavalier-Smith T., 1998).

Gljive su organizmi koji su veoma rašireni na Zemlji i opstaju čak i u ekstremnim okruženjima, kao što su pustinje ili oblasti sa visokim nivoom jonizujućeg zračenja (Vaupotic T., 2008; Dadachova E., 2007). Skorašnje procene kažu da broj gljiva koje se nalaze na planeti Zemlji varira od 500 hiljada do 10 miliona, ali generalno je usvojeno da ima približno 1,5 miliona vrsta. Međutim, ukupan broj opisanih vrsta gljiva je trenutno samo 100 hiljada. Od ovog broja, makrogljive – pečurke, broje 14 hiljada vrsta. Ako imamo u vidu da se broj makrogljiva (dalje gljive) koje žive na planeti Zemlji, procenjuje na 150 hiljada, onda je jasno da je samo 10% poznato nauci (Hawksworth D. L., 2001; Cavalier-Smith T., 1998; Wasser S. P., 2011).

Gljive imaju visoku nutritivnu vrednost, jer sadrže sve aminokiseline potrebne čoveku, bogate su ugljenim hidratima, mastima, mineralima i vitaminima. Sposobne su da proizvode

biološki aktivne materije – enzime, antibiotike, vitamine, alkaloide, više masne kiseline i druge. Ako imamo u vidu i njihovu dokazanu lekovitost, jasno je zašto je istraživanje gljiva još uvek interesantno naučnicima širom sveta. Zbog toga postoji veliki broj studija koje imaju za cilj da ispituju efikasnost, bezbednost i farmakološke osobine gljiva (Wasser S. P., 2011).

1.2. Gljive kao funkcionalna hrana

Poslednjih godina sve se više teži objašnjenju veze između ljudskog zdravlja i ishrane. U tom smislu, današnji potrošač želi da hrana, pored svojih uobičajenih nutritivnih funkcija, ima i povoljan uticaj na ljudsko zdravlje, odnosno da ima još jednu funkciju. Od hrane se očekuje ne samo da je jeftina, bezbedna, visoke nutritivne vrednosti, već i da pomaže u prevenciji bolesti i očuvanju zdravlja. Još je Hipokrat u IV-V veku pre n.e. rekao: „Neka vam hrana bude lek, a lek vaša hrana.“

Za hranu koja ima i neku drugu funkciju (npr. terapijsku) sve je popularniji termin funkcionalna hrana. Ne postoji jasna definicija funkcionalne hrane. Prema organizaciji Agriculture and Agri-Food Canada, funkcionalna hrana je hrana koja poseduje dodatnu funkciju, odnosno sadrži biološki aktivna jedinjenja, koja mogu pomoći u očuvanju zdravlja i prevenciji bolesti. Treba napomenuti da je mala razlika između funkcionalne hrane i dijetetskih suplemenata, ali da ona ipak postoji. Smatra se da su pozitivni efekti biološki aktivnih jedinjenja iz funkcionalne hrane naučno dokazani, što nije slučaj sa dijetetskim suplementima. Danas su sve veći zahtevi za pronalaženjem funkcionalne hrane, a gljive postaju sve interesantnije, jer poseduju veliki broj biološki aktivnih jedinjenja (Vaz J. A., 2011; Coppens P., 2006).

Velika popularnost gljiva kao izvora dijetetskih suplemenata ili funkcionalne hrane ima i svoju drugu stranu. Značajna pitanja koja se javljaju u vezi sa komercijalizacijom preparata gljiva su: bezbednost, standardizacija, efikasnost, mehanizam delovanja i mnoga druga, tako da se može očekivati velika razlika u sastavu, efikasnosti i bezbednosti različitih komercijalnih preparata gljiva, jer ne postoji standardizacija. Za većinu medicinskih gljiva se još uvek ne zna da li njeni farmakološki efekti zavise od samo jedne bioaktivne supstance ili oni zavise od sinergističkog uticaja više njih (Wasser S. P., 2011).

Ono što znamo je to da ljudi već hiljadama godina unazad koriste gljive kao značajan izvor hrane, ali i za lečenje raznih bolesti. One su neizostavni deo tradicionalnih, drevnih terapija nekih bolesti, tako da možemo govoriti o medicinskim gljivama. Savremena istraživanja imaju za cilj da izuče, odnosno dokumentuju, tradicionalna verovanja o lekovitim svojstvima medicinskih gljiva. Sve više se primenjuje interdisciplinarni pristup u izučavanju potencijala medicinskih gljiva za lečenje bolesti modernog doba. Savremena klinička praksa u Japanu, Kini, Koreji, Rusiji i još nekoliko drugih zemalja se oslanja na preparate koji potiču od medicinskih gljiva (Wasser S. P., 2011).

1.3. Medicinske gljive

Kao što smo ranije rekli, gljive su interesantne prvenstveno zbog svoje velike nutritivne vrednosti, ali danas se sve više istražuju zbog svojih farmakoloških svojstava. Ako imamo u vidu da su neki od najznačajnijih lekova izolovani upravo iz gljiva, onda je jasno zašto se one toliko izučavaju. Najveća grupa antibiotičkih lekova, beta laktami, nastala je zahvaljujući otkriću bioaktivnih metabolita gljiva, penicilina i cefalosporina. Penicilin je izolovan iz gljive *Penicillium chrysogenum*, a cefalosporin iz gljive *Cephalosporium acremonium*, a od njih je kasnije hemijskom modifikacijom nastao čitav niz antibiotika koji predstavljaju grupu beta laktama (Brakhage A. A., 2004; Hoffmeister D., 2007). Takođe veoma značajan sekundarni metabolit gljiva je i ciklosporin. On je jedan od imunosupresiva, koji je značajno poboljšao ishod transplantacija organa, odnosno sprečio odbacivanje alografta. Ciklosporin je izolovan iz gljive *Tolypocladium inflatum* (Hoffmeister D., 2007). Sledeća značajna grupa lekova koja je nastala modifikacijom supstanci izolovanih iz gljiva je grupa ergot alkaloida. Ergot alkaloidi su hemijska jedinjenja izolovana iz gljiva roda *Claviceps* i menjanjem njihove hemijske strukture su nastali lekovi koji se danas koriste u terapiji migrene i postporođajnog krvarenja (Hoffmeister D., 2007; Silberstein S. D., 2003). Danas jedna od najčešće propisivanih i najprodavanijih grupa lekova na globalnom nivou su statini. Statini su lekovi koji dovode do sniženja serumskog holesterola i na taj način sprečavaju aterosklerotske komplikacije (Sabo A., 2011). Za razvoj ove grupe lekova ključan je pronalazak japanskog mikrobiologa Akira Enda, koji je sedamdesetih godina prošlog veka izolovao iz gljive *Penicillium citrinum* prvi HMG-CoA reduktaza inhibitor (statin), mevastatin

(Endo A., 1992). Dakle, može se reći da gljive predstavljaju neograničen izvor novih molekula koji mogu biti kandidati za nove lekove.

1.4. *Coprinus comatus*

- Taksonomija

Gljiva *Coprinus comatus* (O. F. Müll.) Pers. pripada razdelu *Basidiomycota*. Na srpskom govornom području ima raznih naziva, ali najrasprostranjeniji je – gnojištarka. Ovom razdelu pripada većina makrogljiva poznatih kao pečurke. One uglavnom žive kao saprofitski organizmi na humusu, zemljištu bogatom biljnim otpacima, međutim, neke od njih i parazitiraju na životinjama, biljkama ili drugim gljivama.

Regnum: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Subphylum: Agaricomycotina

Classis: Agaricomycetes

Ordo: Agaricales

Familia: Agaricaceae

Genus: *Coprinus*

Species: *Coprinus comatus* (Redhead S. A., 2001; Vellinga E. C., 2003)

- Izgled gljive

Zbog svog karakterističnog izgleda gljiva *Coprinus comatus* ima naziv na engleskom Lawyer's wig (sudijina perika) i Shaggy inky cap (kosmata, mastiljava kapa). Gljiva je u početnom stadijumu jajastog oblika, bele boje, a površina je pokrivena ljuspama. U početnom stadijumu ova gljiva je jestiva. Drška je tanka i takođe bele boje, i može da naraste do visine od 10 cm. Mlada plodonosna tela u početnom stadijumu pokrivaju veći deo stabljike, zatim se zvonolika kapa otvara, počinje da tamni i sa ivica se cedi crna tečnost puna spora.

Karakteristično za ovu vrstu je da nekoliko dana nakon početnog stadijuma ili ako se ubere, u narednih nekoliko sati, izvrši autodigestiju svoje kape, odnosno pretvori se u tamnu tečnu masu punu spora, koja izgledom podseća na mastilo, pa otuda i potiče jedan od njenih naziva (Ma Z., 2009).

- Rasprostranjenost

Coprinus comatus je veoma rasprostranjena gljiva i može se videti od proleća do jeseni kako raste usamljena, busenasto ili u grupama po travnjacima i livadama, šipražjima i uz šljunkovite i ogoljene drumove, naročito u Evropi i Severnoj Americi, gde je autohtona vrsta, i u Australiji, gde je preneti. Poslednjih godina *C. comatus* se sve više kultiviše, naročito u Kini, odnosno zemljama Istočne Azije (Ma Z., 2009; Dotan N., 2011).

- Pregled farmakoloških i toksikoloških svojstava

Coprinus comatus gljiva je prethodno cenjena prevashodno zbog svoje nutritivne vrednosti i prijatnog ukusa, a poslednjih godina ona je postala predmet istraživanja zbog potencijalnih terapijskih svojstava. Lako se adaptira na promene u sredini i sintetiše različite sekundarne biomolekule, koji mogu imati terapijski efekat (Zaidman B. Z., 2008; Yu J., 2009).

Rezultati savremenih istraživanja su pokazali da preparati gljive *Coprinus comatus* poseduju sledeće korisne efekte, od značaja za ovo istraživanje: poboljšavaju sekreciju insulina iz beta ćelija pankreasa, pospešuju metabolizam glukoze i lipida, popravljaju ćelijsku osetljivost na insulin (Bailey C. J., 1984; Ding Z., 2010; Han C., 2006; Han C., 2008; Han C., 2009). Pored antidijabetičkog dejstva, pripisuju joj se i antimutageno, antipiretičko, hipoholesterolemijsko, antibakterijsko, imunomodulatorno i antitumorsko dejstvo (Sabo A., 2010; Dotan N., 2011; Ding Z., 2010). U pojedinim istraživanjima je pokazana i visoka antioksidativna aktivnost ekstrakata gljive (Ma Z., 2009; Dotan N., 2011; Lv Y., 2009). Savremena istraživanja su imala za cilj da otkriju mehanizam ovih pozitivnih efekata i izolovano je nekoliko supstanci, odnosno sekundarnih metabolita iz gljive *Coprinus comatus* za koje se smatra da dovode do gore pomenutih dejstava. Za antioksidativnu aktivnost se

smatra da su zaslužne sledeće komponente nađene u ekstraktu: fenoli, tokoferoli, flavonoidi, a naročito derivat aminokiseline histidin – aminokiselina ergotionin (Ma Z., 2009; Dotan N., 2011; Lv Y., 2009). Za hipoglikemijsko dejstvo se smatra da je zaslužan sekundarni metabolit gljive koji je nazvan komatin (Ding Z., 2010).

Bailey i saradnici su još davne 1984. godine prijavili da *Coprinus comatus* snižava nivo glukoze u krvi i da popravlja glukoznu toleranciju kod normalnih miševa koji su bili na ishrani koja je sadržala 33,3% osušene gljive od ukupne količine hrane. Tada je uočen umereni hipoglikemijski efekat koji sporo nastaje, odnosno došlo je do sniženja bazalne glikemije životinja koje su hranjene gljivom (Bailey C. J., 1984).

Antidijabetičku aktivnost same gljive *Coprinus comatus* i *Coprinus comatus*-a obogaćenog vanadijumom dokumentovali su razni autori. Oni su iskoristili sposobnost ove gljive da apsorbuje hemijske elemente u tragovima, kao što su vanadijum, kadmijum, olovo, arsen, bakar, nikal, srebro, hrom i živa, kako bi poboljšali osnovno hipoglikemijsko dejstvo gljive. Rezultati su pokazali da sama gljiva poseduje hipoglikemijsko dejstvo koje se poboljšava obogaćenjem gljive vanadijumom. Takođe, poređenjem gljive *Coprinus comatus* sa gljivama *Grifola frondosa* i *Ganoderma lucidum*, koje su isto tako bile obogaćene vanadijumom i za koje se smatra da poseduju hipoglikemijsku sposobnost, uočeno je da je antidijabetička aktivnost *Coprinus comatus*-a statistički značajno veća u odnosu na druge dve gljive (Bailey C. J., 1984; Ding Z., 2010; Han C., 2006; Zhou G., 2008; Lv Y., 2009).

Yamac i saradnici su ispitivali dejstvo egzopolisaharida produkovanih od strane gljiva *Cerrena unicolor*, *Coprinus comatus* i *Lenzites betulina* na glikemiju dijabetičnih pacova. Uočeno je da sve tri gljive produkuju egzopolisaharide koji snižavaju koncentraciju glukoze u krvi dijabetičnih životinja. Prema histološkim nalazima pankreasa eksperimentalnih životinja, primećeno je da tretman egzopolisaharidima ispitivanih gljiva dovodi do povećanja površine Langerhansovih ostrvaca, kao i ukupnog broja ćelija u istim (Yamac M., 2009).

Nedavno je iz gljive *Coprinus comatus* izolovana supstanca komatin, za koju se smatra da ima antidijabetičko dejstvo. U ogledu na pacovima, komatin je doveo do statistički značajnog sniženja nivoa glukoze u krvi natašte kao i nakon testa opterećenja glukozom. Posle primene ove supstance, koncentracije ukupnog holesterola i triglicerida bile su značajno snižene, pa se može reći da je komatin ispoljio i hipolipemijsko dejstvo (Ding Z., 2010).

Kao što je ranije navedeno, istraživanja su pokazala da *Coprinus comatus* poseduje i antioksidativne sposobnosti. Čelije sisara poseduju intracelularnu odbranu u vidu enzima superoksid-dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation-peroksidaze (GSHPx) u cilju zaštite ćelija od prevelikih nivoa slobodnih radikala. Drugi vid odbrane je egzogeni unos materija kao što su vitamini (A, E), minerali (selen, cink, vanadijum), esencijalne aminokiseline i polisaharidi. Dokazano je da sekundarni metaboliti gljiva zajedno sa prethodno navedenim supstancama kojima su razne vrste gljiva bogate ispoljavaju antioksidativna svojstva (Ferreira I., 2007; Jayakumar T., 2011).

U nezavisnim i odvojenim *in vitro* istraživanjima Li-a i saradnika i Tsai-a i saradnika je ukazano na potencijal gljive *Coprinus comatus* da štiti od oksidativnog stresa. Rezultati su pokazali da i vodeni i etanolni ekstrakti poseduju antioksidativne sposobnosti. U istoj studiji spektrofotometrijskim analizama je utvrđen visok sadržaj: ukupnih fenola, tokoferola, flavonoida i polisaharida (Li B., 2010; Tsai S. Y., 2009).

U opsežnoj studiji Yu-a u kojoj je korišćen *Coprinus comatus* obogaćen selenom je pokazano da polisaharidi iz gljive poseduju hipoglikemijsko, hipolipemijsko i antioksidativno dejstvo. U ovom ogledu je aloksan korišćen ne samo za izazivanje dijabetesa nego i za izazivanje oksidativnog stresa. U zaključku je navedeno da polisaharidi iz gljive štite od oksidativnog stresa izazvanog aloksanom, za šta autori misle da je direktno ili indirektno odgovorno za hipoglikemijsko i hipolipemijsko dejstvo (Yu J., 2009).

Toksikoloških studija, odnosno studija bezbednosti primene gljive *Coprinus comatus* praktično nema. Ono što se zna je to da gljiva *Coprinus atramentarius*, koja je iz istog roda kao i *Coprinus comatus*, izaziva znakove trovanja ako se konzumira zajedno sa alkoholom. Izolovana supstanca iz *Coprinus atramentarius*-a zaslužna za to dejstvo je koprin, koji inhibiše acetaldehid dehidrogenazu i dovodi do reakcija sličnih disulfiramskoj. Bez obzira što pripada istom rodu kao i *Coprinus atramentarius*, iz gljive *Coprinus comatus* još uvek nije izolovan koprin ili supstanca sličnog dejstva (Sabo A., 2010).

1.5. Dijabetes melitus – epidemija 21. veka

Početak prošlog veka je otkriven insulin, što je bilo značajan preokret u životima onih koji su bolovali od dijabetesa. Otkriće insulina se ubraja među najznačajnija dostignuća

20. veka, jer su do tada mladi oboleli od dijabetesa sigurno i brzo umirali. Za ovo otkriće Banting i Meklaud su 1923. godine dobili Nobelovu nagradu (Wright J. R., 2002; Bliss M., 1993). Godinama posle toga terapija dijabetesa je bivala sve bolja, dok pre nekoliko decenija nije prepoznata nova, moderna epidemija dijabetesa (Hall M., 2009). Današnja statistika dijabetesa je poražavajuća, jer govori da se dijabetes ubraja među 5 najčešćih nezaraznih uzroka smrti u svetu. Takođe je zastrašujuće da su procene da će se procenat svetske populacije obolele od dijabetesa do 2030. godine značajno uvećati, odnosno da će broj obolelih tada biti skoro duplo veći u odnosu na danas (Shaw J. E., 2010).

- Rastuća epidemija dijabetesa

Rastuća prevalenca dijabetesa i tipa 1 i tipa 2 – sa svim ozbiljnim komplikacijama koje ova bolest nosi, kao što su kardiovaskularne komplikacije, zastoj rada bubrega, amputacije i slepilo – ne jenjava. Sada je jasno da je to globalna epidemija. Projekcije govore da će ukupan broj odraslih osoba (20–79 godina starosti) obolelih od dijabetesa, koji je u 2000. iznosio 171 milion, a u 2010. 285 miliona, biti 439 miliona ili 7,7% ukupne svetske populacije 2030. godine. Takođe, od 2010. do 2030. godine predviđa se povećanje od 69% u broju obolelih od dijabetesa u zemljama u razvoju, a u razvijenim zemljama ono će biti znatno manje, odnosno 20% (Shaw J. E., 2010; Wild S., 2004; International Diabetes Federation Europe, 2011).

Statistika dijabetesa u Evropi se ne razlikuje puno u odnosu na ostatak sveta, s tim što se ovde poslednjih godina uočava novi problem koji je u uzročno-posledičnoj vezi sa nastankom dijabetesa, naročito tipa 2, a to je gojaznost. Tip 2 čini preko 90% od ukupnog broja obolelih od dijabetesa, a udružen je sa prekomernom telesnom masom i/ili abdominalnim tipom gojaznosti i/ili fizičkom neaktivnošću. Do skora, ovaj tip dijabetesa se viđao samo kod odraslih osoba, a danas je prisutan i kod dece i kod adolescenata, ne samo u Evropi nego i u celom svetu. Procene govore da je 1 od 5 dece koja žive u Evropi gojazno i da svake godine približno 400.000 dece postaje gojazno (International Diabetes Federation Europe, 2011; Centers for Disease Control and Prevention, 2011; Danaei G., 2011). Kada je reč o Sjedinjenim Američkim Državama, situacija je slična, jer se i tamo uočava porast obolele dece i adolescenata od tipa 2 dijabetesa. Problem je isto tako gojaznost, s tim što se povećana učestalost dijabetesa tipa 2 javlja u posebnim etničkim grupacijama, kao što su

američki Indijanci, Afroamerikanci, Hispano/Latinoamerikanci i stanovnici Pacifičkih ostrva (Centers for Disease Control and Prevention, 2011; Danaei G., 2011).

Prema podacima Internacionalne federacije za dijabetes (International Diabetes Federation – IDF), u svetu danas ima preko 300 miliona obolelih od dijabetesa, a od toga veliki broj njih živi u Evropi. U studiji sprovedenoj pre nekoliko godina, koja je obuhvatila 47 evropskih zemalja, procenjeno je da 8,1% evropske populacije starosti između 20 i 79 godina, odnosno 52,8 miliona, boluje od dijabetesa. Njihova predviđanja za Evropu u 2030. godini kažu da će broj obolelih tada iznositi 64 miliona. Prevalenca među ispitivanim zemljama je značajno varirala, od 2,6% u Azerbejdžanu do 12,7 u Portugalu. Treba napomenuti da u više od 15 zemalja Evrope ima 9% ili više odraslih obolelih od dijabetesa. Tih više od 15 zemalja uglavnom čine zemlje Istočne Evrope, među kojima je i Srbija. Što se tiče finansijskih izdvajanja za lečenje obolelih od dijabetesa, veliki broj zemalja troši oko 9% (20 od 47) od ukupnih sredstava koja se koriste u zdravstvenom sistemu. Uprkos velikim izdvajanjima, na nivou Evrope, dijabetes je na četvrtom mestu glavnih uzroka smrti. Zabrinjavajuće je da uprkos velikom porastu obolelih od dijabetesa i troškovima koje nosi lečenje istih, u dosta evropskih zemalja još uvek ne postoji nacionalni plan za rešavanje ovog problema (Centers for Disease Control and Prevention, 2011; Danaei G., 2011;Whiting D. R., 2011).

Ako se Sjedinjene Američke Države porede sa Evropom u statistici dijabetesa, uviđa se da danas nema velike razlike. U studiji koju je sproveo Američki nacionalni centar za prevenciju i kontrolu bolesti (U. S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention – CDC) pokazano je da je u 2010. godini 13 miliona ili 11,8% od ukupnog broja muškaraca starijih od 20 godina u SAD obolelo od dijabetesa, i da od žena koje žive u SAD 10,8% starijih od 20 godina ili 12,6 miliona je obolelo od dijabetesa. Isto tako je uočeno da postoji razlika u prevalenci dijabetesa među različitim rasama: za belu rasu prevalenca je 10,2%, a za crnu rasu ona je 18,7%. Finansijska izdvajanja za lečenje obolelih od dijabetesa, odnosno direktni medicinski troškovi, u 2007. godini u SAD su iznosili 116 milijardi dolara. Ako tome dodamo i indirektno troškove – kao što su gubitak radne sposobnosti, disabilitet, prerana smrt – koji su iznosili u istoj godini 58 milijardi dolara, shvatamo da su finansijski troškovi do kojih dovodi dijabetes ogromni. U SAD dijabetes je na sedmom mestu glavnih uzroka smrti, ali je vodeći uzrok srčanih poremećaja i moždanog udara

(Centers for Disease Control and Prevention, 2005; Centers for Disease Control and Prevention, 2011; Danaei G., 2011;Whiting D. R., 2011; Cowie C. C., 2006).

Navedeno je da Srbija spada među zemlje sa najvećom prevalencom dijabetesa u Evropi. Prema IDF Atlasu dijabetesa za 2011. godinu prevalenca dijabetesa u Srbiji je iznosila 9,4%. Predviđanja su da će ona u 2030. godini biti 10,5%. Kada se prevalenca preračuna na broj stanovnika, dobija se da je u 2011. u Srbiji bilo 671.020 obolelih od dijabetesa, a da će ih u 2030. biti 752.040. Prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ za istu godinu, prevalenca dijabetesa je manja – 8,2%. Finansijski troškovi za lečenje obolelih od dijabetesa iznose 11% od ukupnih sredstava koja se izdvajaju za zdravstvenu zaštitu u Republici Srbiji. Srbija je takođe jedna od evropskih zemalja koja prema IDF Atlasu još uvek nema Nacionalni plan za dijabetes, mada postoje Nacionalni program, Nacionalni vodič, kao i Nacionalni registar za dijabetes. Od pre nekoliko godina u Srbiji postoji i Nacionalna strategija za prevenciju i kontrolu hroničnih nezaraznih bolesti u kojoj se navodi da je dijabetes jedan od vodećih uzroka smrti u Srbiji. Dijabetes je u 2010. godini bio na četvrtom mestu vodećih uzroka smrti, sa 3,1%, odmah iza povreda i trovanja, na koja je odlazilo 3,3% od ukupnih uzroka smrti. Ako se te brojke porede sa 1990. i 2000. godinom, uočava se jasan trend porasta mortaliteta od dijabetesa u Srbiji. U 1990. godini dijabetes je bio na petom mestu uzroka smrti, sa 2,1%, a već 2000. godine je delio četvrto mesto sa opstruktivnim bolestima pluća. U Nacionalnoj strategiji je posebno istaknuto da je Vojvodina regija sa najvećom stopom mortaliteta od dijabetesa u Srbiji (Vlada Republike Srbije, 2009; Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, 2012; Ministarstvo zdravlja Republike Srbije, 2009; Institute of Public Health of Serbia, 2010; International Diabetes Federation Europe, 2011; International Diabetes Federation Europe, 2012).

- Poremećaj koji vodi u dijabetes

U zemljama sa pouzdanom statistikom morbiditeta, preko 15% populacije starije od 20 godina ima poremećen metabolizam glukoze, odnosno stanje koje se naziva predijabetes. Predijabetes je stanje u kojem je kod osoba nivo šećera u krvi (natašte između 6,1 i 6,9 mmol/L ili nakon testa opterećenja između 7,8 i 11,1 mmol/L) ili glikoliziranog hemoglobina

viši od normalnog ali nedovoljno visok da se klasifikuje kao dijabetes. U principu, predijabetes predstavlja „sivu zonu“ iz koje se često prelazi u dijabetes. S druge strane, ovo je stanje u kojem se čoveku može najviše pomoći. U velikom broju studija je dokazano da ako se promeni način života, a misli se na smanjenje telesne mase i povećanje fizičke aktivnosti, može se očekivati da je preveniran nastanak dijabetesa. Ukoliko se poremećaji te vrste ne drže pod kontrolom, gotovo uvek se razvijaju u dijabetes. Bitno je navesti da predijabetes ne vodi samo ka nastanku dijabetesa tipa 2, nego i ka srčanim oboljenjima i moždanom udaru (Wild S., 2004; Shaw J. E., 2010; International Diabetes Federation Europe, 2011; Centers for Disease Control and Prevention, 2011; Policy and Care Improvement Team, 2009).

U Velikoj Britaniji, kao jednoj od razvijenih evropskih zemalja, problem predijabetesa, odnosno poremećene regulacije nivoa glukoze u krvi je velik. U izveštaju Britanskog nacionalnog udruženja za dijabetes (Diabetes UK) se navodi da za osobe koje imaju poremećaj regulacije nivoa glukoze u krvi postoji 15 puta veći rizik da obole od dijabetesa tipa 2. Ali s druge strane, iste te osobe imaju čak 60% šansu da smanje rizik za nastanak dijabetesa samo ako umereno smanje telesnu masu, usvoje zdravu i uravnoteženu ishranu, i povećaju nivo fizičke aktivnosti. Procenjuje se da u Velikoj Britaniji trenutno ima preko 7 miliona osoba u stanju predijabetesa. U istraživanju studijske grupe DECODE iz 2003, koje je obuhvatilo 13 evropskih zemalja, ističe se da je prevalenca predijabetesa u ispitivanim zemljama manja od 15% kod osoba do 60 godina starosti, a između 15 i 30% kod osoba starijih od 60 godina. U studiji sprovedenoj nedavno samo na tlu Španije pokazano je da je skoro 30% ispitanika imalo neki poremećaj regulacije nivoa glukoze (Soriguer F., 2012; The DECODE Study Group, 2003; Policy and Care Improvement Team, 2009).

U poslednjem izveštaju Američkog nacionalnog centra za prevenciju i kontrolu bolesti se navodi da je u SAD čak 35% osoba starijih od 20 godina, na osnovu merenja nivoa glukoze u krvi natašte i glikoziliranog hemoglobina, u stanju predijabetesa. Kada se taj broj primeni na celokupnu populaciju SAD, procena je da oko 79 miliona Amerikanaca starijih od 20 godina ima predijabetes. Za razliku od dijabetesa, ovde nije uočena rasna razlika, jer je procenat osoba sa predijabetesom različitih rasa veoma sličan: 35% – bela rasa, 35% – crna rasa i 36% – meksički Amerikanci (Centers for Disease Control and Prevention, 2011).

Ako se posmatra samo nivo glukoze u krvi natašte, na globalnom nivou je uočeno da se u 2008. godini beleži značajan porast pomenutog nivoa u odnosu na samo 10 godina ranije.

Ovaj nivo je porastao za 0,07 mmol/L kod muškaraca i 0,09 mmol/L kod žena i ima tendenciju rasta, čime ih približava sve više stanju predijabetesa. Kako bi se sprečio ovaj trend porasta glikemije, odnosno nastanak dijabetesa, u literaturi se navodi da je bitno kontrolisati telesnu masu, primarno poboljšanjem ishrane, a onda i fizičkom aktivnošću (Danaei G., 2011).

- Komplikacije dijabetesa

U prethodnom poglavlju je opisano koji su savremeni stavovi u prevenciji nastanka dijabetesa tipa 2. Isto je tako bitno šta preduzeti kada je nastao dijabetes, kako sprečiti komplikacije. Sada već davne 1989. godine doneta je Deklaracija St. Vinsent čiji je jedan od glavnih ciljeva bio sprečiti dijabetesne komplikacije. U Deklaraciji je rečeno da: treba smanjiti broj novonastalih slepila uzrokovanih dijabetesom za trećinu ili više, smanjiti broj ljudi koji ulaze u terminalnu fazu bubrežne insuficijencije za trećinu, za polovinu smanjiti broj amputacija donjih ekstremiteta i smanjiti mortalitet i morbiditet koronarne srčane bolesti (Hall M., 2009).

Većina evropskih vodiča navodi da lečenje obolelih od dijabetesa treba da bude multifaktorijalno, kako bi se sprečile komplikacije. Lekar opšte prakse bi trebalo da stavi fokus na istovremeno snižavanje nivoa glukoze u krvi, snižavanje povišenog krvnog pritiska i terapiju dislipidemija. U velikom broju evropskih studija je dokazano da je snižavanje nivoa glukoze u krvi i kod obolelih od dijabetesa i kod onih u stanju predijabetesa veoma značajno za smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti. U studiji ADVANCE, u kojoj je učestvovao velik broj centara iz Azije, Australije, SAD i Evrope, istaknuto je da zahvaljujući snižavanju glikemije dolazi i do snižavanja nivoa glikoliziranog hemoglobina, što je za posledicu imalo značajan pad makrovaskularnih i mikrovaskularnih komplikacija. U studiji koju je sprovela Britanska prospektivna dijabetes studijska grupa (UK Prospective Diabetes Study Group – UKPDS) poređene su konvencionalna terapija i intenzivna terapija dijabetesa tipa 2 po pitanju rizika za komplikacije. Rezultati studije su pokazali da sniženje glikoliziranog hemoglobina sa 7,9% na 7% vodi ka smanjenju mikrovaskularnih komplikacija za 25%. Takođe se navodi da je smrtnost od svih uzroka smrti značajno manja kod obolelih lečenih intenzivnom terapijom u odnosu na obolele lečene konvencionalnom terapijom (UK Prospective Diabetes Study Group, 1998; The ADVANCE Collaborative Group, 2008; Dieren S., 2013).

Navedeno je da je u SAD dijabetes glavni uzrok za nastanak bubrežne insuficijencije, netraumatske amputacije donjih ekstremiteta, novonastalih slepila među odraslima, srčanih oboljenja i moždanog udara. Američki nacionalni centar za prevenciju i kontrolu bolesti navodi da je za prevenciju dijabetesnih komplikacija najbitnija kontrola nivoa glukoze u krvi. Studije sprovedene u SAD su pokazale da od poboljšanja glikemije imaju koristi oboleli od dijabetesa i tipa 1 i tipa 2. U istim je primećeno da snižavanje glikemije ima i svoje rizike. U studiji ACCORD je uočeno da prilikom intenziviranog snižavanja glikemije dolazi do povećanja smrtnosti, što od hipoglikemije, što od neželjenih reakcija lekova, što od interakcija lekova. Dokazano je i da sniženje nivoa glikoliziranog hemoglobina (HbA1c) za samo 1% (npr. sa 8% na 7%) vodi ka smanjenju rizika za pojavu mikrovaskularnih komplikacija za 40% (Centers for Disease Control and Prevention, 2005; Centers for Disease Control and Prevention, 2011). U istim istraživanjima se navodi da oboleli od dijabetesa imaju 2 do 4 puta veći rizik od umiranja od srčanih bolesti ili moždanog udara. Čak 67% odraslih osoba u SAD starijih od 20 godina kao komplikaciju ima dijagnostikovanu hipertenziju. U populaciji odraslih starijih od 40 godina 28,5% obolelih od dijabetesa ima dijabetesnu retinopatiju, a 4,4% ima uznapredovalu retinopatiju koja brzo vodi ka gubitku vida. Dalje, više od 44% novih slučajeva bubrežne insuficijencije i više od 60% netraumatskih amputacija donjih ekstremiteta se može klasifikovati kao komplikacija dijabetesa (Centers for Disease Control and Prevention, 2005; Centers for Disease Control and Prevention, 2011; Danaei G., 2011; Whiting D. R., 2011; Cowie C. C., 2006; The ADVANCE Collaborative Group, 2008; The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group, 2008).

U Nacionalnom registru dijabetesa Republike Srbije se nalaze sledeći podaci vezani za komplikacije dijabetesa. Od ukupnog broja obolelih od dijabetesa starijih od 20 godina 63,6% osoba muškog pola, 75,8% ima hipertenziju kao komplikaciju, a značajan broj je oboleo i od drugih kardiovaskularnih bolesti, kao što su: angina pektoris, akutni infarkt miokarda i hronična srčana insuficijencija. Od drugih komplikacija u istoj populaciji 4,7% osoba muškog pola i 4,9% osoba ženskog pola ima retinopatiju (nije objašnjeno koji stadijum), dok 3% osoba muškog pola i 2,3% osoba ženskog pola ima dokazanu nefropatiju (nije objašnjeno koji stadijum). Što se tiče moždanog udara, u Registru se navodi da samo 3,7% muškaraca i 2,5% žena ima ovu komplikaciju dijabetesa (Institute of Public Health of Serbia, 2010).

Na globalnom nivou postoje zajednički stavovi u pogledu na rešavanje problema dijabetesa, odnosno prevencije nastanka same bolesti, kao i njenih komplikacija. Preporuke su da se što više ulaže u bazična i klinička istraživanja na polju dijabetesa, koja moraju biti kontinuirana i samoodrživa. Takođe se teži stvaranju centara za lečenje dijabetesa, edukaciju i, najbitnije, istraživanja o ovoj bolesti (Centers for Disease Control and Prevention, 2005; Centers for Disease Control and Prevention, 2011; Hall M., 2009; Whiting D. R., 2011).

Savremena istraživanja su dokazala da promene u načinu života, a prevashodno u ishrani – koja bi mogla da sadrži više funkcionalne hrane, odnosno pomoćnih lekovitih supstanci – mogu značajno da smanje rizik od nastanka dijabetesa, da ga odlože ili da umanje njegove komplikacije (Perera P. K., 2011; Swanston–Flatt, 1990). S obzirom na to da postoje dokazi da je primena alternativnih lekova, kao što su preparati biljaka i gljiva, efikasna u regulaciji blažih formi poremećenog metabolizma, teži se detaljnijem ispitivanju istih kako bi se stekao uvid u njihov mehanizam dejstva (Zhou X., 2009; Holliday J., 2008; Mohammed A., 2007; Zhang H. N., 2003).

Sa nutricionere tačke gledišta gljive su korisne, jer imaju uravnotežen odnos hranljivih materija, visok sadržaj vlakana, aminokiselina i esencijalnih masnih kiselina, kao i vitamina i oligoelementa (selen, cink i kobalt). Takođe, gljive produkuju čitav niz sekundarnih metabolita i oni svi zajedno mogu igrati značajnu ulogu u regulaciji metabolizma i sprečavanju komplikacija kod dijabetesa. Samim tim gljive predstavljaju idealnu hranu za obolele od ove bolesti (Perera P. K., 2011; Chang S. T., 2004; Fan J. M., 2006; Yilmaz N., 2006).

1.6. Oksidativni stres

Početak dvadesetog veka Maks Rubner je prvi primetio, a danas je to dobro poznato, inverzni odnos između potrošnje kiseonika i dužine života sisara. Kasnije je ova zapažanja proširio Pearl u takozvanoj hipotezi „brzina života“, koja govori da je životna količina energije konačna i da je životni vek određen brzinom kojom se ona troši. Iako ova hipoteza više nije prihvaćena, ona je privukla pažnju naučnicima ka proučavanju metabolizma kiseonika. Sredinom tridesetih godina prošlog veka je uočeno da je kiseonik u većem procentu

nego što je normalno u atmosferi (21%) toksičan za većinu životinja (Marnett L. J., 2000; Muller F. L., 2007).

Nakon ovih hipoteza pojavila se teorija slobodnih radikala, kada su otkriveni slobodni kiseonični radikali, za koje se tradicionalno mislilo da su suviše reaktivni da bi postojali u biološkim sistemima. Slobodni kiseonični radikali su pronađeni *in situ* kao odgovor na radijaciju i trovanje kiseonikom i smatralo se da su oni odgovorni za posledičnu toksičnost. Uočivši da radijacija indukuje mutacije, rak i starenje, Harman je pretpostavio da se slobodni kiseonični radikali (hidroksil OH^\bullet i hidroperoksil HO_2^\bullet) formiraju endogeno u normalnim aerobnim metaboličkim procesima i da igraju ključnu ulogu u starenju ćelije i samog organizma. Otkriće SOD i demonstracija prisustva vodonik-peroksida (H_2O_2) *in vivo* su učvrstili teoriju slobodnih radikala (Fridovich I., 1975). Kasnije je Harman predložio modifikaciju ove teorije, dajući ključnu ulogu mitohondrijama, zato što ove organele stvaraju neproporcionalno velike količine reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV) u ćelijama. Saglasno sa Harmanovom modifikacijom teorije, otkriveno je da su delecije i tačkaste mutacije mitohondrijalne DNK (mtDNK) indukovane oksidativnim stresom i da se dramatično povećavaju sa starošću (Marnett L. J., 2000; Muller F. L., 2007; Sun Y., 1988). U poslednjih pedeset godina Harmanova hipoteza je doradivana kako bi obuhvatila ne samo slobodne radikale nego i druge forme aktivisanog kiseonika. Mnoge RKV kao što su peroksidi i aldehidi (koji tehnički nisu slobodni radikali) takođe igraju značajnu ulogu u oksidativnom oštećenju ćelija. Ovo otkriće je dovelo do modifikacije teorije slobodnih radikala, odnosno do stvaranja teorije oksidativnog stresa (Marnett L. J., 2000; Muller F. L., 2007; Kohen R., 2002).

Oksidativni stres se može definisati kao ćelijsko oštećenje, prouzrokovano radikalima, koje proizlazi iz poremećene ravnoteže između prooksidantnih i antioksidativnih činilaca. Postoji i obrnuta situacija kada su dominantni antioksidativni sistemi, i takvo stanje se može definisati kao redukcionni stres, koji takođe može dovesti do poremećaja ćelijske homeostaze (Marnett L. J., 2000; Muller F. L., 2007; Kohen R., 2002).

Da bi se zaštitila i održala homeostaza, aerobna ćelija je tokom evolucije razvila endogeni antioksidativni odbrambeni sistem, koji neutrališe stvorene reaktivne kiseonične vrste, sprečavajući na taj način oštećenja i doprinoseći reparaciji već nastalih. Celularna zaštita od oksidativnog stresa uključuje: prevenciju, antagonizam i reparaciju. Prevencijom se

smanjuje stvaranje RKV-a putem helacije ili inaktivacije supstancija, pre svega teških metala, koja mogu dovesti do nastanka RKV-a. Antagonizam se ostvaruje preko antioksidativno delujućih enzima, odnosno razgradnjom RKV-a, delimično koristeći antioksidativne kofaktore ili neenzimskim mehanizmima, direktnim stupanjem u reakciju i neutralizacijom RKV-a. Od enzimskih mehanizama ističu se katalaza, glutation-peroksidaza i druge peroksidaze. Među neenzimskim antioksidativnim supstancama nalaze se vitamini, kao što je vitamin E ili vitamini A i C ali i endogeno sintetisane supstance kao što su glutation, transferin, feritin, itd. (Marnett L. J., 2000; Muller F. L., 2007; Kohen R., 2002). Takođe u neenzimske antioksidativne supstance se mogu svrstati i razni sekundarni metaboliti gljiva. Produkti gljiva učestvuju i u procesu reparacije, odnosno popravci oštećenja ili nastanku nove aerobne ćelije, jer pružaju velik broj supstrata za njenu popravku, tj. izgradnju (Jayakumar T., 2011; Li B., 2010; Tsai S. Y., 2009).

U brojnim studijama se ukazuje na to da su oštećenja nastala kao posledica oksidativnog stresa od prvorazrednog značaja u procesima starenja, razvoju zloćudnih tumora i mnogih drugih patoloških stanja kao što su: srpasta anemija, ateroskleroza, Parkinsonova bolest, Alchajmerova bolest, shizofrenija i za ovo istraživanje najbitnije, dijabetes (Buonocore G., 2010; Circu M. L., 2010; Ziech D., 2011; Wei W., 2009; Uttara B., 2009; Roberts C.K., 2009; Reuter S., 2010).

1.7. Značaj ispitivanja

Pregledom literature je pronađeno da pomoćna lekovita sredstva, među koja bi spadale i gljive, mogu značajno da umanje rizik od nastanka dijabetesa, da ga odlože ili da umanje njegove posledice. Takođe je uočen potencijal gljive *Coprinus comatus* da pomogne u regulisanju nivoa glukoze u krvi. S obzirom na to da su u Srbiji dostupni komercijalni preparati, postojala je potreba za detaljnim ispitivanjem farmakoloških i toksikoloških osobina gljive *Coprinus comatus*.

Već je rečeno da oksidativni stres može imati značajnu ulogu u nastanku dijabetesa i dijabetesnih komplikacija, a, opet, postoje dokazi da gljiva *Coprinus comatus* štiti od oštećenja organizma izazvanog slobodnim radikalima. Studije koje su potvrdile

antioksidativna svojstva gljive *Coprinus comatus* su uglavnom rađene u *in vitro* uslovima, a ne postoje *in vivo* ispitivanja koja bi proširila saznanja o ovom farmakološkom dejstvu gljive.

Imajući u vidu sve ranije navedene činjenice, shvatamo da su bazična istraživanja *sine qua non* u rešavanju globalnog problema dijabetesa. Ova studija je zamišljena tako da doprinese borbi protiv epidemije 21. veka, jer, kao što navode rukovodioci Uređivačkog odbora u pregledu „Diabetes – The Policy Puzzle: Is Europe Making Progress?“, „Samo ako delujemo zajedno, možemo imati uticaja na epidemiju dijabetesa“.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je bio da se primenom odgovarajućih metoda utvrdi:

1. Uticaj preparata gljive *Coprinus comatus* na glikemiju zdravih i dijabetičnih životinja;
2. Protektivno delovanje preparata gljive *Coprinus comatus* na životinje izložene oksidativnom stresu;
3. Uticaj preparata gljive *Coprinus comatus* na histološke karakteristike endokrinog pankreasa ispitivanih životinja;
4. Uticaj višekratne primene različitih doza preparata gljive *Coprinus comatus* na parametre toksičnosti na ispitivanim životinjama.

3. RADNE HIPOTEZE

Na osnovu prethodno definisanih ciljeva istraživanja postavljene su sledeće hipoteze:

1. Primena preparata gljive *Coprinus comatus* smanjuje poremećaj homeostaze glukoze ispitivanih životinja;
2. Primena preparata gljive *Coprinus comatus* ispoljava protektivno delovanje na životinje izložene oksidativnom stresu;
3. Primena preparata gljive *Coprinus comatus* sprečava oštećenje endokrinog pankreasa tretiranih životinja;
4. Višekratna primena različitih doza preparata gljive *Coprinus comatus* ne izaziva toksične promene na ispitivanim životinjama.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Eksperimentalne životinje

U ogledu su korišćeni zdravi beli laboratorijski pacovi, oba pola, soja Wistar, telesne mase 150–300 grama i odabrani metodom slučajnog izbora iz okota sa Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Laboratorijske životinje su boravile u Uni-Protect (Ehret, Emendingen, Nemačka) ormanima za čuvanje laboratorijskih životinja sa filterskim sistemom za protok vazduha, u Zavodu za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu. U ormarima je temperatura vazduha održavana između 20 i 25 °C, uz kontrolu vlažnosti vazduha i održavanje cirkadijalnog ritma (smena dana i noći u trajanju od 12h). Životinje su imale slobodan pristup vodi i standardnoj hrani za sitne laboratorijske životinje (Veterinarski institut Zemun, Srbija). Pristup hrani je bio onemogućen 6 sati pre merenja glikemije.

Briga o životinjama i sve eksperimentalne procedure su sprovedene u skladu sa etičkim načelima rada sa laboratorijskim životinjama. Izvođenje oglada je odobrila Etička komisija Univerziteta u Novom Sadu dajući svoju saglasnost sa planom ovog ispitivanja, broj odobrenja III-2011-07.

4.2. Komercijalni preparat gljive

Tokom oglada je korišten komercijalni preparat gljive *Coprinus comatus* za ljudsku upotrebu, koji se nalazi na tržištu Srbije. Preparat predstavlja 100-procentni, fino usitnjeni prašak osušene cele gljive *Coprinus comatus*. Tretiranje eksperimentalnih životinja je vršeno vodenom suspenzijom gljive koja je davana *per os* pomoću gastrične sonde. Vodena suspenzija gljive se primenjivala eksperimentalnim životinjama u tri različite doze (0,835 g/kg, 1,67 g/kg i 3,34 g/kg) i tokom tri vremenska intervala svakodnevno (7, 21 i 42 dana).

4.3. Tretman i podela eksperimentalnih grupa

U okviru ispitivanja za praćenje efekata gljive *Coprinus comatus* životinje su bile

podeljene u grupe u odnosu na ispitivanu dozu gljive i u odnosu na vremenski interval tretmana. Ispitivane životinje su nasumično podeljene na eksperimentalne i kontrolne grupe, pri čemu je svaka grupa brojala po 6 životinja. Sve životinje su bile podvrgnute merenju telesne mase, kao i glikemije neposredno pre početka oglada i nakon završetka oglada.

Eksperimentalne životinje su podeljene u sledeće grupe:

1. Kontrolne grupe koje su tretirane fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os 7, 21 i 42 dana (**KON**);
2. Eksperimentalne grupe koja su tretirane vodenom suspenzijom komercijalnog preparata gljive *Coprinus comatus* u dozi od 0,835 g/kg per os 7, 21 i 42 dana (**Com1**);
3. Eksperimentalne grupe koje su tretirane vodenom suspenzijom komercijalnog preparata gljive *Coprinus comatus* u dozi od 1,67 g/kg per os 7, 21 i 42 dana (**Com2**);
4. Eksperimentalne grupe koje su tretirane vodenom suspenzijom komercijalnog preparata gljive *Coprinus comatus* u dozi od 3,34 g/kg per os 7, 21 i 42 dana (**Com3**);
5. Eksperimentalne grupe koje su tretirane aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno, a zatim fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg, per os 7, 21 i 42 dana (**ALO**);
6. Eksperimentalne grupe koje su tretirane fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os 7, 21 i 42 dana, a zatim ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg intraperitonealno (**UTH**);
7. Eksperimentalne grupe koje su tretirane aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno, a zatim vodenom suspenzijom komercijalnog preparata gljive *Coprinus comatus* u dozi od 0,835 g/kg per os 7, 21 i 42 dana (**ALO+Com1**);
8. Eksperimentalne grupe koje su tretirane aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno, a zatim vodenom suspenzijom komercijalnog preparata gljive *Coprinus comatus* u dozi od 1,67 g/kg per os 7, 21 i 42 dana (**ALO+Com2**);
9. Eksperimentalne grupe koje su tretirane aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno, a zatim vodenom suspenzijom komercijalnog preparata gljive *Coprinus comatus* u dozi od 3,34 g/kg per os 7, 21 i 42 dana (**ALO+Com3**);
10. Eksperimentalne grupe koja su tretirane vodenom suspenzijom komercijalnog preparata gljive *Coprinus comatus* u dozi od 0,835 g/kg per os 7, 21 i 42 dana, a zatim ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg intraperitonealno (**UTH+Com1**);
11. Eksperimentalne grupe koje su tretirane vodenom suspenzijom komercijalnog preparata

gljive *Coprinus comatus* u dozi od 1,67 g/kg per os 7, 21 i 42 dana, a zatim ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg intraperitonealno (**UTH+Com2**);

12. Eksperimentalne grupe koje su tretirane vodenom suspenzijom komercijalnog preparata gljive *Coprinus comatus* u dozi od 3,34 g/kg per os 7, 21 i 42 dana, a zatim ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg intraperitonealno (**UTH+Com3**).

Poslednjeg dana ogleđa, 2h nakon administracije poslednje doze gljive, odnosno izvođenja predviđenih farmakodinamskih testova, životinje su anestetizirane 25% rastvorom uretana (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, USA), u dozi od 5 ml/kg intraperitonealno. Nakon gubitka refleksa uspravljanja, životinje su žrtvovane eksangvinacijom (kardiopunkcijom) u cilju uzimanja uzoraka krvi i drugih tkiva za dalja ispitivanja.

4.4. Farmakodinamska ispitivanja

Za ispitivanje uticaja gljive *Coprinus comatus* na glikemiju zdravih i dijabetičnih životinja korišćena su tri farmakodinamska testa: adrenalinski test, test oralnog podnošenja glukoze i indukcija trajne hiperglikemije aloksanom.

Za indukciju trajne hiperglikemije kod laboratorijskih životinja korišćen je aloksan (alloxan monohydrate, Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, USA). Aloksan je veoma nestabilna hidrofilna supstanca, sa kratkim poluvremenom trajanja (1,5 minuta) i strukturno je veoma sličan glukozi. Vezuje se za GLUT2 glukozne transportere koji se nalaze na površini beta ćelija pankreasa i ulazi u iste, gde stvaranjem reaktivnih vrsta kiseonika dovodi do oštećenja. Ovo oštećenje je selektivno, jer aloksan oštećuje samo beta ćelije Langerhansovih ostrvaca, dok druge ostaju netaknute. Smrt beta ćelija koju izaziva aloksan je po tipu nekroza, za razliku od smrti beta ćelija koja nastaje kod obolelih od dijabetes melitusa tipa 1, gde je ona po tipu apoptoza, tako da se ovaj tip dijabetesa naziva aloksanski dijabetes (Lenzen S., 2008; Szkudelski T., 2001; Etuk E. U., 2010).

Aloksan je rastvaran fiziološkim rastvorom neposredno pre aplikacije i primenjen je u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (i.p.) jednokratno. Posle 48h od primene aloksana, uzorkovana je krv iz repne vene u cilju određivanja koncentracije glukoze u krvi. Životinje

koje su tada imale glikemiju višu od 15 mmol/L su bile uključene u dalji tok ispitivanja, odnosno primenjivana im je vodena suspenzija gljive *C. comatus*.

U cilju izvođenja testa oralne tolerancije glukoze životinje su primile vodeni rastvor glukoze u dozi od 3 g/kg per os. Pre primene vodenog rastvora glukoze određivana je startna glikemija, a zatim nakon 30 minuta od primene istog merena je ponovo vrednost glikemije.

U cilju izvođenja adrenalinskog testa životinje su primile 0,2 mg/kg adrenalin hidrohlorida (Jugoremedija Zrenjanin, Srbija) subkutano (s.c.). Pre primene adrenalina određivana je startna glikemija, a zatim nakon 45 minuta od primene istog merena je ponovo vrednost glikemije.

Koncentracija glukoze u kapilarnoj krvi, uzete iz repne vene pacova, određivana je komercijalnim kitovima na aparatu Accu-chek Active (Roche Bazel, Švajcarska). Koncentracija glukoze u krvi eksperimentalnih životinja je merena neposredno pre početka tretmana, 2 sata nakon prve doze gljive *C. comatus* ili fiziološkog rastvora, a zatim svakih 7 dana do završetka ogleada. Kako bi se što preciznije odredio uticaj tretmana na vrednosti šećera u krvi, računata je površina ispod krive vrednosti šećera u krvi tokom posmatranog perioda (AUC). Za računanje površine ispod krive u obzir su uzeta sva merenja glikemije. Tako je za grupe koje su tretirane 7 dana prva tačka krive bila vrednost glikemije merena neposredno pre početka ogleada, druga tačka je bila vrednost posle prve doze odgovarajuće supstance a treća tačka je bila vrednost glikemije poslednjeg dana ogleada. Za grupe koje su tretirane 21 dan: prva tačka krive je bila vrednost glikemije merena neposredno pre početka ogleada, druga tačka je bila vrednost posle prve doze odgovarajuće supstance, treća tačka je bila vrednost izmerena 7-og dana ogleada, četvrta tačka je bila vrednost izmerena 14-og dana ogleada a peta tačka je bila vrednost glikemije poslednjeg dana ogleada. Za grupe koje su tretirane 42 dana: prva tačka krive je bila vrednost glikemije merena neposredno pre početka ogleada, druga tačka je bila vrednost posle prve doze odgovarajuće supstance, treća tačka je bila vrednost izmerena 7-og dana ogleada, četvrta tačka je bila vrednost izmerena 14-og dana ogleada, peta tačka je vrednost izmerena 21-og dana ogleada, šesta tačka je bila vrednost izmerena 28-og dana ogleada, sedma tačka je bila vrednost izmerena 35-og dana a osma tačka je bila vrednost glikemije poslednjeg dana ogleada.

4.5. Biohemijska i toksikološka ispitivanja

Od biohemijskih parametara u serumu je određivana koncentracija lipida, odnosno lipidni status. Takođe, u cilju praćenja jetrene i bubrežne funkcije u serumu ispitivanih životinja je određivana enzimska aktivnost aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferaze (ALT) i koncentracija uree i kreatinina. Sve analize su rađena prema standardnim spektrofotometrijskim metodama na automatskom sistemu za hemijske analize Olympus AU 400 (Hamburg, Nemačka).

- Lipidni status

Koncentracija ukupnog holesterola određivana je metodom CHOD-POD (holesterol/oksidaza/peroksidaza). Indikator je hinonimin nastao u reakciji 4-aminoantipirina, fenola i vodonik-peroksida katalizovane peroksidazom (Spasić S., 2003; Majkić-Sing N., 1995).

Određivanje koncentracije ukupnih triglicerida vršeno je enzimskom GPO-POD (glicerol-3-fosfat/oksidaza/peroksidaza) metodom nakon enzimskog razdvajanja pomoću lipoprotein lipaze. Indikator je hinonimin, nastao u reakciji 4-aminoantipirina, 4-hlorfenola i vodonik-peroksida katalizovane peroksidazom (Spasić S., 2003; Majkić-Sing N., 1995).

Određivanje koncentracije HDL holesterola je vršeno pomoću metode CHE-CHO-POD (holesterol/esteraza/oskidaza/peroksidaza). Hilomikroni, lipoproteini veoma niske gustine (VLDL) i LDL čestice iz uzorka krvi se istalože dodavanjem 12-volframfosforne kiseline i magnezijumovih jona i nakon centrifugiranja u supernatantu ostaju samo HDL čestice. Sadržaj holesterola u HDL česticama zatim se određuje enzimskom metodom pomoću holesterolskog reagensa (Spasić S., 2003; Majkić-Sing N., 1995).

Određivanje vrednosti LDL holesterola je vršeno empirijski, računanjem pomoću Friedewald-ove formule. Za računanje LDL holesterola putem ove formule korišćeno su dobijene vrednosti ukupnog holesterola, HDL holesterola i ukupnih triglicerida. Indeks ateroskleroze je dobijen iz odnosa LDL holesterola i HDL holesterola (Spasić S., 2003; Majkić-Sing N., 1995).

Friedewald-ova formula: $LDL \text{ (mmol/L)} \approx \text{ukupni holesterol} - HDL - 0.45 \times \text{ukupni trigliceridi}$

- Parametri jetrene funkcije

Katalitička koncentracija aspartat aminotransferaze u serumu životinja je merena metodom IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine). U reakciji transaminacije, između L-Aspartata i 2-ketoglutarata nastaje oksalacetat. Oksalacetat u sledećoj, indikatorskoj reakciji, katalizovanoj od strane malat dehidrogenaze, oksiduje NADH. U ovoj metodi promena brzine oksidacije NADH u indikatorskoj reakciji je proporcionalna koncentraciji AST (Spasić S., 2003; Majkić-Sing N., 1995).

Katalitička koncentracija alanin aminotransferaze u serumu životinja je merena metodom IFCC. U reakciji transaminacije, između L-Alanina i 2-oksoglutarata nastaje piruvat. Piruvat u sledećoj, indikatorskoj reakciji, katalizovanoj od strane laktat dehidrogenaze, oksiduje NADH. U ovoj metodi promena brzine oksidacije NADH u indikatorskoj reakciji je proporcionalna koncentraciji ALT (Spasić S., 2003; Majkić-Sing N., 1995).

- Parametri bubrežne funkcije

Koncentracija uree u serumu životinja je određivana metodom GLDH-UV. U prvoj reakciji urea, pod uticajem enzima ureaze, hidrolizuje na amonijak i ugljen-dioksid. U indikatorskoj reakciji formirani amonijumovi joni reaguju sa α -ketoglutaratom, u reakciji katalizovanoj od strane glutamat dehidrogenaze (GLDH), gde istovremeno dolazi do oksidacije NADH. Smanjenje koncentracije NADH je direktno proporcionalno sa koncentracijom uree u uzorku (Spasić S., 2003).

Koncentracija kreatinina u serumu životinja je određivana metodom Jaffe. U reakciji kreatinina sa alkalnim pikratom nastaje Janovski kompleks, koji je crvenonarandžaste boje. Merenjem apsorbance je određena koncentracija kreatinina (Spasić S., 2003).

4.6. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti

- *In vitro* antioksidativna aktivnost

Prvi deo ispitivanja antioksidativne aktivnosti komercijalnog preparata gljive *Coprinus comatus* je podrazumevao nekoliko *in vitro* ispitivanja, a to su: određivanje antioksidativnog kapaciteta metodom DPPH, određivanje sadržaja ukupnih fenola (TPC – total phenolic content) i određivanje redoks kapaciteta ekstrakta metodom FRAP (Ferric reducing ability of plasma-extract). Da bi navedena ispitivanja bila moguća, napravljen je metanolni ekstrakt komercijalnog preparata gljive *Coprinus comatus*.

- Priprema ekstrakta

Komercijalni preparat, koji predstavlja 100-procentni, fino usitnjeni prašak osušene cele gljive *Coprinus comatus*, uzet je za ekstrakciju pomoću Soxhlet-ovog ekstraktora. Ekstrakcija pomoću Soxhlet-ovog ekstraktora je rađena tako što je u aparat stavljena čaura od filter-papira sa 7 grama praška gljive, a kao rastvarač je korišćen metanol. Ekstrakcija je vršena 5 sati, a zatim je dobijeni metanolni ekstrakt evaporisan na 40°C kako bi se dobio suvi ekstrakt bez metanola. Nakon toga suvi ekstrakt je čuvan na temperaturi od +4°C sve do momenta ispitivanja antioksidativne aktivnosti.

- Određivanje antioksidativnog kapaciteta

Sposobnost hvatanja slobodnih radikala utvrđivana je nakon reakcije sa 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) reagensom (Brand-Williams W., 1995). U epruvete je dodato po 1 ml DPPH rastvora (90 μM – metanolni), pomešano sa 20 do 400 μl uzorka i razblaženo do 4 ml 80% metanolom. Slepa proba je pripremljena dodatkom 1 ml radnog rastvora DPPH u 3 ml metanola. Procenat inaktivacije DPPH radikala je meren nakon 60 minuta na 515 nm. Za svaki koncentracioni nivo izračunat je kapacitet hvatanja slobodnih radikala (radical scavenging capacity – RSC) preko formule: $RSC = 100 - 100 * A_{ekstrakta} / A_{slepe\ probe}$, gde je $A_{ekstrakta}$ apsorbanca analiziranih uzoraka, a $A_{slepe\ probe}$ apsorbanca slepe probe. Zatim je konstruisana

kriva zavisnosti RSC vrednosti od koncentracije ekstrakata, i na osnovu jednačine prave izračunata je inhibitorna koncentracija (inhibitory concentration – IC₅₀) u mg/ml koja predstavlja koncentraciju ekstrakta potrebnu da inaktivira 50% DPPH slobodnog radikala, tj. da postigne vrednost RSC od 50%. Kao standard (kontrola) korišćen je α -tokoferol (vitamin E).

- Određivanje sadržaja ukupnih fenola (TPC – total phenolic content)

Sadržaj ukupnih fenola određivan je pomoću metode Folin–Ciocalteu uz upotrebu galne kiseline kao referentnog standarda (Kroyer G. T., 2004; Hagerman A., 2000). Uzorak (0,1 ml) i Folin–Ciocalteu reagens (0,5 ml) su dodati u epruvetu i promešani 6 sekundi na vorteksu. Nakon 6 minuta, dodato je 0,4 ml 7,5% rastvora Na₂CO₃, i ponovo promešano. Paralelno su pripremani i slepa proba i standardi. Posle 120 minuta stajanja na tamnom mestu merena je apsorbanca na 740 nm. Za dalja računanja je uzimana srednja vrednost tri uzastopna merenja apsorbanca. Rezultati su izraženi preko ekvivalenata galne kiseline po gramu uzorka (mg GAE/g), korišćenjem prethodno konstruisane kalibracione krive standarda galne kiseline.

- Određivanje redoks kapaciteta ekstrakata metodom FRAP

Redukujuća sposobnost metanolnog ekstrakta gljive je određivana prema metodi opisanoj u radu Sarikurkcua i saradnika (Sarikurkcua C., 2010). Prvo su napravljeni metanolni rastvori suvog ekstrakta u rastućim koncentracijama od 1 mg/ml do 10 mg/ml kojima je zatim dodato 2,5 ml 200 mM natrijum-fosfatnog pufera (pH 6.6) i 2,5 ml 1% kalijum fericitjanida. Reakciona smeša je zagrevana na 50°C 20 minuta i onda je dodato 2,5 ml 10% trihlorsirćetne kiseline. Dobijena smeša je zatim centrifugirana na 1000 obrtaja tokom 10 minuta na centrifugi Sigma 2-5 (Sigma, Nemačka). Nakon centrifugiranja gornji sloj (2,5 ml) je uzet i pomešan sa 2,5 ml dejonizovane vode i 0,5 ml 0,1% gvožđe(III) hlorida, da bi se dobio rastvor zelenoplave boje. Apsorbansa dobijenog rastvora je određivana na 700 nm. Kao kontrola je korišćen α -tokoferol.

Supstance i reagensi korišćeni u radu:

- metanol HPLC čistoće, min. 99,8% – J. T. Baker (Deventer, Holandija);

- anhidrovani natrijum-karbonat, min. 99,5% – Sinex laboratory (Beograd, Srbija);
- Folin Ciocalteu fenolni reagens – Fluka Biochemika (Buhs, Švajcarska);
- galna kiselina, 99% – Alfa Aesar Lancaster Synthesis (SAD);
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal – Sigma Aldrich (Štajnhajm, Nemačka);
- kalijum-fericijanid – Centrohem (Stara Pazova, Srbija);
- trihlorsirćetna kiselina – Merck (Darmštad, Nemačka);
- gvožđe(III) hlorid – Centrohem (Stara Pazova, Srbija);
- α -tokoferol – Sigma Aldrich (Štajnhajm, Nemačka).

Za određivanje apsorbance svih dobijenih rastvora korišćen je UV/Vis spektrofotometar – Agilent 8453 (Santa Klara, SAD).

- *In vivo* antioksidativna aktivnost

Za drugi deo ispitivanja antioksidativne aktivnosti komercijalnog preparata gljive *Coprinus comatus* eksperimentalnim životinjama je primenjena izrazito prooksidativna supstanca, ugljen-tetrahlorid. Ugljen-tetrahlorid, pripremljen kao 50% uljani rastvor u maslinovom ulju, primenjen je intraperitonealno (i.p.) u dozi od 2 mL/kg. Životinje su dobijale ugljen-tetrahlorid 2 sata posle poslednje doze vodene suspenzije gljive ili fiziološkog rasvora. Dvadeset četiri sata nakon primene ugljen-tetrahlorida vršeno je žrtvovanje. Nakon žrtvovanja životinjama je uziman 1 g jetre radi određivanja pokazatelja oksidativnog stresa.

Od uzetog tkiva napravljen je homogenat koristeći električni homogenizator tipa B. Braun, Potter S (Melsungen, Nemačka). Homogenat jetre je pripreman sa TRIS-HCL puferom (pH=7,4), u odnosu 1 : 3 (jedan deo jetre : 3 dela pufera) na temperaturi od 4°C.

Određivanje parametara oksidativnog stresa u homogenatu tkiva je vršeno spektrofotometrom Agilent 8453 UV/Vis (Santa Klara, SAD) prema procedurama opisanim u literaturi. Od parametara oksidativnog stresa procenjuvani su:

- koncentracija ukupnih proteina jetre, koja je bila neophodna za određivanje koncentracije svih drugih parametara (Gornall H. G., 1949);
- intenzitet lipidne peroksidacije (LPx), metodom određivanja koncentracije razgradnih produkata peroksidacije nezasićenih masnih kiselina koje ulaze u sastav membrana

ćelija (Buege A. J., 1978);

- aktivnost enzima ksantin-oksidge (XOD) (Bergmayer U. H., 1970);
- koncentracija redukovanog glutationa (GSH) (Kapetanović I. M., 1979);
- aktivnost enzima glutation-peroksidaze (GSHPx) (Chin P. T. Y., 1976);
- aktivnost enzima glutation reduktaze (GSHR) (Glatzle D., 1974);
- aktivnost enzima katalaze (CAT) (Beers R. F. J., 1952).

4.7. Morfološka ispitivanja

Nakon ųrtvovanja i kompletne obdukcije, isećci bubrega, jetre i pankreasa su izdvojeni i fiksirani u Bujenovom fiksativu na 4°C tokom 24h. Potom je izvršena dehidracija tkiva rastućim koncentracijama izopropanola, kalupljenje u parafin i sećenje na rotacionom mikrotomu marke Leica pri debljini od 5µm. Od uzoraka pankreasa, jetre i bubrega uzet je po jedan presek organa svake ispitivane jedinke. Tkivo jetre i bubrega bojeno je standardnom hematoksilin i eozin metodom, a pankreasno tkivo imunohistohemijskom metodom.

U imunohistohemijskom bojenju tkiva korišćena su primarna antitela **insulin Ab-6** (Lab Vision – Thermo scientific) i sistem za vizuelizaciju – UltraVision LP Detection System HRP Polymer & AEC Chromogen (Lab Vision – Thermo scientific). Nakon rehidracije isećaka („dovođenja do vode“), isti su podvrgnuti „retrival“ reakciji koja je podrazumevala zagrevanje isećaka u citratnom puferu (pH 6,0) na 850W u mikrotalasnoj peći tokom 20 minuta, nakon čega je usledilo hlaćenje preparata u trajanju od 30 minuta. Po završetku hlaćenja isećci su isprani četiri puta u puferu (TBS, pH7,4) i potom u cilju otklanjanja nespecifičnog pozadinskog bojenja inkubirani 10–15 minuta u Hydrogen Peroxide Block (Lab Vision, TA-015-HP), zatim isprani četiri puta u puferu i inkubirani pet minuta u Ultra V Block (Lab Vision TA-015-UB). Po ispiranju u puferu aplikovano je primarno antitelo (insulin – ready to use) u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Isećci su potom podvrgnuti tretmanu Primary Antibody Enhancer (Lab Vision, TL-015-PB) u trajanju od 20 minuta. Nakon ispiranja puferom isećci su trideset minuta podvrgnuti HRP Polymer-u (Lab Vision, TL-015-PH). Vizuelizacija je izvršena primenom AEC Chromogen-a (Lab Vision, TA-015-SA).

Bojenje i kontrastiranje bazofilnih struktura izvršeno je primenom Mayer-ovog hematoksilina, a preparati su montirani upotrebom adheziva na vodenoj bazi (Bio-Optica).

Preparati su analizirani na mikroskopu marke Leica DM LB pri uveličanju objektiva od 10, 20, 40, 63 i 100 puta i okulara od 10 puta, i fotografisani kamerom marke Leica DC 100.

4.8. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada dobijenih rezultata ispitivanja je rađena statističkim programom IBM SPSS Statistics, verzija 21. Kao mera centralne tendencije neke grupe korišćena je aritmetička sredina (\bar{x}), a mera varijacije među podacima izražena je standardnom devijacijom (δ). Statistička značajnost razlika određenih grupa je ispitivana Student t-testom za zavisne uzorke, odnosno analizom varijanse sa jednim promenljivim faktorom (jednosmerna ANOVA za istovremeno poređenje više uzoraka) ili testom Kruskal–Wallis. *Post hoc* testiranje nakon jednosmerne ANOVA je rađeno Tukey-evim metodom, a nakon testa Kruskal–Wallis *post hoc* testiranje je rađeno testom Mann-Whitney. Statističke hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti (alfa nivo) od 0,05. Stepem zavisnosti pojava među uzorcima određivan je koeficijentom linearne korelacije (r), ili regresionom analizom. Rezultati korelacione analize su opisivani samo u slučaju da postoji statistička značajnost pojave. Rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički.

5. REZULTATI

5.1. FARMAKODINAMSKA ISPITIVANJA

5.1.1. Vrednosti telesne mase

Tabela 1. Vrednosti telesne mase na početku (TM Start – g, $\bar{X} \pm SD$), nakon završetka tretmana (TM Kraj – g, $\bar{X} \pm SD$), kao i promena telesne mase u posmatranom periodu (ΔTM – g, $\bar{X} \pm SD$) pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 (Com3) g/kg per os tokom 7 dana.

Grupa	TM Start	TM Kraj	ΔTM
KON	222,67±45,82	253,83±43,58 ^x	31,17±10,28
Com1	257,60±13,81	288±14,42 ^x	30,40±3,97
Com2	237,33±55,12	263,33±42,80 ^x	26±15,14
Com3	356,20±37,85	365,20±36,04	9±9,33 ^{y,z}

^xp<0,01 u odnosu na početnu telesnu masu iste grupe (TM Start)

^yp<0,05 u odnosu na KON

^zp<0,05 u odnosu na Com1

Primenom Student-ovog T-testa za zavisne uzorke je utvrđeno da postoji statistički značajno povećanje telesne mase na kraju, u odnosu na telesnu masu pre 7-dnevnog tretmana: fiziološkim rastvorom (t=-6,947, p=0,001) i gljivom *C. comatus* u dozama od 0,835 g/kg (t=-17,101, p=0,001) i 1,67 g/kg (t=-4,207, p=0,008). U **tabeli 1** se uočava da postoji statistički značajna razlika u promeni telesne mase između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana (F=4,355, p=0,018). Promena telesne mase je statistički značajno manja u grupi tretiranoj gljivom u dozi od 3,34 g/kg u odnosu na kontrolnu grupu i grupu koja je dobijala gljivu u dozi od 0,835 g/kg. Ispitivanjem povezanosti primenjene doze gljive *C. comatus* sa promenom telesne mase eksperimentalnih životinja uočeno je da postoji jaka negativna korelacija ta dva posmatrana parametra (r=-0,954, p = 0,046).

Tabela 2. Vrednosti telesne mase na početku (TM Start – g, $\bar{X} \pm SD$), nakon završetka tretmana (TM Kraj – g, $\bar{X} \pm SD$), kao i promena telesne mase u posmatranom periodu (ΔTM – g, $\bar{X} \pm SD$) pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 (Com3) g/kg per os tokom 21 dana.

Grupa	TM Start	TM Kraj	ΔTM
KON	225,80±18,31	307,80±15,71 ^x	82±10,10
Com1	258,67±29,06	349,50±46,16 ^x	90,83±18,53
Com2	249,67±20,67	335,50±53,44 ^x	85,83±39,95
Com3	265,50±31,14	347,17±53,96 ^x	81,67±23,89

^xp<0,01 u odnosu na početnu telesnu masu iste grupe (TM Start)

Primenom Student-ovog T-testa za zavisne uzorke je utvrđeno da postoji statistički značajno povećanje telesne mase na kraju, u odnosu na telesnu masu pre tronedeljnog tretmana fiziološkim rastvorom (t=-8,433, p=0,001), i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg (t=-12,007, p=0,001), 1,67 g/kg (t=-5,263, p=0,003) i 3,34 g/kg (t=-8,374, p=0,001). U **tabeli 2** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika u promeni telesne mase između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana (F=0,156, p=0,925).

Tabela 3. Vrednosti telesne mase na početku (TM Start – g, $\bar{X} \pm SD$), nakon završetka tretmana (TM Kraj – g, $\bar{X} \pm SD$), kao i promena telesne mase u posmatranom periodu (ΔTM – g, $\bar{X} \pm SD$) pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 (Com3) g/kg per os tokom 42 dana.

Grupa	TM Start	TM Kraj	ΔTM
KON	267,20±59,38	356,20±43,95 ^x	89±40,37
Com1	274,17±5,81	345,83±43,61 ^x	71,67±41,65
Com2	295,17±13,48	361,50±30,45 ^x	66,33±24,48
Com3	272,83±26,09	338,50±34,34 ^x	65,67±13,11

^xp<0,01 u odnosu na početnu telesnu masu iste grupe (TM Start)

Primenom Student-ovog T-testa za zavisne uzorke je utvrđeno da postoji statistički značajno povećanje telesne mase na kraju, u odnosu na telesnu masu pre šestonedeljnog tretmana fiziološkim rastvorom (t=-4,929, p=0,008) i gljivom *C. comatus* u dozama od 0,835 g/kg (t=-4,215, p=0,008), 1,67 g/kg (t=-6,636, p=0,001) i 3,34 g/kg (t=-12,643, p=0,001). U **tabeli 3** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika u promeni telesne mase između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana (F=0,574, p=0,639).

Tabela 4. Vrednosti telesne mase na početku (TM Start – g, $\bar{X} \pm SD$), nakon završetka tretmana (TM Kraj – g, $\bar{X} \pm SD$), kao i promena telesne mase u posmatranom periodu (ΔTM – g, $\bar{X} \pm SD$) pacova tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (ALO), kao i kombinacijom aloksana i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 (Com3) g/kg per os tokom 7 dana.

Grupa	TM Start	TM Kraj	ΔTM
ALO	204±28,25	204,43±38,93	0,43±12,97
ALO+Com1	253±16,35	266,83±25,47	13,83±18,96
ALO+Com2	213,86±24,18	212,29±29,19	-1,57±10,47
ALO+Com3	345±36,42	338,75±32,56	-6,25±7,89

Primenom Student-ovog T-testa za zavisne uzorke je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika između vrednosti početnih i krajnjih telesnih masa ispitivanih grupa eksperimentalnih životinja. U **tabeli 4** se takođe uočava da ne postoji statistički značajna razlika u promeni telesne mase između ispitivanih grupa tokom 7-dnevnog tretmana ($F=2,226$, $p=0,117$).

Tabela 5. Vrednosti telesne mase na početku (TM Start – g, $\bar{X} \pm SD$), nakon završetka tretmana (TM Kraj – g, $\bar{X} \pm SD$), kao i promena telesne mase u posmatranom periodu (ΔTM – g, $\bar{X} \pm SD$) pacova tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (ALO), kao i kombinacijom aloksana i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 (Com3) g/kg per os tokom 21 dana.

Grupa	TM Start	TM Kraj	ΔTM
ALO	214,17±10,50	256,83±17,27 ^x	42,67±20,76
ALO+Com1	263,17±28,37	355,67±64,28 ^x	92,50±36,48
ALO+Com2	261,83±4,62	318,50±44,22 ^y	56,67±44,98
ALO+Com3	263,67±26,19	337,50±65,14 ^x	73,83±40,17

^x $p<0,01$ u odnosu na početnu telesnu masu iste grupe (TM Start)

^y $p<0,05$ u odnosu na početnu telesnu masu iste grupe (TM Start)

U **tabeli 5** se uočava da postoji statistički značajna razlika između vrednosti početne i krajnje telesne mase grupa koje su dobile aloksan, a zatim fiziološki rastvor 21 dan ($t=-5,034$, $p=0,004$) i koje su dobile aloksan, a zatim gljivu *C. comatus* 21 dan u dozi od 0,835 g/kg ($t=-6,211$, $p=0,002$), 1,67 g/kg ($t=-3,086$, $p=0,027$) i 3,34 g/kg ($t=-4,502$, $p=0,006$). Iako je u grupama koje su nakon aloksana tretirane gljivom *C. comatus* došlo do izraženijeg povećanja telesne mase u odnosu na grupu tretiranu samo aloksanom, nije utvrđena statistički značajna

razlika u promeni telesne mase između ispitivanih grupa tokom 21-dnevnog tretmana ($F=2,066$, $p=0,137$).

Tabela 6. Vrednosti telesne mase na početku (TM Start – g, $\bar{X} \pm SD$), nakon završetka tretmana (TM Kraj – g, $\bar{X} \pm SD$), kao i promena telesne mase u posmatranom periodu (ΔTM – g, $\bar{X} \pm SD$) pacova tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (ALO), kao i kombinacijom aloksana i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 (Com3) g/kg per os tokom 42 dana.

Grupa	TM Start	TM Kraj	ΔTM
ALO	268,50±13,71	277,17±62,54	8,67±51,31
ALO+Com1	283,67±21,73	277±8,89	-6,67±30,55
ALO+Com2	287,17±25,69	297±75,77	9,83±67,77
ALO+Com3	272,80±28,62	302,20±106,04	29,40±89,92

U **tabeli 6** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika između vrednosti početne i krajnje telesne mase eksperimentalnih životinja. Iako je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u promeni telesne mase između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana ($F=0,449$, $p=0,721$), u grupi životinja tretiranih aloksanom i potom 42 dana gljivom *C. comatus* u dozi od 3,34 g/kg, porast telesne mase je bio najizraženiji. Nasuprot tome, u grupi tretiranoj aloksanom i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg došlo je do smanjenja telesne mase za 6,67±30,55 g.

Tabela 7. Vrednosti telesne mase na početku (TM Start – g, $\bar{X} \pm SD$), nakon završetka tretmana (TM Kraj – g, $\bar{X} \pm SD$), kao i promena telesne mase u posmatranom periodu (ΔTM – g, $\bar{X} \pm SD$) pacova tretiranih ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg intraperitonealno (UTH), kao i kombinacijom ugljen-tetrahlorida i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 (Com3) g/kg per os tokom 7 dana.

Grupa	TM Start	TM Kraj	ΔTM
UTH	274,50±42,50	275,50±39,55	1±9,47
UTH+Com1	220,60±29,10	247,20±26,13 ^x	26,60±13,97 ^y
UTH+Com2	275,67±36,31	277±25,42	1,33±11,93
UTH+Com3	335,80±45,91	337,40±50,48	1,60±5,73

^x $p<0,05$ u odnosu na početnu telesnu masu iste grupe (TM Start)

^y $p<0,01$ u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe

U **tabeli 7** se uočava da postoji statistički značajna razlika između vrednosti početne i krajnje telesne mase grupe koja je dobila ugljen-tetrahlorid, nakon 7-dnevnog tretmana gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg ($t=-4,256$, $p=0,013$) i 3,34 g/kg ($t=-3,670$, $p=0,021$). Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u promeni telesne mase između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana ($F=10,257$, $p<0,001$). Razlika u promeni telesne mase je statistički značajna poredeći grupu koja je pre aplikacije dobijala 7 dana gljivu *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg sa svim drugim eksperimentalnim grupama.

Tabela 8. Vrednosti telesne mase na početku (TM Start – g, $\bar{X} \pm SD$), nakon završetka tretmana (TM Kraj – g, $\bar{X} \pm SD$), kao i promena telesne mase u posmatranom periodu (ΔTM – g, $\bar{X} \pm SD$) pacova tretiranih ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg intraperitonealno (UTH), kao i kombinacijom ugljen-tetrahlorida i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 (Com3) g/kg per os tokom 21 dana.

Grupa	TM Start	TM Kraj	ΔTM
UTH	292,50±14,48	290,50±19,67	-2±10,36
UTH+Com1	253±39,21	307,67±49,03 ^x	54,67±11,36 ^y
UTH+Com2	237,33±29,32	330,83±58,62 ^x	93,50±30,24 ^{y,z}
UTH+Com3	274,33±32,45	339,33±42,37 ^x	65±12,02 ^y

^x $p<0,01$ u odnosu na početnu telesnu masu iste grupe (TM Start)

^y $p<0,05$ u odnosu na UTH

^z $p<0,05$ u odnosu na UTH+Com1

U **tabeli 8** se uočava da postoji statistički značajna razlika između vrednosti početne i krajnje telesne mase grupa koje su nakon ugljen-tetrahlorida dobijale 21 dan gljivu *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg ($t=-11,787$, $p=0,001$), 1,67 g/kg ($t=-7,573$, $DF=5$, $p=0,001$) i 3,34 g/kg ($t=-13,250$, $DF=5$, $p=0,001$).

Sve eksperimentalne grupe koje su pre ugljen-tetrahlorida dobijale gljivu *C. comatus* 21 dan imale su statistički značajan porast telesne mase u odnosu na grupu koja je pre ugljen-tetrahlorida dobijala fiziološki rastvor ($F=15,101$, $p=0,002$). Takođe razlika u promeni telesne mase je statistički značajna i između grupa UTHCom1 i UTHCom2.

Tabela 9. Vrednosti telesne mase na početku (TM Start – g, $\bar{X} \pm SD$), nakon završetka tretmana (TM Kraj – g, $\bar{X} \pm SD$), kao i promena telesne mase u posmatranom periodu (ΔTM – g, $\bar{X} \pm SD$) pacova tretiranih ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg intraperitonealno (UTH), kao i kombinacijom ugljen-tetrahlorida i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 (Com3) g/kg per os tokom 42 dana.

Grupa	TM Start	TM Kraj	ΔTM
UTH	368±71,86	372±83,62	4±14,93
UTH+Com1	297,50±27,87	370,25±25,94 ^x	72,75±20,58 ^y
UTH+Com2	264,25±33,24	333,25±57,24 ^x	69±26,05 ^y
UTH+Com3	269,60±30,76	341±52,74 ^x	71,40±23,29 ^y

^xp<0,01 u odnosu na početnu telesnu masu iste grupe (TM Start)

^yp<0,01 u odnosu na UTH

U **tabeli 9** se uočava da postoji statistički značajna razlika između vrednosti početne i krajnje telesne mase grupa koje su nakon ugljen-tetrahlorida dobijale 42 dana gljivu *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg (t=-7,070, p=0,006), 1,67 g/kg (t=-5,297, p=0,009) i 3,34 g/kg (t=-6,856, p=0,002).

Sve eksperimentalne grupe koje su pre ugljen-tetrahlorida dobijale gljivu *C. comatus* 42 dana imale su statistički značajan porast telesne mase (ΔTM) u odnosu na grupu koja je pre ugljen-tetrahlorida dobijala fiziološki rastvor (F=7,427, p=0,005).

5.1.2. Aloksanski dijabetes

Tabela 10. Vrednosti šećera u krvi pre davanja aloksana (SUKpre – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$), 48 sati nakon davanja aloksana (SUK0 – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) i poslednjeg dana ogleda (SUKkraj – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$), kao i površine ispod krive vrednosti šećera u krvi tokom posmatranog perioda (AUC, mmol/L x dan, $\bar{X} \pm SD$) pacova tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (ALO), kao i kombinacijom aloksana i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 (Com3) g/kg per os tokom 7 dana.

Grupa	SUKpre	SUK0	SUKkraj	AUC
ALO	6,31±0,43	20,86±8,88	6,96±2,14	124,52±46,85
ALO+Com1	6,60±0,37	21,63±5,90	9,52±3,57	137,59±33,36
ALO+Com2	6,39±0,54	25,96±5,88	6,77±1,79	146,89±30,41
ALO+Com3	6,97±0,51	29,42±6,91	7,62±1,13	166,07±33,45

U **tabeli 10** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa u koncentraciji šećera u krvi životinja pre primene aloksana (SUKpre; F=1,977, p=0,150), 48 sati posle primene aloksana (SUK0; F=1,651, p=0,209), nakon 7-dnevnog tretmana (SUKkraj; F=1,731, p=0,193) i vrednosti površine ispod krive (AUC; F=1,140, p=0,357). Takođe se zapaža da je koncentracija šećera u krvi pre primene aloksana i nakon 7-dnevnog tretmana, kao i vrednost površine ispod krive najniža u grupi koja je nakon primene aloksana dobijala 7 dana fiziološki rastvor, a najviša u grupi koja je nakon aloksana tretirana 7 dana gljivom *C. comatus* u dozi od 3,34 g/kg.

Tabela 11. Vrednosti šećera u krvi pre davanja aloksana (SUKpre – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$), 48 sati nakon davanja aloksana (SUK0 – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) i poslednjeg dana ogleđa (SUKkraj – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$), kao i površine ispod krive vrednosti šećera u krvi tokom posmatranog perioda (AUC, mmol/L x dan, $\bar{X} \pm SD$) pacova tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (ALO), kao i kombinacijom aloksana i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 (Com3) g/kg per os tokom 21 dana.

Grupa	SUKpre	SUK0	SUKkraj	AUC
ALO	6,80±0,39	25,45±6,82	18,32±9,64	502,88±174,63
ALO+Com1	6,60±0,77	27,40±0,86	9,37±6,49 ^x	303,97±141,85 ^{x,y}
ALO+Com2	6,80±0,36	26,50±8,70	15,97±7,06	467,30±155,82
ALO+Com3	6,98±0,29	27,27±2,33	7,88±1,90 ^x	304,74±96,75 ^{x,y}

^xp<0,05 u odnosu na ALO

^yp<0,05 u odnosu na ALO+Com2

U **tabeli 11** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa u koncentraciji šećera u krvi životinja pre primene aloksana (SUKpre; F=0,617, p=0,612) i 48 sati nakon primene aloksana (SUK0; Hi kvadrat=1,023, p=0,796). Statistički značajna razlika postoji u koncentraciji šećera u krvi životinja nakon tronedelnog tretmana (SUKkraj; Hi kvadrat=10,436, p=0,015) i vrednostima površine ispod krive (AUC; Hi kvadrat=9,893, p=0,020). Statistički značajno niža koncentracija šećera u krvi je bila u grupama životinja koje su dobijale nakon aloksana 21 dan gljivu *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg i 3,34 g/kg u odnosu na grupu koja je nakon aloksana 3 nedelje dobijala fiziološki rastvor.

Vrednosti površine ispod krive su statistički značajno manje u grupama životinja koje su dobijale nakon aloksana 21 dan gljivu *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg i 3,34 g/kg u odnosu na grupu koja je nakon aloksana 3 nedelje dobijala fiziološki rastvor i gljivu *C. comatus* u dozi od 1,67 g/kg.

Tabela 12. Vrednosti šećera u krvi pre davanja aloksana (SUKpre – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$), 48 sati nakon davanja aloksana (SUK0 – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) i poslednjeg dana ogleđa (SUKkraj – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$), kao i površine ispod krive vrednosti šećera u krvi tokom posmatranog perioda (AUC, mmol/L x dan, $\bar{X} \pm SD$) pacova tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (ALO), kao i kombinacijom aloksana i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 (Com3) g/kg per os tokom 42 dana.

Grupa	SUKpre	SUK0	SUKkraj	AUC
ALO	7,62±1,30	32,85±1,10	24,67±8,64	1160,17±180,90
ALO+Com1	8,20±0,95	33,30±0,00	24,37±1,65	1126,03±95,89
ALO+Com2	7,83±0,73	31,18±3,30	16,98±8,99	916,58±422,54
ALO+Com3	7,00±0,36	28,64±6,47	11,36±6,05 ^{x,y}	720,52±441,32

^xp<0,05 u odnosu na ALO

^yp<0,05 u odnosu na ALO+Com1

U **tabeli 12** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa u koncentraciji šećera u krvi životinja pre primene aloksana (SUKpre; F=1,277, p=0,316) i 48 sati nakon primene aloksana (SUK0; Hi kvadrat=2,548, p=0,467), kao i u vrednostima površine ispod krive (AUC; Hi kvadrat=2,157, p=0,540). Statistički značajna razlika postoji u koncentraciji šećera u krvi životinja nakon šestonedelnog tretmana (SUKkraj; Hi kvadrat=8,843, p=0,031). Statistički značajno niža koncentracija šećera u krvi je bila u grupama životinja koje su dobijale nakon aloksana 42 dana gljivu *C. comatus* u dozi od 3,34 g/kg u odnosu na grupu koja je nakon aloksana 6 nedelja dobijala fiziološki rastvor i gljivu *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg.

Ispitivanjem povezanosti primenjene doze gljive *C. comatus* sa vrednostima površine ispod krive uočeno je da postoji jaka negativna korelacija ta dva posmatrana parametra (r=-0,979, p = 0,021).

5.1.3. Test oralnog podnošenja glukoze

Tabela 13. Vrednosti šećera u krvi pre tretmana (SUKpre – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) i poslednjeg dana tretmana (SUKkraj – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$), kao i šećera u krvi nakon testa oralnog podnošenja glukoze (SUKOGTT – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) i površine ispod krive vrednosti šećera u krvi tokom posmatranog perioda (AUC, mmol/L x dan, $\bar{X} \pm SD$) pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7 dana.

Grupa	SUKpre	SUKkraj	SUKOGTT	AUC
KON	6,60±0,41	6,62±0,35	8,07±0,62	53,60±2,28
Com1	6,20±0,53	7,38±0,52	8,98±0,49	55,71±3,09
Com2	6,63±0,45	6,83±0,27	8,27±0,73	54,68±2,06
Com3	6,76±0,40	6,86±0,53	8,00±0,62	55,10±3,15

U **tabeli 13** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa u vrednostima šećera u krvi pre tretmana (SUKpre; F=1,472, p=0,256), nakon 7-dnevnog tretmana (SUKkraj; F=3,126, p=0,052), nakon testa oralnog podnošenja glukoze (SUKOGTT; F=2,607, p=0,083) i površine ispod krive (AUC; F=0,630, p=0,605).

Tabela 14. Vrednosti šećera u krvi pre tretmana (SUKpre – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) i poslednjeg dana tretmana (SUKkraj – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$), kao i šećera u krvi nakon testa oralnog podnošenja glukoze (SUKOGTT – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) i površine ispod krive vrednosti šećera u krvi tokom posmatranog perioda (AUC, mmol/L x dan, $\bar{X} \pm SD$) pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 21 dana.

Grupa	SUKpre	SUKkraj	SUKOGTT	AUC
KON	6,90±0,36	6,67±0,41	8,85±0,47	152,40±6,43
Com1	6,67±0,80	6,67±0,41	7,43±0,34 ^x	148,33±6,98
Com2	6,42±0,64	6,68±0,59	7,77±0,33 ^y	140,11±4,13 ^z
Com3	6,47±0,42	6,60±0,40	7,48±0,42 ^x	144,47±7,31

^xp<0,001 u odnosu na KON

^yp<0,01 u odnosu na KON

^zp<0,05 u odnosu na KON

U **tabeli 14** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa u vrednostima šećera u krvi pre tretmana (SUKpre; F=0,638, p=0,600) i nakon 21-dnevnog tretmana (SUKkraj; F=0,039, p=0,989).

Tronedeljni tretman gljivom *C. comatus* u sve tri doze je uspeo da statistički značajno spreči porast koncentracije šećera u krvi eksperimentalnih životinja u odnosu na vrednosti kontrolne grupe, koja je u istom vremenskom intervalu dobijala samo fiziološki rastvor (SUKOGTT; F=13,113, p<0,001). Mada su vrednosti površine ispod krive manje u sve tri eksperimentalne grupe koje su tretirane gljivom, statistički značajna razlika postoji samo u vrednostima površine ispod krive (AUC; F=3,479, p=0,038) između kontrolne grupe i grupe koja je 21 dan dobijala gljivu *C. comatus* u dozi od 1,67 g/kg.

Tabela 15. Vrednosti šećera u krvi pre tretmana (SUKpre – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) i poslednjeg dana tretmana (SUKkraj – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$), kao i šećera u krvi nakon testa oralnog podnošenja glukoze (SUKOGTT – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) i površine ispod krive vrednosti šećera u krvi tokom posmatranog perioda (AUC, mmol/L x dan, $\bar{X} \pm SD$) pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 42 dana.

Grupa	SUKpre	SUKkraj	SUKOGTT	AUC
KON	7,50±0,56	6,10±0,26	7,77±0,51	275,73±8,68
Com1	7,60±1,10	6,25±0,29	7,80±0,28	272,50±4,09
Com2	7,47±0,56	6,65±0,45	7,10±0,47	282,06±6,84
Com3	7,30±0,37	6,26±0,23	7,92±0,49	281,77±2,78

U **tabeli 15** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa u vrednostima šećera u krvi pre tretmana (SUKpre; F=0,147, p=0,930), nakon 42-dnevnog tretmana (SUKkraj; F=2,040, p=0,162), nakon testa oralnog podnošenja glukoze (SUKOGTT; F=2,871, p=0,081) i površine ispod krive (AUC; F=2,912, p=0,078).

5.1.4. Adrenalinski test

Tabela 16. Vrednosti šećera u krvi pre tretmana (SUKpre – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) i poslednjeg dana tretmana (SUKkraj – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$), kao i šećera u krvi nakon adrenalinskog testa (SUKADR – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) i površine ispod krive vrednosti šećera u krvi tokom posmatranog perioda (AUC, mmol/L x dan, $\bar{X} \pm SD$) pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7 dana.

Grupa	SUKpre	SUKkraj	SUKADR	AUC
KON	6,43±0,70	6,92±0,32	13,05±1,03	56,71±2,74
Com1	6,68±0,50	7,45±0,33	15,77±0,98 ^x	61,07±2,04
Com2	6,65±0,37	7,33±0,60	14,72±0,84 ^x	59,97±2,61
Com3	6,76±0,36	6,78±0,43	15,36±1,97	58,46±3,13

^xp<0,05 u odnosu na KON

U **tabeli 16** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana u vrednostima šećera u krvi pre tretmana (SUKpre; F=0,433, p=0,732), nakon 7-dnevnog tretmana (SUKkraj; F=3,105, p=0,051) i površine ispod krive (AUC; F=3,097, p=0,051).

Primenom testa Kruskal–Wallis je utvrđeno da postoje statistički značajne razlike između ispitivanih grupa u vrednosti šećera u krvi nakon adrenalinskog testa (SUKADR; Hi kvadrat=10,843, p=0,013). Statistički značajno niže vrednosti glikemije su određene životinjama u kontrolnoj grupi u odnosu na grupe tretirane gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg i 1,67 g/kg.

Tabela 17. Vrednosti šećera u krvi pre tretmana (SUKpre – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) i poslednjeg dana tretmana (SUKkraj – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$), kao i šećera u krvi nakon adrenalinskog testa (SUKADR – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) i površine ispod krive vrednosti šećera u krvi tokom posmatranog perioda (AUC, mmol/L x dan, $\bar{X} \pm SD$) pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 21 dana.

Grupa	SUKpre	SUKkraj	SUKADR	AUC
KON	6,80±0,29	6,86±0,32	12,88±0,93	153,30±4,33
Com1	6,98±0,46	7,10±0,86	13,53±1,30	152,01±5,87
Com2	7,00±0,44	6,63±0,60	12,23±1,81	150,37±7,28
Com3	6,48±0,68	7,05±0,29	14,20±1,03	153,77±4,94

U **tabeli 17** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana u vrednostima šećera u krvi pre tretmana (SUKpre; F=1,410, p=0,271), nakon 21-dnevnog tretmana (SUKkraj; F=0,807, p=0,505), nakon adrenalinskog testa (SUKADR; F=2,402, p=0,100) i površine ispod krive (AUC; F=0,409, p=0,748).

Tabela 18. Vrednosti šećera u krvi pre tretmana (SUKpre – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) i poslednjeg dana tretmana (SUKkraj – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$), kao i šećera u krvi nakon adrenalinskog testa (SUKADR – mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) i površine ispod krive vrednosti šećera u krvi tokom posmatranog perioda (AUC, mmol/L x dan, $\bar{X} \pm SD$) pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 42 dana

Grupa	SUKpre	SUKkraj	SUKADR	AUC
KON	7,92±0,33	6,66±0,42	7,38±0,30	288,21±22,14
Com1	7,80±0,47	6,28±0,57	9,78±0,61 ^x	269,77±13,40
Com2	7,55±0,31	5,48±0,48 ^x	10,57±1,75 ^x	291,64±10,35
Com3	7,97±0,33	6,30±0,26	11,52±2,61 ^x	284,01±16,37

^xp<0,05 u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe

U **tabeli 18** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana u vrednostima šećera u krvi pre tretmana (SUKpre; F=1,519, p=0,242) i površine ispod krive (AUC; F=2,436, p=0,096). Statistički značajne razlike postoje u vrednostima SUKkraj (F=6,958, p=0,002) između grupe koja je tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 1,67 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa. Takođe statistički značajne razlike postoje i između ispitivanih grupa u vrednostima šećera u krvi nakon adrenalinskog testa (SUKADR; Hi kvadrat=10,064, p=0,018). Statistički značajna razlika postoji između kontrolne grupe i svih drugih eksperimentalnih grupa.

5.2. BIOHEMIJSKA I TOKSIKOLOŠKA ISPITIVANJA

5.2.1. Lipidni status

Tabela 19. Koncentracija holesterola (mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
KON	1,3083±0,2106	1,4700±0,4050	1,5400±0,1554
Com1	1,2767±0,1179 ^x	1,4933±0,2201	1,4467±0,3653
Com2	1,6150±0,3235	1,4883±0,2171	1,6500±0,3762
Com3	1,1760±0,0890 ^x	1,5517±0,3654	1,3650±0,5895

^xp<0,05 u odnosu na Com2

U **tabeli 19** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji holesterola u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana (Hi kvadrat=9,151, p=0,027). Razlika u koncentraciji holesterola u serumu je statistički značajna između grupe koja je tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 1,67 g/kg i grupa koje su dobijale gljivu u dozi od 0,835 g/kg i 3,34 g/kg.

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji holesterola u serumu između ispitivanih grupa 21-dnevnog (F=1,994, p=0,149) i 42-dnevnog tretmana (F=0,819, p=0,499).

Tabela 20. Koncentracija holesterola (mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (ALO), kao i kombinacijom aloksana i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
ALO	1,8520±0,2123	2,0750±0,3154	1,7950±0,2685
ALO+Com1	1,9783±0,3468	1,8233±0,3529	1,6533±0,0611
ALO+Com2	1,6086±0,2565	1,6133±0,1141	1,5283±0,4114
ALO+Com3	1,3225±0,2597 ^x	1,6967±0,2346	1,5780±0,3091

^xp<0,05 u odnosu na ALO i ALO+Com1

U **tabeli 20** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji holesterola u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana (F=5,245, p=0,009). Koncentracija holesterola u serumu je statistički značajno niža u grupi koja je nakon aloksana tretirana gljivom

C. comatus u dozi od 3,34 g/kg u odnosu na grupe koje su nakon aloksana tretirane fiziološkim rastvorom i gljivom u dozi od 0,835 g/kg.

Primenom testa Kruskal–Wallis je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji holesterola u serumu između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana (Hi kvadrat=7,248, p=0,064).

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji holesterola u serumu između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana (F=0,872, p=0,476).

Tabela 21. Koncentracija holesterola (mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg intraperitonealno (UTH), kao i kombinacijom ugljen-tetrahlorida i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
UTH	1,6117±0,3067	1,2550±0,0881	1,3067±0,2854
UTH+Com1	1,5360±0,1534	1,5900±0,3386	1,5200±0,1329
UTH+Com2	1,5683±0,2693	1,4933±0,2304	1,4125±0,1150
UTH+Com3	1,3220±0,3312	1,4933±0,0575	1,3360±0,3501

U **tabeli 21** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji holesterola u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog (F=1,149, p=0,356), 21-dnevnog (Hi kvadrat=2,673, p=0,445) i 42-dnevnog tretmana (Hi kvadrat=6,963, p=0,073).

Tabela 22. Koncentracija triglicerida (mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
KON	0,7667±0,1507	0,9480±0,3511	0,8260±0,2201
Com1	0,7867±0,2195	0,6183±0,0913	0,7250±0,2380
Com2	0,9817±0,4581	1,2583±0,3129 ^x	0,6983±0,2593
Com3	1,0800±0,5260	0,7783±0,0665	0,9450±0,4613

^xp<0,01 u odnosu na Com1 i Com3

U **tabeli 22** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji triglicerida u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana (Hi kvadrat=5,454, p=0,141).

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji triglicerida u serumu između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana ($F=8,152$, $p=0,001$). Razlika u koncentraciji triglicerida u serumu je statistički značajna između grupe tretirane gljivom *C. comatus* u dozi od 1,67 g/kg i grupa koje su dobijale gljivu u dozi od 0,835 g/kg i 3,34 g/kg. Takođe je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji triglicerida u serumu između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana ($F=0,628$, $p=0,606$).

Tabela 23. Koncentracija triglicerida (mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (ALO), kao i kombinacijom aloksana i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
ALO	0,6300±0,0787	1,4167±0,5667	1,0133±0,4768
ALO+Com1	1,1600±0,1765 ^x	0,5867±0,1673 ^y	0,9633±0,3308
ALO+Com2	0,5114±0,1673	0,7517±0,3352 ^y	0,6467±0,2723
ALO+Com3	0,5150±0,1642	0,6817±0,2615 ^y	0,6800±0,1342

^x $p<0,001$ u odnosu na sve eksperimentalne grupe

^y $p<0,05$ u odnosu na ALO

U **tabeli 23** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji triglicerida u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana ($F=23,396$, $p<0,001$). Razlika u koncentraciji triglicerida u serumu je statistički značajna između grupe koja je nakon aloksana tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa. Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji triglicerida u serumu između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana ($F=6,464$, $p=0,003$). Koncentracija triglicerida u serumu je statistički značajno viša u grupi koja je nakon aloksana dobijala fiziološki rastvor u odnosu na sve druge eksperimentalne grupe. Takođe je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji triglicerida u serumu između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana ($F=1,428$, $p=0,271$).

Tabela 24. Koncentracija triglicerida (mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg intraperitonealno (UTH), kao i kombinacijom ugljen-tetrahlorida i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
UTH	0,5533±0,1499	0,7000±0,1388	0,8600±0,4124
UTH+Com1	0,7500±0,2432	0,5833±0,1553	0,6825±0,2181
UTH+Com2	0,5600±0,1548	0,6567±0,1675	1,0100±0,4872
UTH+Com3	0,4900±0,1107	0,5500±0,1010	0,8720±0,3854

U **tabeli 24** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji triglicerida u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog ($F=2,214$, $p=0,122$), 21-dnevnog ($F=1,147$, $p=0,357$) i 42-dnevnog tretmana ($F=0,436$, $p=0,731$).

Tabela 25. Koncentracija HDL holesterola (mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67(Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
KON	0,7717±0,1245	0,8300±0,2527	0,6680±0,0779
Com1	0,6333±0,0635 ^x	0,9050±0,1792	0,7267±0,2180
Com2	0,8983±0,1485	0,8383±0,1589	0,7100±0,2045
Com3	0,6480±0,0653 ^x	0,9833±0,2630	0,6817±0,3207

^x $p<0,05$ u odnosu na Com2

U **tabeli 25** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji HDL holesterola u serumu između ispitivanih grupa (Hi kvadrat=15,037, $p=0,02$). Razlika u koncentraciji HDL holesterola u serumu je statistički značajna između grupe koja je tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 1,67 g/kg i grupa koje su dobijale gljivu u dozi od 0,835 g/kg i 3,34 g/kg.

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji HDL holesterola u serumu između ispitivanih grupa 21-dnevnog ($F=0,625$, $p=0,608$) i 42-dnevnog tretmana ($F=0,069$, $p=0,499$).

Tabela 26. Koncentracija HDL holesterola (mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (ALO), kao i kombinacijom aloksana i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
ALO	1,0980±0,1275	1,1833±0,1454	0,7400±0,1349
ALO+Com1	0,9183±0,1026	1,0750±0,2605	0,8467±0,0862
ALO+Com2	0,9386±0,1750	0,8850±0,0748	0,8933±0,2529
ALO+Com3	0,6975±0,1936 ^x	1,0117±0,1907	0,9560±0,2261

^xp<0,01 u odnosu na ALO

U **tabeli 26** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji HDL holesterola u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana (F=5,203, p=0,009). Razlika u koncentraciji HDL holesterola u serumu je statistički značajna između grupe koja je nakon aloksana dobijala fiziološki rastvor i grupe koja je dobijala gljivu *C. comatus* u dozi od 3,34 g/kg.

Primenom testa Kruskal–Wallis je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji HDL holesterola u serumu između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana (Hi kvadrat=6,564, p=0.087).

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji HDL holesterola u serumu između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana (F=1,185, p=0,347).

Ispitivanjem povezanosti primenjene doze gljive *C. comatus* sa koncentracijom HDL holesterola u serumu eksperimentalnih životinja uočeno je da postoji jaka pozitivna korelacija ta dva posmatrana parametra za 42-dnevni tretman (r=0,955, p = 0,045).

Tabela 27. Koncentracija HDL holesterola (mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg intraperitonealno (UTH), kao i kombinacijom ugljen-tetrahlorida i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
UTH	0,5100±0,1945	0,3800±0,1360	0,3275±0,1109
UTH+Com1	0,3360±0,0493	0,4867±0,2271	0,3500±0,0698
UTH+Com2	0,5583±0,1910	0,5667±0,2397	0,3275±0,1109
UTH+Com3	0,4780±0,1593	0,4600±0,1173	0,3200±0,1111

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji HDL holesterola u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog (F=4,701, p=0,014), 21-dnevnog (F=0,786, p=0,517) i 42-dnevnog tretmana (F=3,357, p=0,055).

Tabela 28. Koncentracija LDL holesterola (mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67(Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
KON	0,2833±0,0753	0,2000±0,1000	0,2000±0,1000
Com1	0,2833±0,1329	0,3333±0,1366 ^x	0,4000±0,2000
Com2	0,3167±0,1329	0,2083±0,1018	0,6167±0,2137 ^y
Com3	0,1940±0,1081	0,3500±0,1049 ^x	0,2533±0,1214

^xp<0,05 u odnosu na Com2

^yp<0,05 u odnosu na KON i Com3

U **tabeli 28** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji LDL holesterola u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana (F=1,105, p=0,371). Takođe se vidi da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji LDL holesterola u serumu između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana (F=4,969, p=0,01). Razlika u koncentraciji LDL holesterola u serumu je statistički značajna između grupe koja je tretirana gljivom u dozi od 1,67 g/kg i grupa koje su dobijale gljivu u dozi od 0,835 g/kg i 3,34 g/kg. Statistički značajna razlika postoji i u koncentraciji LDL holesterola u serumu između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana (F=5,292, p=0,008). Razlika u koncentraciji LDL holesterola u serumu je statistički značajna između grupe koja je tretirana gljivom u dozi od 1,67 g/kg i grupa koje su dobijale samo fiziološki rastvor ili gljivu u dozi od 3,34 g/kg.

Tabela 29. Koncentracija LDL holesterola (mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (ALO), kao i kombinacijom aloksana i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
ALO	0,4800±0,1095	0,5550±0,2727	0,2850±0,1267
ALO+Com1	0,4133±0,2097	0,4667±0,1366	0,3333±0,1527
ALO+Com2	0,4286±0,0756	0,3833±0,1941	0,4000±0,1349
ALO+Com3	0,3750±0,0500	0,3667±0,1533	0,3200±0,0837

U **tabeli 29** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji LDL holesterola u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog (Hi kvadrat=2,353, p=0.502), 21-dnevnog (Hi kvadrat=2,689, p=0.442) i 42-dnevnog tretmana (F=0,697, p=0,567).

Tabela 30. Koncentracija LDL holesterola (mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg intraperitonealno (UTH), kao i kombinacijom ugljen-tetrahlorida i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
UTH	0,7667±0,1862	0,5500±0,0577	0,4033±0,1950
UTH+Com1	0,9400±0,1140	0,8550±0,1317 ^x	0,8500±0,3000
UTH+Com2	0,7500±0,2074	0,6167±0,2714	0,6250±0,2872
UTH+Com3	0,8000±0,1225	0,7833±0,1169	0,6100±0,2924

^xp<0,05 u odnosu na UTH

U **tabeli 30** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji LDL holesterola u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog (F=1,413, p=0,271) i 42-dnevnog tretmana (F=1,500, p=0,264).

Statistički značajna razlika u koncentraciji LDL holesterola u serumu postoji između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana (F=3,515, p=0,036). Razlika u koncentraciji LDL holesterola u serumu je statistički značajna između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida dobijala fiziološki rastvor i grupe koja je pre toga dobijala gljivu *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg.

5.2.2. Parametri jetrene funkcije

Tabela 31. Koncentracija aspartat aminotransferaze (AST) (U/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
KON	188,67±34,51	153,40±19,99	118,40±43,38
Com1	207,83±47,31	157,67±12,29 ^x	147,17±31,98
Com2	250,83±58,27	130,83±9,45	127,83±32,00
Com3	168,80±12,93 ^x	143,83±10,78	116,00±47,18

^xp<0,05 u odnosu na Com2

U **tabeli 31** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji AST u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana ($F=3,786$, $p=0,028$). Koncentracija enzima AST u serumu životinja tretiranih gljivom *C. comatus* u dozi od 3,34 g/kg je manja u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe, a statistička značajnost postoji u odnosu na grupu tretiranu gljivom u dozi od 1,67 g/kg.

Statistički značajna razlika u koncentraciji AST u serumu postoji i između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana ($F=4,678$, $p=0,013$). Razlika u koncentraciji AST u serumu je statistički značajna između grupa tretiranih gljivom u dozi od 0,835 g/kg i 1,67 g/kg.

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji AST u serumu između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana ($F=0,655$, $p=0,590$).

Tabela 32. Koncentracija AST (U/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (ALO), kao i kombinacijom aloksana i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
ALO	205,40±20,18	140,00±29,62	264,17±92,58
ALO+Com1	214,33±57,67	143,83±28,60	148,33±29,87
ALO+Com2	207,71±29,75	162,00±73,55	160,17±72,64
ALO+Com3	141,75±35,88 ^x	109,83±9,24	127,00±14,14

^x $p<0,05$ u odnosu na ALO+Com1

U **tabeli 32** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji AST u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana ($F=3,318$, $p=0,043$). Koncentracija enzima AST u serumu životinja koje su dobile aloksan, a zatim gljivu *C. comatus* u dozi od 3,34 g/kg je manja u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe, a statistička značajnost postoji u odnosu na grupu koja je nakon aloksana tretirana gljivom u dozi od 0,835 g/kg.

Primenom testa Kruskal–Wallis je utvrđeno da ne postoje statistički značajne razlike u koncentraciji AST u serumu između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana (Hi kvadrat=5,736, $p=0,125$) i 42-dnevnog tretmana (Hi kvadrat=7,791, $p=0,051$).

Tabela 33. Koncentracija AST (U/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg intraperitonealno (UTH), kao i kombinacijom ugljen-tetrahlorida i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
UTH	1536,50±744,78	1833,75±815,70	2948,00±706,50
UTH+Com1	1554,60±412,67	1636,50±513,50	2498,25±406,26
UTH+Com2	2136,83±844,33	1705,83±742,28	2286,50±342,60
UTH+Com3	1819,40±484,07	1474,00±280,47	2168,20±942,85

U **tabeli 33** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji AST u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana ($F=0,858$, $p=0,481$) i 42-dnevnog tretmana ($F=0,806$, $p=0,514$).

Primenom testa Kruskal–Wallis je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji AST u serumu između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana (H_i kvadrat=1,102, $p=0,777$).

Tabela 34. Koncentracija alanin aminotransferaze (ALT) (U/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
KON	31,67±7,79	45,40±2,88	34,40±5,86
Com1	9,67±2,66 ^x	34,67±5,85 ^z	18,67±3,72 ^{y,z}
Com2	42,83±4,40	32,17±7,73 ^z	30,50±8,46
Com3	31,40±7,47 ^y	38,83±8,93 ^z	15,00±7,51 ^{y,z}

^x $p<0,01$ u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe

^y $p<0,05$ u odnosu na Com2

^z $p<0,01$ u odnosu na KON

U **tabeli 34** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji ALT u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana (H_i kvadrat=17,246, $p=0,001$). Razlika u koncentraciji ALT u serumu je statistički značajna između grupe koja je tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, kao i između grupa tretiranih gljivom *C. comatus* u dozi od 1,67 g/kg i 3,34 g/kg.

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji ALT u serumu između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana ($F=11,749$, $p<0,01$). Razlika u koncentraciji ALT u serumu je statistički značajna između grupe tretirane fiziološkim rastvorom i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Takođe je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji ALT u serumu između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana ($F=10,854$, $p<0,001$). Razlika u koncentraciji ALT u serumu je statistički značajna između grupe koja je tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg i grupa tretiranih fiziološkim rastvorom i gljivom u dozi od 1,67 g/kg, kao i između grupe tretirane gljivom u dozi od 3,34 g/kg i grupa tretiranih fiziološkim rastvorom i gljivom u dozi od 1,67 g/kg.

Tabela 35. Koncentracija ALT (U/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (ALO), kao i kombinacijom aloksana i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
ALO	39,20±16,20	31,17±9,70	43,33±20,83
ALO+Com1	19,50±10,65	30,67±14,49	63,67±24,05
ALO+Com2	26,43±8,92	43,00±20,19	38,17±13,78
ALO+Com3	52,00±25,33	21,83±9,17	58,20±27,50

U **tabeli 35** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji ALT u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana ($F=3,111$, $p=0,052$) i 21-dnevnog tretmana ($F=1,246$, $p=0,320$).

Primenom testa Kruskal–Wallis je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji ALT u serumu između ispitivanih grupa (Hi kvadrat=4,796, $p=0,187$).

Tabela 36. Koncentracija ALT (U/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih ugljen-tetrahlridom u dozi od 2 ml/kg intraperitonealno (UTH), kao i kombinacijom ugljen-tetrahlrida i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
UTH	612,17±106,44	579,00±232,15	917,00±352,82
UTH+Com1	247,20±61,71 ^x	639,00±290,73	446,25±205,15
UTH+Com2	278,50±108,69 ^x	311,17±129,18	477,75±208,25
UTH+Com3	419,40±202,11	322,33±140,90	354,20±156,67

^x $p<0,01$ u odnosu na UTH

U **tabeli 36** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji ALT u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana ($F=8,806$, $p=0,001$). Razlika u koncentraciji ALT u serumu je statistički značajna između grupe koja je tretirana fiziološkim

rastvorom, a zatim ugljen-tetrahloridom i grupa koje su pre ugljen-tetrahlorida tretirane gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg i 1,67 g/kg.

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji ALT u jetri između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana ($F=0,671$, $p=0,581$).

Primenom testa Kruskal–Wallis je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji ALT u serumu između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana (H_i kvadrat=4,358, $p=0,225$).

5.2.3. Parametri bubrežne funkcije

Tabela 37. Koncentracija uree (mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
KON	5,217±0,656	5,180±0,746	5,840±2,193
Com1	6,383±0,650	8,817±0,621 ^x	7,050±1,129
Com2	5,983±1,080	8,133±0,287 ^x	7,067±0,372
Com3	8,260±0,934 ^x	8,617±0,937 ^x	7,133±2,876

^x $p<0,01$ u odnosu na KON

U **tabeli 37** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji uree u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana ($F=8,152$, $p=0,001$). Razlika u koncentraciji uree u serumu je statistički značajna između grupe tretirane gljivom *C. comatus* u dozi od 3,34 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji uree u serumu između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana ($F=31,951$, $p<0,001$). Razlika u koncentraciji uree u serumu je statistički značajna između grupe tretirane gljivom *C. comatus* u dozi od 1,67 g/kg i grupa tretiranih gljivom u dozi od 0,835 g/kg i 3,34 g/kg. Takođe je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji uree u serumu između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana ($F=0,568$, $p=0,643$).

Tabela 38. Koncentracija uree (mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (ALO), kao i kombinacijom aloksana i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
ALO	5,960±0,979	10,100±0,800	9,867±1,320
ALO+Com1	9,900±1,479	8,567±0,665 ^y	8,833±0,929
ALO+Com2	7,871±3,133	11,083±2,285	8,717±1,272
ALO+Com3	12,600±3,984 ^{x,y}	8,733±1,193 ^y	12,180±4,458

^xp<0,01 u odnosu na ALO

^yp<0,05 u odnosu na ALO+Com2

U **tabeli 38** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji uree u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana ($F=5,506$, $p=0,007$). Razlika u koncentraciji uree u serumu je statistički značajna između grupe koja je nakon aloksana tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 3,34 g/kg i grupa koje su nakon aloksana tretirane fiziološkim rastvorom i gljivom u dozi od 1,67 g/kg.

Primenom testa Kruskal–Wallis je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji uree u serumu između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana (Hi kvadrat=9,354, $p=0,025$). Razlika u koncentraciji uree u serumu je statistički značajna između grupe koja je nakon aloksana tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 1,67 g/kg i grupa koja je nakon aloksana tretirana gljivom u dozi od 0,835 g/kg i 3,34 g/kg. Takođe je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji uree u serumu između ispitivanih grupa nakon 42-dnevnog tretmana (Hi kvadrat=2,589, $p=0,459$).

Tabela 39. Koncentracija uree (mmol/L, $\bar{X} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg intraperitonealno (UTH), kao i kombinacijom ugljen-tetrahlorida i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
UTH	6,683±1,120	5,250±1,926	4,133±1,404
UTH+Com1	5,080±1,875	7,767±1,496	7,350±1,572
UTH+Com2	7,300±1,122 ^x	6,783±1,694	8,450±1,237
UTH+Com3	7,940±0,789 ^x	7,050±0,971	10,800±4,873

^xp<0,01 u odnosu na UTC+Com1

U **tabeli 39** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji uree u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana ($F=4,708$, $p=0,013$). Razlika u koncentraciji uree u serumu je statistički značajna između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida dobijala gljivu *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg i grupa koje su pre ugljen-tetrahlorida dobijale gljivu u dozi od 1,67 g/kg i 3,34 g/kg.

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji uree u serumu između ispitivanih grupa 21-dnevnog ($F=2,254$, $p=0,117$) i 42-dnevnog tretmana ($F=2,299$, $p=0,129$).

Tabela 40. Koncentracija kreatinina ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{X} \pm \text{SD}$) u serumu pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
KON	40,50±5,82	44,40±7,83	49,40±5,46
Com1	46,17±4,54	51,00±0,63	62,00±4,24
Com2	44,33±4,93	48,33±2,34	57,67±3,88
Com3	46,20±2,05	48,17±2,14	45,50±20,11

U **tabeli 40** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji kreatinina u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog ($F=1,936$, $p=0,158$), 21-dnevnog ($F=2,540$, $p=0,087$) i 42-dnevnog tretmana ($F=2,755$, $p=0,071$).

Tabela 41. Koncentracija kreatinina ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{X} \pm \text{SD}$) u serumu pacova tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (ALO), kao i kombinacijom aloksana i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
ALO	44,20±2,68	51,17±4,96	57,83±3,12
ALO+Com1	51,83±4,62	47,33±2,50	52,00±5,29
ALO+Com2	44,00±10,86	50,67±5,82	50,83±4,62 ^x
ALO+Com3	48,00±8,08	47,67±5,64	52,20±3,70

^x $p<0,05$ u odnosu na ALO

U **tabeli 41** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji kreatinina u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog ($F=1,421$, $p=0,269$) i 21-dnevnog tretmana ($F=0,982$, $p=0,421$).

Takođe se vidi da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji kreatinina u serumu između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana ($F=3,412$, $p=0,043$). Razlika u koncentraciji kreatinina u serumu je statistički značajna između grupe koja je nakon aloksana tretirana fiziološkim rastvorom i grupe koja je nakon aloksana tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 1,67 g/kg.

Tabela 42. Koncentracija kreatinina ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{X} \pm \text{SD}$) u serumu pacova tretiranih ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg intraperitonealno (UTH), kao i kombinacijom ugljen-tetrahlorida i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
UTH	57,83±7,00	69,75±5,44	76,33±10,60
UTH+Com1	43,00±2,55 ^x	50,83±5,42 ^z	61,75±10,40
UTH+Com2	52,50±6,87	48,50±2,74 ^z	75,50±8,74
UTH+Com3	54,40±5,59 ^y	53,83±4,53 ^z	70,40±23,92

^x $p<0,01$ u odnosu na UTH

^y $p<0,05$ u odnosu na UTH+Com1

^z $p<0,001$ u odnosu na UTH

U **tabeli 42** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji kreatinina u serumu između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana ($F=6,182$, $p=0,004$). Razlika u koncentraciji kreatinina u serumu je statistički značajna između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg i grupa koje su pre ugljen-tetrahlorida tretirane fiziološkim rastvorom i gljivom u dozi od 3,34 g/kg.

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji kreatinina u serumu između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana ($F=19,625$, $p<0,001$). Koncentracija kreatinina u serumu je statistički značajno viša u grupi koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana fiziološkim rastvorom u odnosu na sve druge eksperimentalne grupe. Takođe je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji kreatinina u serumu između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana ($F=0,663$, $p=0,591$).

5.3. ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

5.3.1. *In vitro* antioksidativna aktivnost

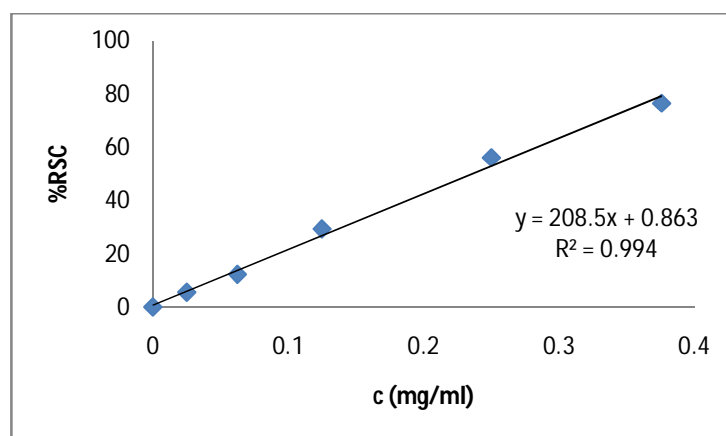
Tabela 43. Procenat neutralizacije DPPH radikala (%RSC) metanolnim ekstraktom gljive *C. comatus*.

Koncentracija ekstrakta (mg/ml)	0,025	0,0625	0,125	0,25	0,375
%RSC	5,53	12,28	29,43	56,17	76,64

U **tabeli 43** se uočava da sa povećanjem koncentracije metanolnog ekstrakta gljive *C. comatus* raste i procenat neutralizacije DPPH radikala, odnosno redukujući kapacitet istog. Takođe se uočava da se IC_{50} vrednost nalazi između vrednosti 3. i 4. ispitivane koncentracije ekstrakta (0,125–0,25).

Za izračunavanje IC_{50} vrednosti korišćen je regresioni model (**Grafikon 1**). Koeficijent determinacije je iznosio 99,4% ($R^2=0,994$), a vrednost IC_{50} je iznosila 0,236 mg/ml. Kao kontrola je korišćen α -tokoferol (vitamin E). Koeficijent determinacije za vitamin E je iznosio 98,8% ($R^2=0,988$), a vrednost IC_{50} je iznosila 0,00253 mg/ml (**Grafikon 2**).

Grafikon 1. Procenat neutralizacije DPPH radikala (%RSC) metanolnim ekstraktom gljive *C. comatus*.



Grafikon 2. Procenat neutralizacije DPPH radikala (%RSC) α -tokoferolom.

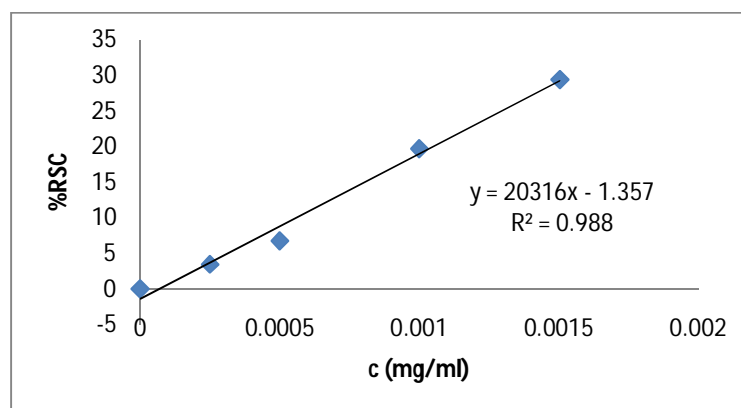


Tabela 44. Sadržaj ukupnih fenola (TPC, mg GAE/g suvog ekstrakta) metanolnog ekstrakta gljive *C. comatus*.

Gljiva	TPC
<i>Coprinus comatus</i>	151,02

Iz **tabele 44** se uočava da vrednost ukupnih fenola u metanolnom ekstraktu gljive *C. comatus* iznosi 151,02 mg GAE/g suvog ekstrakta.

Tabela 45. Vrednosti redoks kapaciteta (apsorbanca na 700 nm) metanolnog ekstrakta gljive *C. comatus* i α -tokoferola određene metodom FRAP.

Koncentracija uzorka (mg/ml)	0,1	1	2	5	10
<i>Coprinus comatus</i>	-	0,08	0,20	0,52	1,09
α -tokoferol	0,18	-	-	-	-

Iz **tabele 45** se uočava da redukujući kapacitet metanolnog ekstrakta gljive *C. comatus* određen metodom FRAP raste sa povećanjem koncentracije istog. Kao kontrola je korišćen α -tokoferol i njegova vrednost redoks kapaciteta je iznosila 0,18 za koncentraciju 0,1 mg/ml. Između koncentracije uzorka ekstrakta gljive *C. comatus* i vrednosti redoks kapaciteta postoji jaka pozitivna korelacija ($r=0,99$, $p<0,001$).

5.3.2. *In vivo* antioksidativna aktivnost

Tabela 46. Intenzitet lipidne peroksidacije (nmol malondialdehida/mg proteina, $\bar{X} \pm SD$) u jetri pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
KON	1,113±0,065	0,332±0,008	0,324±0,034
Com1	0,877±0,068 ^y	0,265±0,019 ^{y,z}	0,295±0,032
Com2	0,944±0,055 ^y	0,257±0,023 ^{y,z}	0,302±0,022
Com3	0,316±0,040 ^x	0,291±0,039	0,340±0,032

^xp<0,001 u odnosu na sve eksperimentalne grupe

^yp<0,001 u odnosu na KON

^zp<0,01 u odnosu na Com3

U **tabeli 46** se uočava da postoji statistički značajna razlika u vrednosti LPx u jetri između ispitivanih grupa nakon 7-dnevnog tretmana (F=181,105, p<0,001). Razlika vrednosti LPx je statistički značajna između grupe koja je tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 3,34 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, kao i između kontrolne grupe i svih drugih eksperimentalnih grupa. Statistički značajna razlika u vrednosti LPx u jetri postoji i između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana (F=15,340, p<0,001). Razlika vrednosti LPx je statistički značajna između grupe koja je tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg, s jedne strane, i, sa druge strane, kontrolne grupe i grupe koja je dobijala *C. comatus* u dozi od 3,34 g/kg, kao i između grupe koja je tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 1,67 g/kg, s jedne strane, i, s druge strane, kontrolne grupe i grupe koja je dobijala *C. comatus* u dozi od 3,34 g/kg. Primenom testa ANOVA je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u vrednosti LPx u jetri između ispitivanih grupa nakon 42-dnevnog tretmana (F=2,814, p=0,067).

Tabela 47. Intenzitet lipidne peroksidacije (nmol malondialdehida/mg proteina, $\bar{X} \pm SD$) u jetri pacova tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (ALO), kao i kombinacijom aloksana i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
ALO	1,000±0,110	0,295±0,031	0,337±0,033
ALO+Com1	1,108±0,132 ^y	0,262±0,029	0,293±0,023 ^y
ALO+Com2	0,919±0,079	0,258±0,038	0,218±0,015 ^z
ALO+Com3	0,397±0,060 ^x	0,275±0,034	0,246±0,034 ^z

^xp<0,001 u odnosu na sve eksperimentalne grupe

^yp<0,01 u odnosu na ALO+Com2

^zp<0,001 u odnosu na ALO

U **tabeli 47** se uočava da postoji statistički značajna razlika u vrednosti LPx u jetri između ispitivanih grupa nakon 7-dnevnog tretmana ($F=43,025$, $p<0,001$). Statistički značajna razlika postoji između grupe koja je nakon aloksana tretirana gljivom u dozi od 0,835 g/kg i grupe koja je nakon aloksana dobijala *C. comatus* u dozi od 1,67 g/kg, kao i između grupe koja je tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg, gde je zabeležena najniža vrednost LPx ($0,397\pm 0,060$), i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Statistički značajna razlika u vrednosti LPx u jetri ne postoji između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana ($F=1,938$, $p=0,156$).

Primenom testa ANOVA je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika u vrednosti LPx u jetri između ispitivanih grupa nakon 42-dnevnog tretmana ($F=20,592$, $p<0,001$). Razlika u vrednosti LPx je statistički značajna između grupe koja je nakon aloksana tretirana gljivom u dozi od 0,835 g/kg i grupe koja je nakon aloksana dobijala *C. comatus* u dozi od 1,67 g/kg, kao i između grupe koja je nakon aloksana dobijala fiziološki rastvor i grupa koje su nakon aloksana dobijale gljivu u dozama od 1,67 i 3,34 g/kg.

Tabela 48. Intenzitet lipidne peroksidacije (nmol malondialdehida/mg proteina, $\bar{X} \pm SD$) u jetri pacova tretiranih ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg intraperitonealno (UTH), kao i kombinacijom ugljen-tetrahlorida i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
UTH	1,343±0,111	0,863±0,074	0,980±0,104
UTH+Com1	1,082±0,075 ^x	0,495±0,027 ^z	0,352±0,056 ^w
UTH+Com2	1,170±0,040 ^x	0,807±0,043	0,468±0,040 ^w
UTH+Com3	0,368±0,027 ^y	0,632±0,030 ^z	0,408±0,070 ^w

^x $p<0,01$ u odnosu na UTH

^y $p<0,01$ u odnosu na sve eksperimentalne grupe

^z $p<0,001$ u odnosu na sve eksperimentalne grupe

^w $p<0,001$ u odnosu na UTH

U **tabeli 48** se uočava da su vrednosti LPx u svim vremenskim intervalima niže u grupama koje su pre primene ugljen-tetrahlorida tretirane gljivom *C. comatus* u odnosu na grupu koja je dobijala fiziološki rastvor. Statistički značajna razlika u vrednosti LPx u jetri postoji između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana (Hi kvadrat=18,063, $p<0,001$). Razlika je statistički značajna između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg i kontrolne grupe, između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana

gljivom u dozi od 1,67 g/kg i kontrolne grupe, kao i između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Statistički značajna razlika u vrednosti LPx u jetri postoji i između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana ($F=79,988$, $p<0,001$). Razlika je statistički značajna između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, kao i između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Primenom testa Kruskal–Wallis je utvrđeno da postoji statistički značajnih razlika u vrednosti LPx u jetri između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana ($F=58,789$, $p<0,001$). Razlika je statistički značajna između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom u dozi od 1,67 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, kao i između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Tabela 49. Aktivnost ksantin-oksidade ($\text{nmol/mg proteina min}^{-1}$, $\bar{X} \pm \text{SD}$) u jetri pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
KON	3,310±0,223	1,988±0,196	2,564±0,174
Com1	3,478±0,310	1,625±0,044 ^y	2,555±0,168
Com2	4,388±0,182 ^x	2,271±0,100 ^z	2,765±0,256
Com3	3,158±0,307	1,727±0,157 ^y	2,852±0,271

^x $p<0,001$ u odnosu na sve eksperimentalne grupe

^y $p<0,05$ u odnosu na KON

^z $p<0,01$ u odnosu na sve eksperimentalne grupe

U **tabeli 49** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji XOD u jetri između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana ($F=22,547$, $p<0,001$). Razlika u koncentraciji XOD u jetri je statistički značajna između grupe koja je tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 1,67 g/kg i svih ostalih eksperimentalnih grupa.

Statistički značajna razlika u koncentraciji XOD u jetri postoji i između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana ($F=28,215$, $p<0,001$). Razlika u koncentraciji XOD u jetri je statistički značajna između kontrolne grupe i svih grupa koje su tretirane gljivom u dozi od 0,835 i 3,34 g/kg, kao i između grupe koja je dobijala gljivu u dozi od 1,67 g/kg i svih eksperimentalnih grupa.

Statistički značajna razlika u koncentraciji XOD u jetri ne postoji između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana ($F=2,506$, $p=0,090$).

Tabela 50. Aktivnost ksantin-oksidade ($\text{nmol/mg proteina min}^{-1}$, $\bar{X} \pm \text{SD}$) u jetri pacova tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (ALO), kao i kombinacijom aloksana i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
ALO	3,920±0,333	1,870±0,095	2,495±0,130
ALO+Com1	3,503±0,470	1,667±0,129 ^y	2,913±0,015 ^{z,w}
ALO+Com2	3,806±0,423	1,933±0,180	3,071±0,144 ^{z,w}
ALO+Com3	2,086±0,189 ^x	1,810±0,120	2,420±0,316

^x $p<0,001$ u odnosu na sve eksperimentalne grupe

^y $p<0,05$ u odnosu na ALO+Com2

^z $p<0,01$ u odnosu na ALO

^w $p<0,01$ u odnosu na ALO+Com3

U **tabeli 50** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji XOD u jetri između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana ($F=22,281$, $p<0,001$). Razlika u koncentraciji XOD u jetri je statistički značajna između grupe koja je nakon aloksana tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 3,34 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Statistički značajna razlika u koncentraciji XOD u jetri postoji i između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana ($F=4,318$, $p=0,017$). Razlika u koncentraciji XOD u jetri je statistički značajna između grupa koje su nakon aloksana tretirane gljivom u dozi od 0,835 ili 1,67 g/kg.

Takođe statistički značajna razlika u koncentraciji XOD u jetri postoji i između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana ($F=14,585$, $p<0,001$). Razlika u koncentraciji XOD u jetri je statistički značajna između grupe koja je nakon aloksana dobijala fiziološki rastvor i grupa koje su nakon toga dobijale gljivu u dozi od 0,835 i 1,67 g/kg, kao i između grupe koja je nakon aloksana tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg i grupa koje su nakon toga dobijale gljivu u dozi od 0,835 i 1,67 g/kg.

Tabela 51. Aktivnost ksantin-oksidadze (nmol/mg proteina min⁻¹, $\bar{X} \pm SD$) u jetri pacova tretiranih ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg intraperitonealno (UTH), kao i kombinacijom ugljen-tetrahlorida i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
UTH	3,933±0,348	2,612±0,252	2,630±0,085
UTH+Com1	2,846±0,151 ^{x,y}	1,450±0,117 ^x	2,032±0,157 ^w
UTH+Com2	3,913±0,277	2,043±0,173 ^z	2,198±0,230
UTH+Com3	2,464±0,125 ^{x,y}	1,230±0,076 ^x	1,776±0,328 ^w

^xp<0,001 u odnosu na UTH

^yp<0,001 u odnosu na UTH+Com2

^zp<0,001 u odnosu na sve eksperimentalne grupe

^wp<0,05 u odnosu na UTH

U **tabeli 51** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji XOD u jetri između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana (F=56,011, p<0,001). Razlika je statistički značajna između grupa koje su pre ugljen-tetrahlorida tretirane ili fiziološkim rastvorom ili gljivom *C. comatus* u dozi od 1,67 g/kg, s jedne strane, i, s druge strane, grupa koje su pre ugljen-tetrahlorida tretirane gljivom u dozi od 0,835 ili 3,34 g/kg.

Statistički značajna razlika u koncentraciji XOD u jetri postoji i između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana (F=77,508, p<0,001). Razlika je statistički značajna između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida dobijala fiziološki rastvor i grupa koje su tretirane gljivom u dozi od 0,835 ili 3,34 g/kg, kao i između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom u dozi od 1,67 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Takođe statistički značajna razlika u koncentraciji XOD u jetri postoji i između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana (F=8,399, p=0,003). Razlika je statistički značajna između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida dobijala fiziološki rastvor i grupa koje su pre toga tretirane gljivom u dozi od 0,835 ili 3,34 g/kg.

Tabela 52. Koncentracija redukovano glutaciona (nmol/mg proteina, $\bar{X} \pm SD$) u jetri pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
KON	0,426±0,024	0,544±0,040	0,565±0,062
Com1	1,590±0,083 ^{x,y}	0,257±0,028 ^z	1,113±0,091 ^z
Com2	1,187±0,066 ^x	0,768±0,065 ^z	0,853±0,032 ^z
Com3	1,258±0,123 ^x	0,895±0,066 ^z	1,225±0,016 ^z

^xp<0,001 u odnosu na KON

^yp<0,05 u odnosu na Com2

^zp<0,001 u odnosu na sve eksperimentalne grupe

U **tabeli 52** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji GSH u jetri između ispitivanih grupa nakon 7-dnevnog tretmana ($F=130,700$, $p<0,001$). Razlika je statistički značajna između grupe koja je tretirana fiziološkim rastvorom i svih drugih eksperimentalnih grupa, kao i između grupa koje su tretirane gljivom u dozama od 0,835 i 1,67 g/kg.

Primenom jednofaktorske analize varijanse je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji GSH u jetri između ispitivanih grupa nakon 21-dnevnog tretmana ($F=167,191$, $p<0,001$). Razlika je statistički značajna između grupe koja je tretirana gljivom u dozi od 0,835 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, između grupe koja je tretirana gljivom u dozi od 1,67 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, kao i između grupe koja je tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Primenom testa ANOVA je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji GSH u jetri između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana ($F=298,805$, $p<0,001$). Razlika je statistički značajna između grupe koja je tretirana gljivom u dozi od 0,835 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, između grupe koja je tretirana gljivom u dozi od 1,67 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, kao i između grupe koja je tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Tabela 53. Koncentracija redukovano glutaciona (nmol/mg proteina, $\bar{X} \pm SD$) u jetri pacova tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (ALO), kao i kombinacijom aloksana i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
ALO	0,360±0,058	0,743±0,055	0,822±0,088
ALO+Com1	0,926±0,143 ^x	0,902±0,126 ^{y,z}	0,900±0,044
ALO+Com2	0,964±0,071 ^{x,y}	1,007±0,089 ^{x,y}	0,958±0,087
ALO+Com3	1,117±0,029 ^x	0,682±0,061	0,966±0,142

^xp<0,01 u odnosu na ALO

^yp<0,01 u odnosu na ALO+Com3

^zp<0,05 u odnosu na ALO

U **tabeli 53** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji GSH u jetri između ispitivanih grupa nakon 7-dnevnog tretmana (Hi kvadrat=17,590, $p=0,001$). Razlika je statistički značajna između grupe koja je nakon aloksana tretirana fiziološkim rastvorom i svih drugih eksperimentalnih grupa, kao i između grupa koje su nakon aloksana tretirane gljivom u dozi od 1,67 i 3,34 g/kg.

Statistički značajna razlika u koncentraciji GSH u jetri postoji i između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana ($F=17,248$, $p<0,001$). Razlika u koncentraciji GSH u jetri je statistički značajna između grupe koja je nakon aloksana dobijala fiziološki rastvor i grupa koje su nakon aloksana tretirane gljivom u dozi od 0,835 i 1,67 g/kg, kao i između grupe koja je nakon aloksana tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg i grupa koje su nakon aloksana dobijale gljivu u dozi od 0,835 i 1,67 g/kg.

Iako su u svakoj grupi koja je nakon aloksana tretirana gljivom više vrednosti GSH u odnosu na grupu koja je nakon aloksana dobijala fiziološki rastvor, utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji GSH u jetri između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana ($F=2,534$, $p=0,094$).

Tabela 54. Koncentracija redukovano glutaciona (nmol/mg proteina, $\bar{X} \pm SD$) u jetri pacova tretiranih ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg intraperitonealno (UTH), kao i kombinacijom ugljen-tetrahlorida i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
UTH	0,898±0,182	0,380±0,078	0,400±0,072
UTH+Com1	1,053±0,074	0,575±0,034 ^y	0,998±0,090 ^{z,w}
UTH+Com2	0,559±0,035 ^x	0,577±0,024 ^y	0,695±0,054 ^y
UTH+Com3	1,085±0,052 ^y	0,697±0,038 ^z	0,828±0,100 ^w

^x $p<0,001$ u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe

^y $p<0,05$ u odnosu na UTH

^z $p<0,01$ u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe

^w $p<0,001$ u odnosu na UTH

U **tabeli 54** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji proteina u jetri između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana ($F=28,860$, $p<0,001$). Razlika je statistički značajna između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 1,67 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, kao i između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg i grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida dobijala fiziološki rastvor.

Statistički značajna razlika u koncentraciji proteina u jetri postoji i između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana ($Hi\ kvadrat=17,173$, $p=0,001$). Razlika u koncentraciji GSH u jetri je statistički značajna između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg i svih ostalih eksperimentalnih grupa, između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida dobijala fiziološki rastvor i grupa koje su pre ugljen-tetrahlorida tretirane gljivom u dozi od 0,835 i 1,67 g/kg.

Statistički značajna razlika u koncentraciji GSH u jetri postoji i između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana ($F=31,285$, $p<0,001$). Koncentracija GSH u jetri je statistički značajno niža u grupi koja je pre ugljen-tetrahlorida dobijala fiziološki rastvor u odnosu na sve grupe koje su pre ugljen-tetrahlorida tretirane gljivom, takođe statistički značajna razlika postoji i između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom u dozi od 0,835 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Tabela 55. Aktivnost glutation-peroksidaze (GSHPx) ($\text{nmol/mg proteina min}^{-1}$, $\bar{X} \pm \text{SD}$) u jetri pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
KON	4,493±0,217	1,240±0,142	1,432±0,110
Com1	5,682±0,480 ^y	1,322±0,084	1,015±0,063 ^{y,w}
Com2	5,160±0,564 ^y	1,193±0,067	1,193±0,127 ^{y,w}
Com3	1,428±0,120 ^x	1,517±0,143 ^z	1,482±0,174

^x $p<0,001$ u odnosu na sve eksperimentalne grupe

^y $p<0,05$ u odnosu na KON

^z $p<0,05$ u odnosu na sve eksperimentalne grupe

^w $p<0,01$ u odnosu na Com3

U **tabeli 55** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji GSHPx u jetri između ispitivanih grupa nakon 7-dnevnog tretmana ($F=124,971$, $p<0,001$). Razlika u koncentraciji GSHPx je statistički značajna između kontrolne grupe i grupa koje su dobijale gljivu *C. comatus* u dozi od 0,835 i 1,67 g/kg, kao i između grupe koja je tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Statistički značajna razlika postoji i u koncentraciji GSHPx u jetri između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana ($F=9,471$, $p<0,001$). Razlika u koncentraciji GSHPx u jetri je statistički značajna između grupe koja je tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika i u koncentraciji GSHPx u jetri između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana ($F=17,404$, $p<0,001$). Razlika u koncentraciji GSHPx u jetri je statistički značajna između grupa tretiranih fiziološkim rastvorom ili *C. comatus*-om u dozi od 3,34 g/kg, s jedne strane, i, s druge strane, grupa koje su tretirane gljivom u dozi od 0,835 ili 1,67 g/kg.

Tabela 56. Aktivnost GSHPx (nmol/mg proteina min⁻¹, $\bar{X} \pm SD$) u jetri pacova tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (ALO), kao i kombinacijom aloksana i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
ALO	3,314±0,671	1,080±0,036	1,428±0,099
ALO+Com1	1,397±0,026 ^x	1,238±0,099	1,423±0,038
ALO+Com2	4,581±0,314 ^x	1,165±0,114	1,518±0,101
ALO+Com3	1,535±0,238 ^x	1,145±0,134	1,466±0,169

^xp<0,01 u odnosu na sve eksperimentalne grupe

U **tabeli 56** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji GSHPx u jetri između ispitivanih grupa nakon 7-dnevnog tretmana (Hi kvadrat=21,430, p<0,001). Razlika je statistički značajna između grupe koja je nakon aloksana tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, između grupe koja je nakon aloksana tretirana gljivom u dozi od 1,67 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, kao i između grupe koja je nakon aloksana tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Iako je u svim grupama koje su nakon aloksana tretirane gljivom *C. comatus* došlo do porasta koncentracije GSHPx u odnosu na kontrolu, statistički značajna razlika ne postoji između ispitivanih grupa nakon 21-dnevnog tretmana (F=2,418, p=0,096).

Primenom testa ANOVA je utvrđeno da ne postoje statistički značajne razlike u koncentraciji GSHPx u jetri između ispitivanih grupa nakon 42-dnevnog tretmana (F=0,743, p=0,542).

Tabela 57. Aktivnost GSHPx (nmol/mg proteina min⁻¹, $\bar{X} \pm SD$) u jetri pacova tretiranih ugljen-tetrahloridom u dozi 2 ml/kg intraperitonealno (UTH), kao i kombinacijom ugljen-tetrahlorida i gljive *C. comatus* u dozi 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
UTH	0,922±0,077	0,910±0,071	0,833±0,038
UTH+Com1	0,970±0,047	1,287±0,087 ^x	0,702±0,100
UTH+Com2	0,899±0,068	0,783±0,062 ^y	0,905±0,076
UTH+Com3	0,914±0,061	1,121±0,056 ^x	0,782±0,113

^xp<0,01 u odnosu na sve eksperimentalne grupe

^yp<0,001 u odnosu na UTH+Com1 i UTH+Com3

U **tabeli 57** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji GSHPx u jetri između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana ($F=2,896$, $p=0,064$).

Statistički značajna razlika u koncentraciji GSHPx u jetri postoji između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana ($F=59,457$, $p<0,001$). Razlika je statistički značajna između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom u dozi od 0,835 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom u dozi od 1,67 g/kg i grupa koje su pre ugljen-tetrahlorida dobijale gljivu u dozi od 0,835 ili 3,34 g/kg, kao i između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji GSHPx u jetri između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana ($F=3,447$, $p<0,052$).

Tabela 58. Aktivnost glutation-reduktaze (GSHR) ($\text{nmol/mg proteina min}^{-1}$, $\bar{X} \pm \text{SD}$) u jetri pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
KON	4,463±0,097	9,682±0,658	8,488±0,893
Com1	3,258±0,146 ^x	6,518±0,475 ^y	3,430±0,332 ^w
Com2	2,452±0,110 ^x	7,062±0,255 ^{y,z}	6,535±0,655 ^y
Com3	6,974±0,541 ^x	5,880±0,427 ^y	5,717±0,538 ^y

^x $p<0,01$ u odnosu na sve eksperimentalne grupe

^y $p<0,001$ u odnosu na KON

^z $p<0,01$ u odnosu na Com3

^w $p<0,001$ u odnosu na sve eksperimentalne grupe

U **tabeli 58** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji GSHR u jetri između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana (H_i kvadrat=19,718, $p<0,001$). Razlika je statistički značajna između grupe koja je tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, između grupe koja je tretirana gljivom u dozi od 1,67 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, kao i između grupe koja je tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Statistički značajna razlika postoji i u koncentraciji GSHR u jetri između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana ($F=68,263$, $p<0,001$). Koncentracija GSHR je statistički značajno niža u svim grupama koje su dobijale gljivu u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe koncentracija GSHR je statistički značajno niža u grupi životinja koja je tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg u odnosu na grupu koja je dobijala gljivu u dozi od 1,67 g/kg.

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji GSHR u jetri između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana ($F=62,813$, $p<0,001$). Razlika je statistički značajna između grupe koja je tretirana gljivom u dozi od 0,835 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, između grupe koja je tretirana gljivom u dozi od 1,67 g/kg i kontrolne grupe, kao i između grupe koja je tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg i kontrolne grupe.

Tabela 59. Aktivnost GSHR (nmol/mg proteina min^{-1} , $\bar{X} \pm \text{SD}$) u jetri pacova tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (ALO), kao i kombinacijom aloksana i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
ALO	4,651±0,505	3,885±0,211	7,108±0,388
ALO+Com1	4,650±0,648	5,926±0,447 ^y	6,520±0,171
ALO+Com2	2,554±0,204 ^x	3,563±0,568	7,842±0,517
ALO+Com3	9,885±1,314 ^x	7,842±0,781 ^y	9,962±1,391 ^y

^x $p<0,01$ u odnosu na sve eksperimentalne grupe

^y $p<0,001$ u odnosu na sve eksperimentalne grupe

U **tabeli 59** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji GSHR u jetri između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana (H_i kvadrat=18,747, $p<0,001$). Razlika je statistički značajna između grupe koja je nakon aloksana tretirana gljivom u dozi od 1,67 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, kao i između grupe koja je nakon aloksana tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Statistički značajna razlika u koncentraciji GSHR u jetri postoji i između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana ($F=80,806$, $p<0,001$). Razlika je statistički značajna između grupe koja je nakon aloksana tretirana gljivom u dozi od 0,835 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, kao i između grupe koja je nakon aloksana tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Takođe statistički značajna razlika u koncentraciji GSHR u jetri postoji i između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana ($F=26,594$, $p<0,001$). Razlika je statistički značajna između grupe koja je nakon aloksana tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Tabela 60. Aktivnost GSHR (nmol/mg proteina min⁻¹, $\bar{X} \pm SD$) u jetri pacova tretiranih ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg intraperitonealno (UTH), kao i kombinacijom ugljen-tetrahlorida i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
UTH	5,092±0,370	5,387±0,631	6,727±1,222
UTH+Com1	3,442±0,166 ^x	6,833±0,432 ^x	1,782±0,279 ^x
UTH+Com2	4,398±0,135 ^x	2,602±0,152 ^y	4,912±0,452 ^z
UTH+Com3	5,006±0,230	6,002±0,230	3,748±0,525 ^z

^xp<0,01 u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe

^yp<0,001 u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe

^zp<0,01 u odnosu na UTH

U **tabeli 60** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji GSHR u jetri između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana (Hi kvadrat=17,817, p<0,001). Razlika je statistički značajna između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom u dozi od 0,835 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, kao i između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom u dozi od 1,67 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Statistički značajna razlika u koncentraciji GSHR u jetri postoji i između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana (F=144,968, p<0,001). Razlika je statistički značajna između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom u dozi od 0,835 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, kao i između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom u dozi od 1,67 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Takođe statistički značajna razlika u koncentraciji GSHR u jetri postoji i između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana (F=36,823, p<0,001). Razlika je statistički značajna između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom u dozi od 0,835 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, kao i između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida dobijala fiziološki rastvor i grupa koja su pre ugljen-tetrahlorida tretirane gljivom u dozi od 1,67 ili 3,34 g/kg.

Tabela 61. Aktivnost katalaze (CAT) (nmol/mg proteina min⁻¹, $\bar{X} \pm SD$) u jetri pacova tretiranih fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/kg per os (KON) i gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
KON	2,315±0,288	2,302±0,156	2,859±0,201
Com1	2,593±0,258 ^y	2,691±0,278	2,868±0,254
Com2	1,881±0,155	2,929±0,265 ^z	3,261±0,292
Com3	3,830±0,324 ^x	2,859±0,215 ^z	3,701±0,440 ^{z,w}

^xp<0,001 u odnosu na sve eksperimentalne grupe

^yp<0,01 u odnosu na Com2

^zp<0,01 u odnosu na KON

^wp<0,01 u odnosu na Com1

U **tabeli 61** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji CAT u jetri između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana (F=50,391, p<0,001). Razlika u koncentraciji CAT u jetri je statistički značajna između grupe koja je tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg i grupe koja je tretirana istom u dozi od 1,67 g/kg, kao i između grupe koja je tretirana gljivom u dozi od 3,34 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa.

Statistički značajna razlika u koncentraciji CAT u jetri postoji i između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana (F=8,215, p=0,001). Koncentracija CAT u jetri je statistički značajno viša u grupama koje su tretirane gljivom u dozi od 1,67 ili 3,34 g/kg u odnosu na kontrolnu grupu.

Takođe statistički značajna razlika u koncentraciji CAT u jetri postoji i između ispitivanih grupa nakon 42-dnevnog tretmana (F=9,330, p=0,001). Razlika u koncentraciji CAT je statistički značajna između grupe koja je tretirana gljivom u dozi od i 3,34 g/kg i grupa koje su dobijale fiziološki rastvor ili gljivu u dozi od 0,835 g/kg.

Tabela 62. Koncentracija CAT (nmol/mg proteina min⁻¹, $\bar{X} \pm SD$) u jetri pacova tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg intraperitonealno (ALO), kao i kombinacijom aloksana i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
ALO	3,630±0,235	3,194±0,143	3,361±0,238
ALO+Com1	4,232±0,491 ^x	2,839±0,246	3,310±0,089
ALO+Com2	2,802±0,328 ^y	3,146±0,329	3,953±0,222 ^z
ALO+Com3	3,311±0,263	3,061±0,260	3,678±0,491

^xp<0,05 u odnosu na sve eksperimentalne grupe

^yp<0,01 u odnosu na ALO

^zp<0,05 u odnosu na ALO i ALO+Com1

U **tabeli 62** se uočava da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji CAT u jetri između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana ($F=19,192$, $p<0,001$). Razlika u koncentraciji CAT u jetri je statistički značajna između grupe koja je nakon aloksana tretirana gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa, kao i između grupe koja je nakon aloksana tretirana gljivom u dozi od 1,67 g/kg i grupe koja je nakon toga dobijala fiziološki rastvor. Primenom testa ANOVA utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji CAT u jetri između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana ($F=2,316$, $p=0,107$). Statistički značajna razlika u koncentraciji CAT u jetri postoji i između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana ($F=4,847$, $p=0,014$). Razlika u koncentraciji CAT u jetri je statistički značajna između grupe koja je nakon aloksana dobijala gljivu u dozi od 1,67 g/kg i grupa koje su nakon aloksana dobijale fiziološki rastvor ili gljivu u dozi od 0,835 g/kg.

Tabela 63. Koncentracija CAT ($\text{nmol/mg proteina min}^{-1}$, $\bar{X} \pm \text{SD}$) u jetri pacova tretiranih ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg intraperitonealno (UTH), kao i kombinacijom ugljen-tetrahlorida i gljive *C. comatus* u dozi od 0,835 (Com1), 1,67 (Com2) i 3,34 g/kg (Com3) per os tokom 7, 21 i 42 dana.

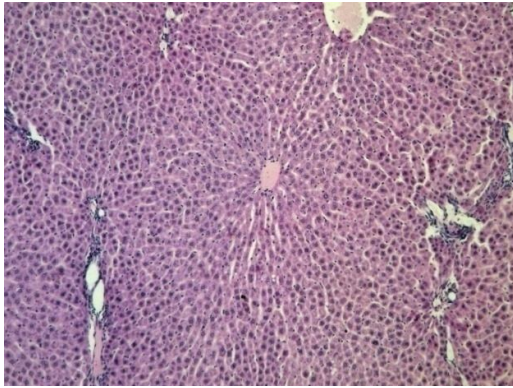
Grupa	7 dana	21 dan	42 dana
UTH	3,213±0,509	2,537±0,201	2,583±0,129
UTH+Com1	3,632±0,448	2,398±0,190	2,639±0,265
UTH+Com2	3,773±0,271	2,072±0,166 ^x	2,947±0,359
UTH+Com3	3,528±0,348	2,453±0,155	2,452±0,149

^x $p<0,05$ u odnosu na sve eksperimentalne grupe

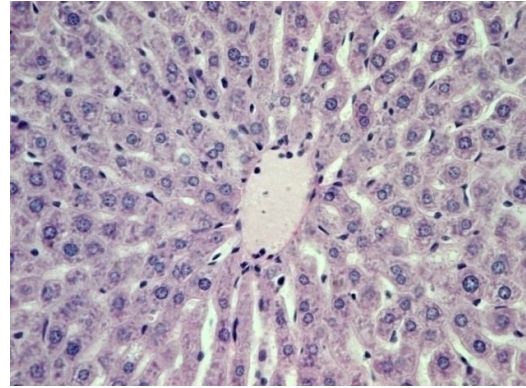
U **tabeli 63** se uočava da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji CAT u jetri između ispitivanih grupa 7-dnevnog tretmana ($F=2,075$, $p=0,139$). Statistički značajna razlika u koncentraciji CAT u jetri postoji između ispitivanih grupa 21-dnevnog tretmana ($F=7,330$, $p=0,002$). Razlika je statistički značajna između grupe koja je pre ugljen-tetrahlorida tretirana gljivom u dozi od 1,67 g/kg i svih drugih eksperimentalnih grupa. Statistički značajna razlika u koncentraciji CAT u jetri ne postoji između ispitivanih grupa 42-dnevnog tretmana ($F=3,123$, $p=0,066$).

5.4. MORFOLOŠKA ISPITIVANJA

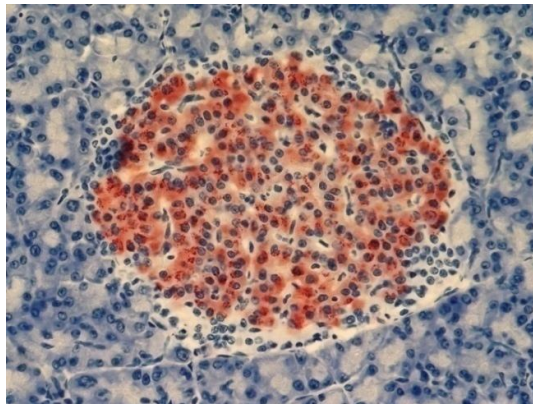
5.4.1. Životinje tretirane fiziološkim rastvorom



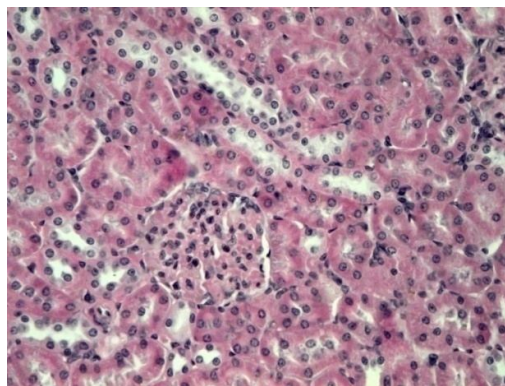
Slika 1. Jetreni lobulus životinje tretirane fiziološkim rastvorom, H&E, 100x



Slika 2. Vena centralis sa pravilnim radijalnim rasporedom hepatocita životinje tretirane fiziološkim rastvorom, H&E, 400x



Slika 3. Langerhansovo ostrvce životinje tretirane fiziološkim rastvorom, bojeno imunohistochemijskom metodom na insulin, 400x



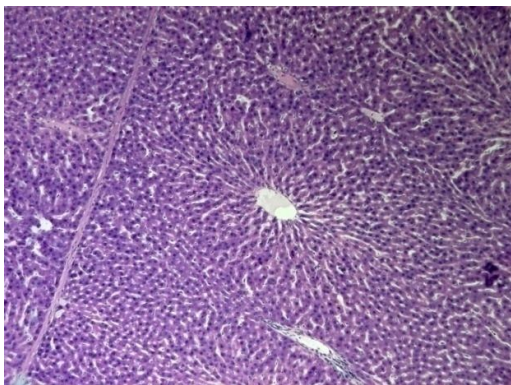
Slika 4. Glomerul i bubrežni kanalići životinje tretirane fiziološkim rastvorom, H&E, 400x

Histološkom analizom jetrenog tkiva životinja tretiranih fiziološkim rastvorom 7, 21 i 42 dana uočava se pravilna citoarhitektonika jetrenog lobulusa izgrađenog od pravilno centralno pozicionirane vene centralis i radijalno raspoređenih hepatocita u vidu Remakovih gredica (**Slika 1 i 1**). Sinusoidalni kapilari su uobičajenih dimenzija, bez limfocitnog infiltrata, a Kiernanove prostore čine jasno izražene arterija i vena interlobularis, kao i dva ili više bilijanih kanalića. Hepatocite karakteriše jasna, homogena citoplazma sa centralno pozicioniranim jedrom uobičajenih dimenzija (**Slika 1 i 1**).

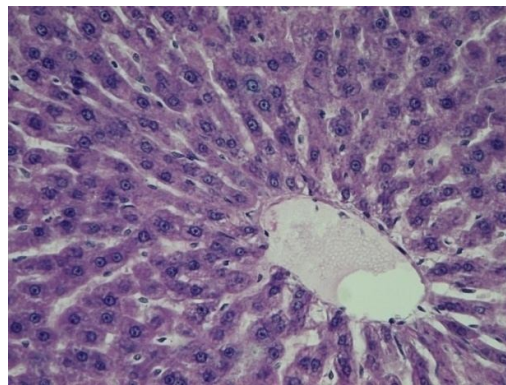
Tkivo pankreasa se karakteriše pravilnom citoarhitektonikom egzokrinih acinusa kao i jasno uočljivih Langerhansovih ostrvaca, obično pozicioniranih dublje u parenhimu pankreasa. Primenom specifičnog imunohistohemijskog bojenja jasno se uočavaju centralno pozicionirane beta ćelije (**Slika 3**).

Histološkom analizom bubrežnog tkiva uočava se pravilna histološka građa glomerula kao i bubrežnih kanalića, kako proksimalnih tako i distalnih izuvijanih i pravih. Kanalići su obloženi dobro diferentovanim, prostim kockastim epitelom. Sabirni kanalići u medularnom kompartmanu bubrega su bez prisutnog sadržaja obloženi prostim kockastim epitelom (**Slika 4**).

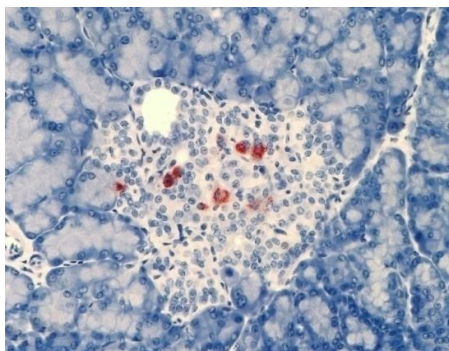
5.4.2. Životinje tretirane aloksanom



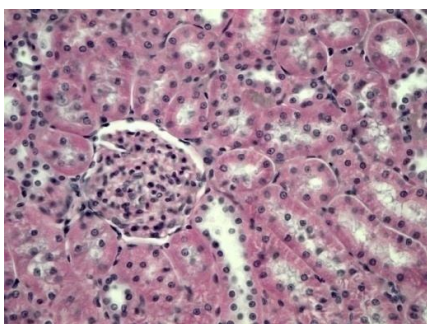
Slika 5. Jetreni lobulus životinje tretirane aloksanom, a zatim fiziološkim rastvorom, H&E, 100x



Slika 6. Vena centralis sa pravilnim radijalnim rasporedom hepatocita životinje tretirane aloksanom, a zatim fiziološkim rastvorom, H&E, 400x



Slika 7. Langerhansovo ostrvce životinje tretirane aloksanom, a zatim fiziološkim rastvorom, bojeno imunohistohemijskom metodom na insulin, 400x



Slika 8. Glomerul i bubrežni kanalići životinje tretirane aloksanom, a zatim fiziološkim rastvorom, H&E, 400x

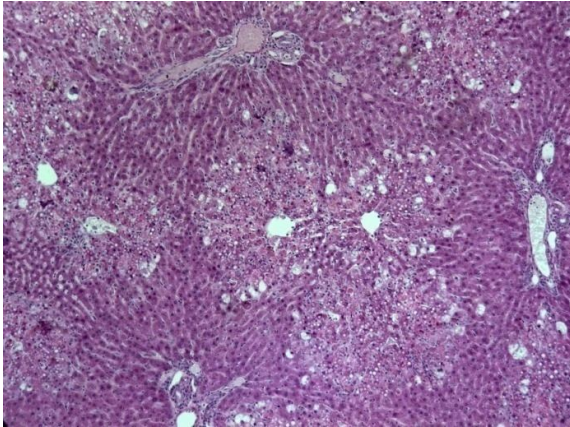
Histološkom analizom jetrenog tkiva životinja tretiranih aloksanom u dozi od 150 mg/kg i.p., te fiziološkim rastvorom u dozi od 1 mg/kg 7, 21 i 42 dana uočava se pravilna citoarhitektonika jetrenog lobulusa koji čini centralno pozicionirana vena centralis i radijalno raspoređeni hepatociti u vidu Remakovih gredica (**Slika 5 i 6**). Sinusoidalni kapilari su uobičajenih dimenzija, a Kiernanove prostore čine jasno izražena arterija i vena interlobularis i žučni kanalići. Hepatociti se odlikuju jasnom, homogenom citoplazmom sa centralno pozicioniranim jedrom uobičajenih dimenzija (**Slika 5 i 6**).

Nakon jednokratne primene aloksana kod malog broja jedinki u egzokrinom delu pankreasa mogu se uočiti fokalne nakupine limfocitnog infiltrata. U eksperimentalnoj grupi žrtvovanoj nakon 7, 21 i 42 dana od primene aloksana mogu se uočiti relativno slabi znaci regeneracije beta ćelija Langerhansovog ostrvceta (**Slika 7**).

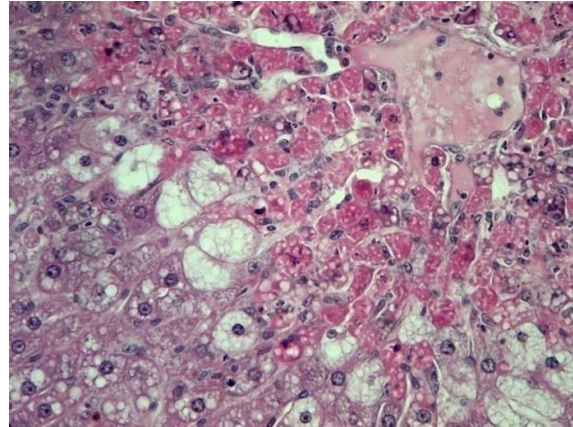
Histološkom analizom bubrežnog tkiva kod jedinki žrtvovanih nakon 7, 21 i 42 dana od jednokratne primene aloksana uočava se pravilna histološka građa bubrežnih korpuskula kao i kanalića, kako proksimalnih tako i distalnih, izuvijanih i pravih. Kanalići su obloženi dobro

diferentovanim, prostim kockastim epitelom. Histološki nalaz ne odstupa od normalnog (**Slika 8**).

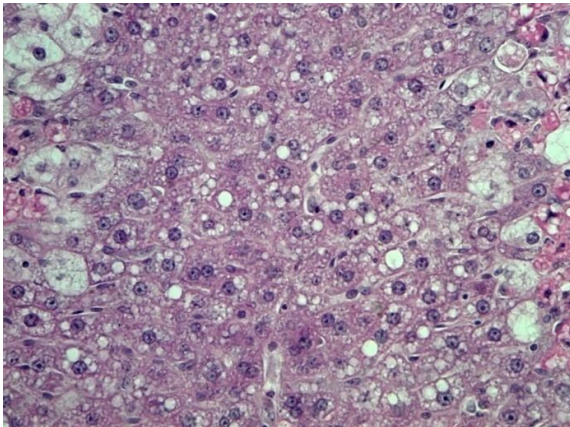
5.4.3. Životinje tretirane ugljen-tetrahloridom



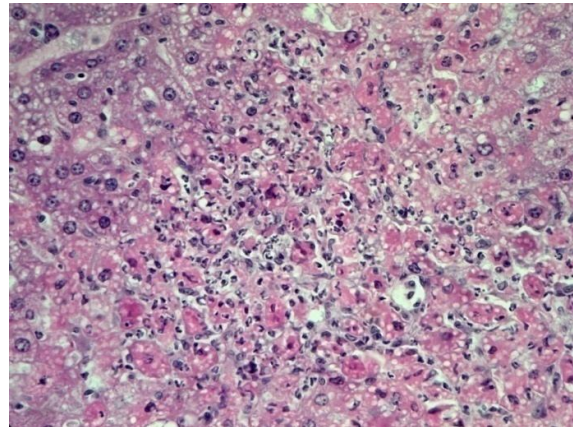
Slika 9. Jetreni lobulus životinje tretirane ugljen-tetrahloridom, a zatim fiziološkim rastvorom, H&E, 100x



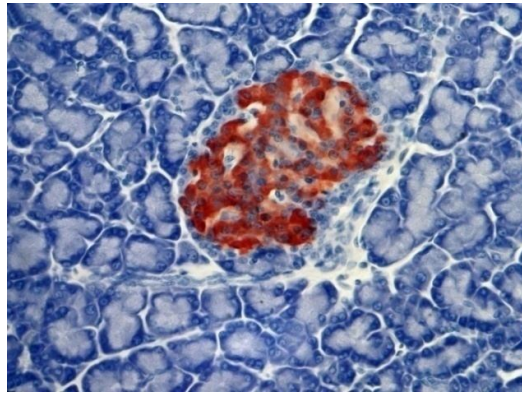
Slika 10. Acidofilna degeneracija i koagulaciona nekroza hepatocita životinje tretirane ugljen-tetrahloridom, a zatim fiziološkim rastvorom, H&E, 400x



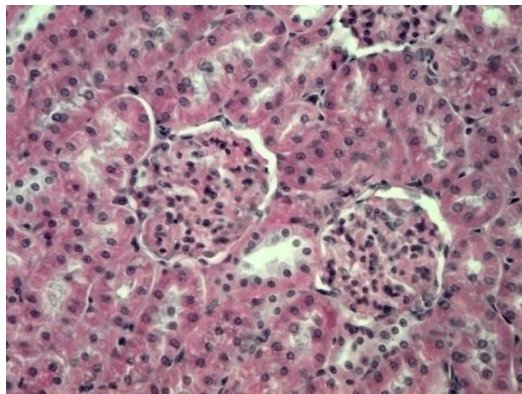
Slika 11. Masna degeneracija hepatocita periferne zone jetrenog lobulusa životinje tretirane ugljen-tetrahloridom, a zatim fiziološkim rastvorom, H&E, 400x



Slika 12. Neutrofilna infiltracija nekrotičnih hepatocita životinje tretirane ugljen-tetrahloridom, a zatim fiziološkim rastvorom, H&E, 400x



Slika 13. Langerhansovo ostrvce životinje tretirane ugljen-tetrahloridom, a zatim fiziološkim rastvorom, imunohistohemijsko bojenje na insulin, 400x



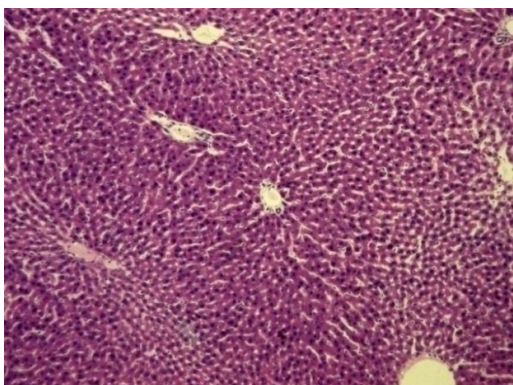
Slika 14. Glomeruli i bubrežni kanalići životinje tretirane ugljen-tetrahloridom, a zatim fiziološkim rastvorom, H&E, 400x

Histološkom analizom jetrenog tkiva pacova koji su tretirani 7, 21, 42 dana fiziološkim rastvorom, a zatim žrtvovani 24 časa nakon jednokratne primene CCl_4 uočavaju se jasni znaci konfluentne nekroze koja zahvata centrolobularnu i delimično intermedijernu zonu klasičnog jetrenog režnjača (**Slika 9**). Centrolobularno se mogu uočiti jasni znaci acidofilne degeneracije i koagulacione nekroze hepatocita čija je citoplazma intenzivno eozinofilno probojena dok su jedra piknotična. U intermedijernoj zoni mogu se uočiti hepatociti u vidu matiranog stakla ("groundglass" hepatociti) kao i jasni znaci masne degeneracije (**Slika 10**). U perifernoj zoni klasičnog jetrenog lobulusa promene na hepatocitima su uglavnom po tipu masne degeneracije sa prisutnim mnoštvom intracitoplazmatskih masnih kapljica (**Slika 11**). U područjima koagulacione nekroze hepatocita može se uočiti obilni neutrofilni infiltrat koji ispunjava sinusoidalne prostore (**Slika 12**).

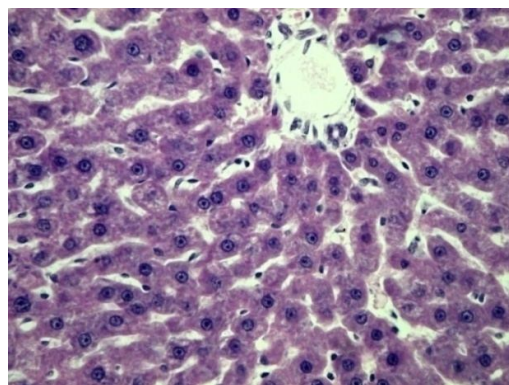
Tkivo pankreasa istih životinja karakteriše pravilna citoarhitektonika egzokrinih acinusa kao i jasno uočljiva, očuvana Langerhansova ostrvca, obično pozicionirana u periduktalnim područjima. Primenom specifičnog imunohistohemijskog bojenja jasno se mogu uočiti centralno pozicionirane beta ćelije (**Slika 13**). Histološki nalaz ne odstupa od normalnog.

Histološkom analizom bubrežnog tkiva može se uočiti pravilna građa bubrežnih korpuskula kao i kanalića, kako proksimalnih tako i distalnih izuvijanih i pravih. Kanalići su obloženi dobro diferentovanim, prostim kockastim epitelom (**Slika 14**). Histološki nalaz ne odstupa od normalnog.

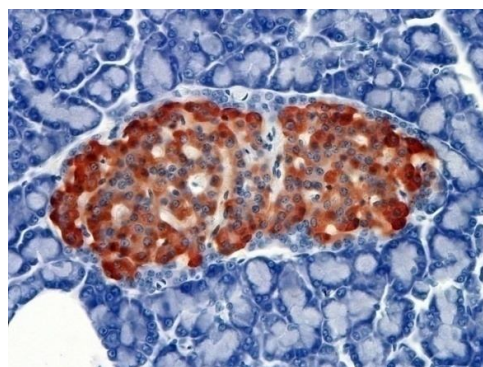
5.4.4. Životinje tretirane gljivom *Coprinus comatus*



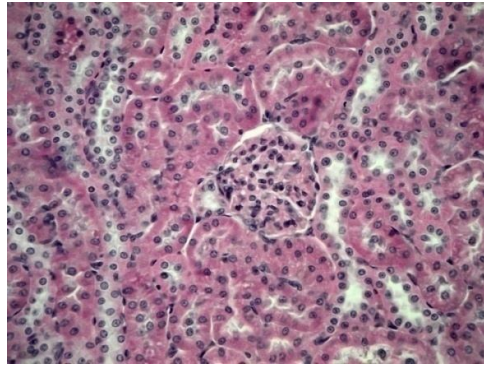
Slika 15. Jetreni lobulus životinje tretirane vodenom suspenzijom gljive *C. comatus*, H&E, 100x



Slika 16. Vena centralis sa pravilnim radijalnim rasporedom hepatocita životinje tretirane vodenom suspenzijom gljive *C. comatus*, H&E, 400x



Slika 17. Langerhansovo ostrvce životinje tretirane vodenom suspenzijom gljive *C. comatus*, imunohistohemijsko bojenje na insulin, 400x



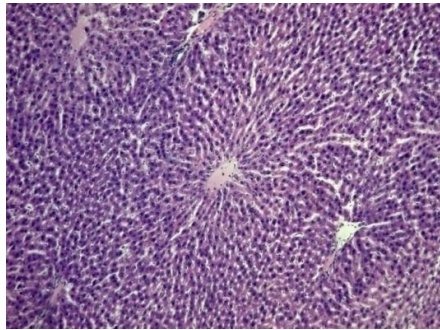
Slika 18. Glomerul i bubrežni kanalići životinje tretirane vodenom suspenzijom gljive *C. comatus*, H&E, 400x

Histološkom analizom jetrenog tkiva životinja nakon višekratne primene gljive *C. comatus* može se uočiti pravilna građa jetrenog lobulusa sačinjenog od pravilno pozicionirane vene centralis i radialno raspoređenih hepatocita u vidu Remakovih gredica (**Slika 15**). Sinusoidalni kapilari su uobičajenih dimenzija, bez limfocitnog infiltrata, a Kiernanove prostore čine jasno izražene arterija i vena interlobularis, kao i dva ili više bilijarnih kanalića. Hepatocite karakteriše jasna, homogena citoplazma sa centralno pozicioniranim jedrom uobičajenih dimenzija (**Slika 16**). Histološki nalaz tkiva jetre životinja tretiranih 7, 21 i 42 dana gljivom *C. comatus*, u svim ispitivanim dozama, ne odstupa od normalnog.

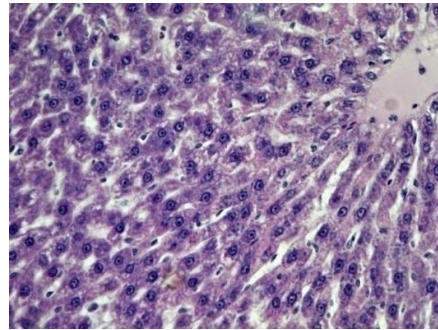
Tkivo pankreasa jedinki pacova nakon višekratne primene gljive *C. comatus* karakteriše pravilna citoarhitektonika egzokrinih acinusa kao i jasno diferencirana Langerhansova ostrvca, u najvećem broju slučajeva periduktalno locirana. Primena specifičnog imunohistohemijskog bojenja potvrđuje uobičajeni raspored beta ćelija u centru ostrvceta (**Slika 17**). Histološki nalaz tkiva pankreasa životinja tretiranih 7, 21 i 42 dana gljivom *C. comatus*, u svim ispitivanim dozama, ne odstupa od normalnog.

Histološkom analizom bubrežnog tkiva jedinki pacova nakon višekratne primene gljive *C. comatus* uočava se pravilna histološka građa glomerula kao i bubrežnih kanalića, kako proksimalnih tako i distalnih izuvijanih i pravih. Kanalići su obloženi dobro diferentovanim, prostim kockastim epitelom. Sabirni kanalići u medularnom kompartmanu bubrega su bez prisutnog sadržaja obloženi prostim kockastim epitelom (**Slika 18**). Histološki nalaz tkiva bubrega životinja tretiranih 7, 21 i 42 dana gljivom *C. comatus*, u svim ispitivanim dozama, ne odstupa od normalnog.

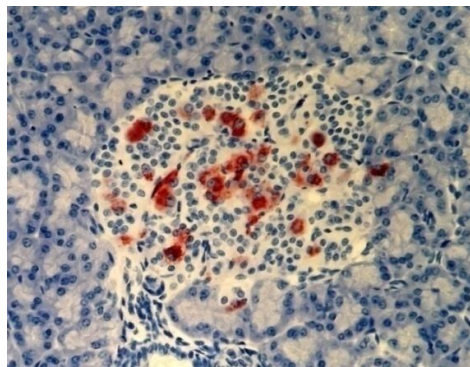
5.4.5. Životinje tretirane aloksanom i gljivom *Coprinus comatus*



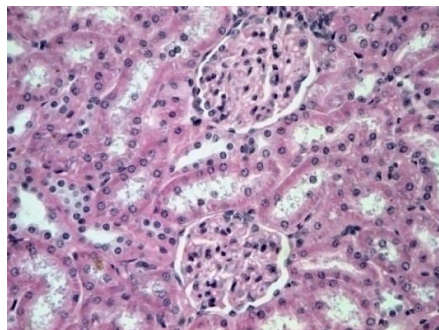
Slika 19. Jetreni lobulus životinje tretirane aloksanom, a zatim gljivom *C. comatus*, H&E, 100x



Slika 20. Vena centralis sa pravilnim radijalnim rasporedom hepatocita životinje tretirane aloksanom, a zatim gljivom *C. comatus*, H&E, 400x



Slika 21. Langerhansovo ostrvce životinje tretirane aloksanom, a zatim gljivom *C. comatus*, bojeno imunohistochemijskom metodom na insulin, 400x



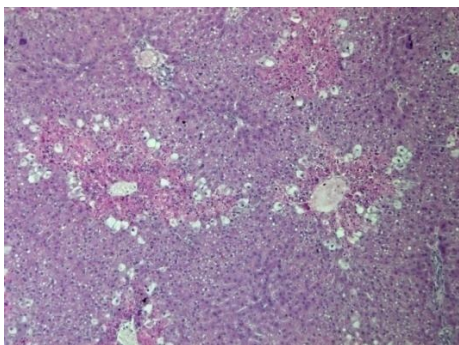
Slika 22. Glomeruli i bubrežni kanalići životinje tretirane aloksanom, a zatim gljivom *C. comatus*, H&E, 400x

Histološkom analizom jetrenog tkiva životinja tretiranih aloksanom u dozi 150 mg/kg, a nakon toga 7, 21 i 42 dana gljivom *C. comatus* u tri različite doze, uočava se pravilna citoarhitektonika jetrenog lobulusa sa centralno postavljenom venom centralis i radijalno raspoređenim hepatocitima jasne, homogene citoplazme, centralno pozicioniranog jedra uobičajenih dimenzija (**Slika 19 i 20**).

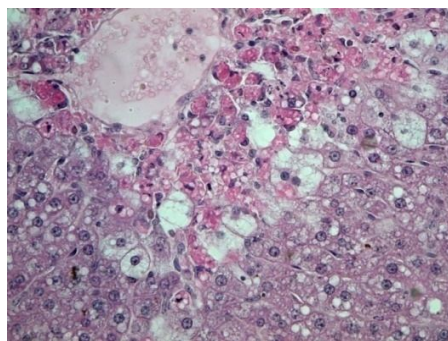
Histološkom analizom tkiva pankreasa životinja tretiranih aloksanom u dozi 150 mg/kg, a nakon toga 7, 21 i 42 dana gljivom *C. comatus* u tri različite doze, mogu se uočiti uniformni regenerativni znaci endokrinog dela pankreasa. U poređenju sa jedinkama bez posttretmana gljivom možemo uočiti znatno veći broj pretežno centralno pozicioniranih beta ćelija, sa slabije imunopozitivnom citoplazmom i velikim, hipetrofičnim jedrima (**Slika 21**).

Histološkom analizom bubrežnog tkiva životinja tretiranih aloksanom u dozi 150 mg/kg, a nakon toga 7, 21 i 42 dana gljivom *C. comatus* u tri različite doze, uočava se pravilna histološka građa glomerula kao i bubrežnih kanalića, kako proksimalnih tako i distalnih izuvijanih i pravih. Kanalići su obloženi dobro diferentovanim, prostim kockastim epitelom. Sabirni kanalići u medularnom kompartmanu bubrega su bez prisutnog sadržaja, obloženi prostim kockastim epitelom (**Slika 22**). Histološki nalaz ne odstupa od normalnog.

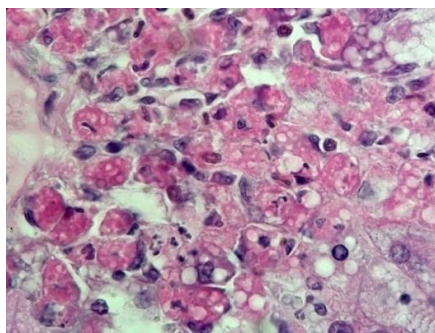
5.4.6. Životinje tretirane gljivom *Coprinus comatus* i ugljen-tetrahloridom



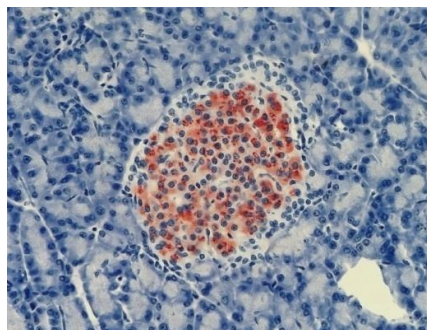
Slika 23. Jetreni lobulus životinje tretirane gljivom *C. comatus*, a zatim ugljen-tetrahloridom, H&E, 100x



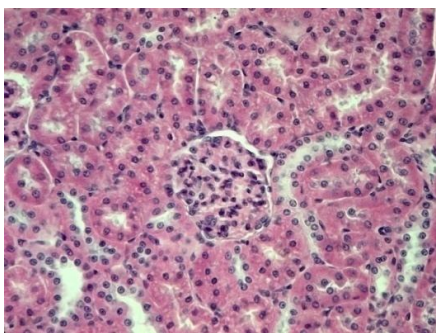
Slika 24. Hepatociti perivenularne regije životinje tretirane gljivom *C. comatus*, a zatim ugljen-tetrahloridom, H&E, 400x



Slika 25. Nekrotični hepatociti centrolobularne zone jetrenog klasičnog lobulusa životinje tretirane gljivom *C. comatus*, a zatim ugljen-tetrahloridom, H&E, 1000x



Slika 26. Langerhansovo ostrvce životinje tretirane gljivom *C. comatus*, a zatim ugljen-tetrahloridom, bojeno imunohistochemijskom metodom na insulin, 400x



Slika 27. Glomerul i bubrežni kanalići životinje tretirane gljivom *C. comatus*, a zatim ugljen-tetrahloridom, H&E, 400x

Histološkom analizom jetrenog tkiva životinja tretiranih 7, 21 i 42 dana gljivom *C. comatus* u tri različite doze, a zatim ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg uočavaju se jasni znaci konfluentne nekroze koja zahvata centrolobularnu i delimično intermedijernu zonu klasičnog jetrenog kanalića. Neretko mogu se uočiti i znaci *bridging* nekroze po centro-centralnom tipu spajajući dve centrolobularne nekrotične zone (**Slika 23**). Hepatociti se odlikuju

acidofilnom degeneracijom i koagulacionom nekrozom hepatocita (**Slika 24**). Često je spoljašnja ivica hepatocita romboidnog izgleda (**Slika 25**). U intermedijernoj zoni mogu se uočiti hepatociti u vidu matiranog stakla ("groundglass" hepatociti) kao i jasni znaci masne degeneracije (**Slika 24**). Hepatocite periferne zone klasičnog jetrenog lobulusa odlikuje masna degeneracije sa mikro i makrocitoplazmatskim masnim kapljicama. Patohistološki nalaz ne odstupa od nalaza jedinki sa tretmanom fiziološkim rastvorom, a zatim ugljen-tetrahloridom.

Histološkom analizom tkiva pankreasa životinja tretiranih 7, 21 i 42 dana gljivom *C. comatus* u tri različite doze, a zatim ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg uočava se pravilna citoarhitektonika egzokrinih acinusa kao i jasno uočljiva očuvana Langerhansova ostrvca, obično pozicionirana u periduktalnim područjima. Primenom specifičnog imunohistohemiojskog bojenja jasno se mogu uočiti centralno pozicionirane beta ćelije (**Slika 26**). Histološki nalaz ne odstupa od normalnog.

Histološkom analizom tkiva pankreasa životinja tretiranih 7, 21 i 42 dana gljivom *C. comatus* u tri različite doze, a zatim ugljen-tetrahloridom u dozi od 2 ml/kg može se uočiti pravilna građa bubrežnih korpuskula kao i kanalića, kako proksimalnih tako i distalnih izuvijanih i pravih. Kanalići su obloženi dobro diferentovanim, prostim kockastim epitelom (**Slika 27**). Histološki nalaz ne odstupa od normalnog.

6. DISKUSIJA

6.1. Uticaj na telesnu masu

U uvodnom delu je navedeno da se gljive već vekovima koriste u ishrani ljudi zbog svoje velike nutritivne vrednosti, odnosno povoljnog sadržaja ugljenih hidrata, proteina i masti. Postalo je jasno da one mogu imati veliki uticaj na telesnu masu.

U ovom ispitivanju, uticaj gljive *C. comatus* na telesnu masu eksperimentalnih životinja je uočen već nakon 7-dnevne primene. Poredeći početne i krajnje vrednosti telesne mase grupa životinja koje su tretirane fiziološkim rastvorom ili gljivom *C. comatus* u tri različite doze tokom 7 dana, zapaža se statistički značajan porast telesne mase svih eksperimentalnih grupa, osim kod grupe koja je dobijala gljivu u najvećoj dozi (3,34 g/kg). Poredeći promenu telesne mase, u **Tabeli 1** se vidi da je ona najmanja u grupi životinja koja je dobijala gljivu u najvećoj dozi, te da je postojala dozna zavisnost promene. Slični rezultati su dobijeni i u druga dva vremenska intervala, 21-dnevni i 42-dnevni tretman, s tim što nije ispoljena statistička značajnost promene telesne mase i korelacije između promene telesne mase i primenjene doze gljive.

Rezultati prethodnog istraživanja sprovedenog u Zavodu za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju su isto tako pokazali da 7-dnevni tretman gljivom *C. comatus* značajno sprečava porast telesne mase eksperimentalnih životinja u odnosu na one koje su dobijale fiziološki rastvor (Sabo A., 2010).

Tretman eksperimentalnih životinja prooksidativnim supstancama, aloksanom i ugljen-tetrahloridom, značajno je uticao na njihovu telesnu masu. Tretman gljivom *C. comatus*, u skoro svim grupama, uspeo je da spreči smanjenje telesne mase uzrokovano primenom ili aloksana ili ugljen-tetrahlorida. Drugim rečima, primena gljive *C. comatus* je doprinela porastu telesne mase životinja kod kojih je izazvan aloksanski insulin zavisni dijabetes, ili toksični hepatitis sa izrazitom nekrozom tkiva jetre uzrokovan ugljen-tetrahloridom.

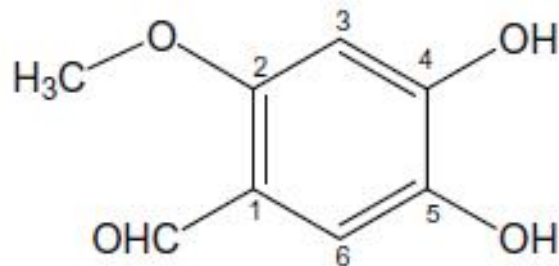
Slični rezultati su dobijeni i u istraživanjima drugih autora. Još davne 1984. godine Bailey i saradnici su ustanovili da gljiva *C. comatus* može značajno uticati na telesnu masu eksperimentalnih miševa (Bailey C. J., 1984). U istraživanju Han-a i Liu-a je navedeno da su miševi koji su nakon aloksana tretirani 10 dana gljivom *C. comatus* imali statistički značajno veći porast telesne mase u odnosu na miševe koji su nakon toga dobijali fiziološki rastvor. U

istom istraživanju je navedeno da suvi ostatak gljive *C. comatus* ima veoma povoljan odnos hranljivih materija, jer sadrži 58,8% ugljenih hidrata (pretežno u formi polisaharida i nerastvorljivih ugljenih hidrata), 25,4% proteina i 3,3% masti, a ostatak odlazi na makro i mikroelemente, što delom objašnjava rezultate merenja telesne mase (Han C., 2009). Yu i saradnici su izolovali polisaharide iz gljive *C. comatus* i rastvorom tih polisaharida su 20 dana tretirali miševe kojima je pre toga izazvan aloksanski dijabetes. Rezultati tog istraživanja su pokazali da primena polisaharida iz gljive *C. comatus* dovodi do porasta telesne mase dijabetičnih životinja za razliku od onih bez tretmana gljivom, gde se taj efekat ne uočava (Yu J., 2009).

6.2. Uticaj na koncentraciju šećera u krvi

Tačan mehanizam povoljnog uticaja gljive *C. comatus* na šećernu bolest još uvek nije otkriven, te je jedan od ciljeva novih istraživanja rešenje tog problema. Pre nekoliko godina iz gljive *C. comatus* je izolovana supstanca 4,5-dihidroksi-2-metioksi-benzaldehid (komatin; **Slika 28**) za koju se smatra da je odgovorna za antidijabetička svojstva gljive. Pretpostavlja se da komatin, zahvaljujući svojoj hemijskoj strukturi, inhibiše neenzimsku glikozilaciju proteina. Komatin je po svojoj hemijskoj strukturi veoma sličan rutinu, supstanci za koju je već dokazano da inhibiše neenzimsku glikozilaciju i poseduje antidijabetička svojstva. Reakcije neenzimske glikozilacije su reakcije između šećera i amino grupa proteina koje dovode do nastanka krajnjih produkata kao što su glikozilirani hemoglobin, amiloidni proteini, fruktozamini i drugi. Krajnji produkti neenzimske glikozilacije proteina su odgovorni za nastanak dijabetesnih komplikacija, odnosno mikro i makroangiopatskih promena (Ding Z., 2010; Ding Z., 2012; Zhang Z., 2007; Kamalakkannan N., 2006).

U studiji Ding-a i saradnika određivana je koncentracija fruktozamina u krvi pacova kojima je dijabetes izazvan aloksanom. Poredeći rezultate grupa životinja koje su dobijale komatin sa kontrolnom grupom, uočeno je da je tretman komatinom uspeo da snizi vrednosti fruktozamina. U istoj studiji, tretman komatinom je poređen sa tretmanom metforminom, standardnim lekom u terapiji dijabetes melitusa. Komatin je, kao i metformin, snizio koncentraciju glukoze u krvi eksperimentalnih životinja natašte, kao i nakon oralnog davanja rastvora glukoze (Ding Z., 2010).



Slika 28. Hemijska struktura komatina

U istraživanju Ding-a i saradnika iz 2012. godine je otkriveno da i druge supstance iz *C. comatus*-a mogu da dovedu do inhibicije neenzimske glikozilacije. Oni su otkrili da i ekstracelularni i intracelularni polisaharidi izolovani iz gljive *C. comatus* imaju jak inhibitorski efekat na neenzimsku glikozilaciju *in vitro*. Postoje istraživanja u kojima se tvrdi da inhibicija neenzimske glikozilacije može dovesti i do sniženja koncentracije glukoze u krvi, a to u kombinaciji sa smanjenjem nastanka krajnjih produkata glikozilacije dovodi do pozitivnog efekta kod dijabetes melitusa (Ding Z., 2012; Zhang Z., 2007).

Polisaharidi izolovani ne samo iz gljive *C. comatus*, već i iz gljiva *Cerrena unicolor* i *Lenzites betulina*, takođe poseduju hipoglikemijski efekat. Yamac i saradnici ovaj efekat objašnjavaju strukturnim osobinama i viskoznošću polisaharida iz navedenih gljiva. Naime, hidrosolubilna dijetetska vlakna, koja su ujedno visoko viskozna, produžavaju vreme pražnjenja želuca. To dalje odlaže varenje i resorpciju ugljenih hidrata u crevima, što na kraju sprečava brzi ulazak glukoze u krvotok (Yamac M., 2009).

U preglednom članku o jestivim gljivama kao izvoru dijetnih vlakana se navodi da i one mogu, pored leguminoza, voća i povrća, obezbediti značajne količine dijetnih vlakana u ishrani ljudi. Ćelijski zid gljiva sadrži jedinjenja ugljenih hidrata koji se klasifikuju kao dijetna vlakna, kao što su hitin (polimer N-acetil-glukozamina), β -D-glukani i manani. Ova jedinjenja su nesvarljivi ugljeni hidrati otporni na dejstvo ljudskih enzima za varenje. Ugljeni hidrati su glavna komponenta gljiva, čineći u nekim vrstama i do 70% suve materije. Od toga, veliki procenat čine nesvarljivi ugljeni hidrati, uključujući oligosaharide kao što je trehaloza, i ranije navedene polisaharide, hitin, β -glukane i manane. Kao što su zaključili Yamac i saradnici, i u ovom istraživanju se navodi da dijetna vlakna usporavaju pražnjenje želuca i smanjuju resorpciju

ugljenih hidrata, te na taj način ispoljavaju antihiperglikemijsko dejstvo. Što se tiče same gljive *C. comatus*, uočava se da je ona jedna od gljiva sa najvećim procentom dijetnih vlakana, od onih koje su u ovoj studiji ispitivane. Kalač navodi da je poređenjem preko 20 vrsta jestivih gljiva otkrio da *C. comatus* poseduje najveću koncentraciju trehaloze, slabo rastvorljivog oligosaharida, koji usporava resorpciju glukoze. Proizlazi da je inhibicija resorpcije glukoze jedan od mehanizama povoljnog dejstva *C. comatus*-a u regulaciji poremećaja metabolizma ugljenih hidrata (Cheung C. K., 2013; Kalač P., 2013).

Još jedan mogući mehanizam hipoglikemijskog dejstva gljiva su predložili Zhang i Lin. Oni su izučavali hipoglikemijske efekte polisaharida izolovanih iz gljive *Ganoderma lucidum*. U *in vitro* uslovima antagonizovan je stimulatívni efekat polisaharida iz gljive *Ganoderma lucidum* na oslobađanje insulina iz beta ćelija pankreasa pomoću verapamila. Verapamil je lek koji blokira Ca^{2+} kanale, odnosno ulazak Ca^{2+} jona u ćeliju. Ulazak Ca^{2+} jona u beta ćelije pankreasa dovodi do oslobađanja insulina iz njih. Tako da se može zaključiti da polisaharidi iz gljive *Ganoderma lucidum* imaju uticaja na oslobađanje već sintetisanog insulina i na taj način ispoljavaju hipoglikemijsko dejstvo, što bi moglo da važi i za *Coprinus comatus* kao gljivu koja isto tako produkuje velik broj različitih polisaharida (Zhang H. N., 2004; Ding Z., 2012).

U našem istraživanju 7-dnevni tretman gljivom *C. comatus* nije uspeo da spreči porast glikemije uzrokovan primenom aloksana. Za razliku od 7-dnevnog, prilikom 21-dnevnog i 42-dnevnog tretmana vodenom suspenzijom gljive životinja sa aloksanskim dijabetesom došlo je do značajnog sniženja glikemije u odnosu na grupu koja je nakon aloksana dobijala fiziološki rastvor. U 42-dnevnom tretmanu je uočena i dozna zavisnost hipoglikemijskog efekta.

Ako uzmemo u obzir histološki izgled Langerhansovih ostrvaca koja su bojena imunohistohemijskom metodom na insulin, dobijamo potvrdu rezultata određivanja koncentracije glukoze u krvi životinja sa aloksanskim dijabetesom. U grupama životinja koje su nakon aloksana dobijale vodenu suspenziju gljive *C. comatus* uočavaju se jasni znaci regeneracije pankreasa za razliku od životinja kontrolne grupe u svim dozama i vremenskim intervalima. Naime, porast broja beta ćelija Langerhansovog ostrvca se uočava sa povećanjem doze, odnosno dužinom tretmana, te se može reći da je *C. comatus* pospešio obnavljanje pankreasa koje postoji i u kontrolnim grupama, ali značajno manjeg intenziteta. Takođe treba napomenuti da se u istim grupama životinja uočavaju velika, hipertrofična jedra beta ćelija, što ukazuje na njihov ubrzan metabolizam (**Slika 21**).

U našem prethodnom istraživanju, histološkim pregledom isečaka pankreasa bojenih standardnom hematoksilin-eozin tehnikom, uočeno je da 7-dnevni tretman *C. comatus*-om u dozi od 1,67 g/kg dovodi do hipertrofije Langerhansovih ostrvaca pankreasa, što nije utvrđeno u kontrolnoj grupi. Takođe, u istom ogledu, tretman gljivom je smanjio oštećenje Langerhansovih ostrvaca izazvano aloksanom (Sabo A., 2010).

Yamac i saradnici su u ranije spomenutom ogledu ispitivali i histološke karakteristike pankreasa životinja sa aloksanskim dijabetesom i posttretmanom egzopolisaharidima izolovanim iz 3 vrste gljiva. Otkrili su da 7-dnevno davanje egzopolisaharida gljiva *Cerrena unicolor* ili *Coprinus comatus* ili *Lenzites betulina* dovodi do porasta površine Langerhansovih ostrvaca, kao i prosečnog broja ćelija u istim. Problem u ovom istraživanju je što se ne može proceniti broj beta ćelija, jer nije rađeno specifično bojenje. Zbog toga je nejasno je li uvećanje površine Langerhansovih ostrvaca posledica uvećanja i povećanja broja insulin-ćelija koje sintetišu insulin ili nekih drugih ćelija (Yamac M., 2009).

Yu i saradnici su, pored uticaja na telesnu masu, pratili i uticaj polisaharida iz *C. comatus*-a na glikemiju miševa sa aloksanskim dijabetesom. Uočeno je da 20-dnevni tretman polisaharidima, bilo da su oni obogaćeni selenom ili ne, dovodi do smanjenja hiperglikemije uzrokovane primenom aloksana (Yu J., 2009).

Sposobnost gljiva da preuzimaju i akumuliraju elemente u tragovima kao što su hrom, vanadijum, cink, magnezijum, bakar, gvožđe i nikal je iskorišćena i u studiji Lu-a i saradnika. Oni su takođe ispitivali uticaj gljive *C. comatus* na aloksanski dijabetes, ali su poredili grupu tretiranu *C. comatus*-om bez procesa obogaćenja i grupe koje su tretirane gljivom koja je obogaćena prethodno navedenim elementima. U ovoj studiji zaključak je da je najizrazitiji hipoglikemijski efekat uočeni u grupi životinja koje su tretirane *C. comatus*-om obogaćenim vanadijumom. U rezultatima se uočava da ni tretman gljivom koja nije obogaćena elementima u tragovima ne zaostaje puno u hipoglikemijskom efektu. Imajući u vidu toksičnost samog vanadijuma, može se zaključiti da se zadovoljavajući hipoglikemijski efekti mogu postići preparatima gljive *C. comatus* koji ne sadrže pomenute elemente (Lv Y., 2009).

Prilikom testa oralnog opterećenja glukozom je isto tako uočeni pozitivan efekat gljive *C. comatus* na glikemiju eksperimentalnih životinja. U svim grupama životinja, koje su 21 dan tretirane vodenom suspenzijom gljive, vrednosti šećera u krvi su statistički značajno niže nakon

izazivanja hiperglikemije koncentrovanim rastvorom glukoze u odnosu na kontrolnu grupu. U ovom slučaju gljiva je ispoljila antihiperglikemijski efekat.

U adrenalinskom testu nisu uočeni pozitivni efekti tretmana gljivom na glikemiju pacova. U nekim grupama tretiranim gljivom je čak došlo do značajnijeg povećanja glikemije u odnosu na kontrolnu grupu. Mehanizam kojim adrenalin dovodi do hiperglikemije se razlikuje u odnosu na prethodna dva testa. Adrenalin preko simpatičkih receptora aktivira glikogenolizu i glukoneogenezu i na taj način veoma brzo podiže koncentraciju glukoze u krvi. Može se pretpostaviti da tretman gljivom ne utiče na nagle promene glikemije, što se događa u adrenalinskom testu (Sabo A., 2010).

Rezultati ovog istraživanja su u skladu sa nalazima ogleđa sprovedenog ranije u Zavodu za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju, gde 7-dnevni tretman gljivom *C. comatus* u dozi od 1,67 g/kg nije uspeo da spreči porast glikemije uzrokovan adrenalinom. U istom ogleđu 7-dnevni tretman gljivom je uspeo da spreči porast glikemije uzrokovan oralnim davanjem koncentrovanog rastvora glukoze (Sabo A., 2010). Ipak, ovi nalazi su donekle u suprotnosti sa istraživanjem Han-a i saradnika. Rezultati njihovog istraživanja su pokazali da tretman gljivom *C. comatus* obogaćenom vanadijumom sprečava porast glikemije uzrokovan primenom adrenalina. Uticaj same gljive na ovaj efekat je teško proceniti, jer i sam vanadijum poseduje hipoglikemijsko dejstvo, a u ispitivanje nisu uključene grupe životinja koje su dobijale gljivu koja nije obogaćena vanadijumom (Han C., 2009).

6.3. Uticaj na koncentraciju lipida u krvi

Sposobnost gljiva da povoljno utiču na lipidni status je već decenijama poznata činjenica naučnoj javnosti. Kao što je rečeno u uvodnom delu, iz gljiva je izolovan prvi lek sposoban da utiče na sintezu holesterola, mevastatin (Tobert J. A., 2003). Kasnije je modifikacijom sintetisana čitava grupa lekova za sniženje serumskog holesterola, koji s jedne strane imaju visoku kliničku efikasnost u prevenciji i terapiji bolesti kardiovaskularnog sistema, a s druge strane to su jedni od najprodavanijih i najčešće propisivanih lekova na svetu (Sabo A., 2011).

Lovastatin, odnosno mevinolin, kako su ga prvobitno nazvali naučnici koji su ga otkrili, sledeći je statin izolovan iz gljive. On je krajem sedamdesetih godina prošlog veka izolovan iz gljive *Aspergillus terreus* i prvi je statin koji je ušao u kliničku upotrebu. Osim gljive *Aspergillus*

terreus i u drugim gljivama su pronađene značajne koncentracije lovastatina, a među njima najznačajnije je pomenuti jestivu gljivu, bukovaču (*Pleurotus ostreatus*), koja je karakteristična i za područje Srbije (Tobert J. A., 2003; Schneider I., 2011; Aarons C.B., 2007; Bobek P., 1998). Dokazano je da je lovastatin sekundarni metabolit nekih vrsta gljiva. On inhibiše 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A reduktazu (HMG-CoA reduktazu), enzim koji je neophodan za sintezu holesterola. Na taj način smanjuje koncentraciju ukupnog i LDL holesterola, čime se smanjuje rizik od kardiovaskularnih oboljenja. Takođe je dokazano da statini poseduju i antiinflamatorne, antioksidantne i profibrinolitičke osobine i da preveniraju akutni koronarni sindrom, kao i nastanak aterosklerotskih promena (Aarons C. B., 2007).

Za gljivu bukovaču se smatra da je jedna od gljiva sa najvećom koncentracijom lovastatina. Pored toga što je dokazano da primena ove gljive snižava i ukupan i LDL holesterol, ona snižava i koncentraciju ukupnih triglicerida, a povišava koncentraciju HDL holesterola kod eksperimentalnih životinja. Jednim delom, ovaj efekat se može objasniti visokom koncentracijom lovastatina, ali se ne može isključiti ni delovanje drugih supstanci, prisutnih u gljivama. Tako je iz gljive *Lentinus edodes*, popularno nazvane šitake, izolovana aktivna supstanca eritadenin. Za ovaj derivat adenina je poznato da dovodi do sniženja koncentracije ukupnog holesterola kod životinja i ljudi (Schneider I., 2011; Aarons C. B., 2007; Bobek P., 1998).

Rezultati određivanja koncentracije lovastatina u medicinskim i jestivim gljivama rađenog od strane Chen-a i saradnika su pokazali da one sadrže značajne koncentracije ovog sekundarnog metabolita. Jedna od ispitivanih gljiva je bila i gljiva *C. comatus* u kojoj je pronađen lovastatin ali njegova koncentracija je bila među nižim u poređenju sa ostalim gljivama. Pored lovastatina u *C. comatus*-u su detektovani još neki sekundarni metaboliti od značaja, a to su γ -amino buterna kiselina (GABA) i ergotionein. Treba napomenuti da su ispitivani micelijumi i plodonosna tela gljiva i da su koncentracije lovastatina daleko veće u micelijumu nego u plodonosnim telima. Kako je dokazano da su gljive bogate lovastatinom, supstancom koja snižava endogenu produkciju holesterola, na taj način je i objašnjeno hipoholesterolemijsko dejstvo. Ako se ovome doda da gljive, gde spada i *C. comatus*, poseduju i neke druge metabolite kao što je GABA, koja snižava arterijski pritisak, jasan je povoljan efekat gljiva na kardiovaskularne poremećaje (Chen S., 2012).

Ukupan sadržaj masti u gljivama je nizak. Navodi se da u svežim gljivama procenat masti iznosi manje od 2%, dok je za većinu sušenih gljiva taj procenat oko 15. Iako je ukupan procenat masti nizak, gljive, uključujući i *C. comatus*, sadrže visok procenat esencijalnih masnih kiselina. Linoleinska kiselina, kao predstavnik polinezasićenih viših masnih kiselina, esencijalna je za ljudsku ishranu, a gljive je imaju u dovoljnim količinama. Pored linoleinske, u gljivama su prisutne i druge više masne kiseline: laurinska, miristinska, palmitinska, oleinska, α -linoleinska, arahidonska, eikozatrienoična, eikozapentanoična i druge. Odnos zasićenih i nezasićenih masnih kiselina ima velik uticaj na metabolizam lipida. Analize sadržaja masnih kiselina u gljivama su pokazale da su u mnogo većem procentu zastupljene nezasićene u odnosu na zasićene masne kiseline. Danas se za namirnice, koje sadrže nezasićene masne kiseline, kao što su maslinovo, suncokretovo, kukuruzno i sojino ulje, smatra da su to zdrave namirnice za ishranu ljudi. Naročito su korisne namirnice sa visokim sadržajem linoleinske i oleinske masne kiseline, a u studiji Vaz-a i saradnika je utvrđeno da *C. comatus* ima izrazito visok procenat ovih nezasićenih masnih kiselina. U istom radu se navodi da se visok sadržaj linoleinske i oleinske masne kiseline može iskoristiti u prevenciji ateroskleroze, ako se gljive uvedu u ishranu ljudi koji imaju poremećaj metabolizma masti. U većini gljiva, oko dve trećine ukupnog sadržaja identifikovanih masti čine linoleinska i oleinska masna kiselina (Vaz J. A., 2011; Yilmaz N., 2006; Kalac P., 2013, Akata I., 2012).

Kao što je diskutovano u delu o uticaju gljive na glikemiju pacova, može se reći da dijetna vlakna utiču i na nivo lipida u krvi oglednih životinja. To bi bio još jedan mehanizam hipolipemijskog dejstva gljiva. Više od polovine ukupne mase suve materije većine gljiva čine ugljeni hidrati, koji su pretežno nerastvorljivi ili slabo rastvorljivi, pa time imaju mali udeo u ukupnoj kalorijskoj vrednosti gljiva, a s druge strane svrstavaju se u dijetna vlakna. Hitin je jedan od najzastupljenijih ugljenih hidrata u gljivama, a predstavlja nerastvorljivi polisaharid koji ima velik uticaj na resorpciju masti. U preglednim člancima Cheung-a i Kalac-a se navodi da dijetna vlakna iz gljiva pored imunostimulišuće i antitumorske aktivnosti, poseduju i hipoglikemijsko (antihiperglikemijsko) i hipolipemijsko dejstvo (Kalac P., 2013; Cheung C. K., 2013).

Gljive imaju dobro izbalansiran odnos osnovnih hranljivih materija, visoku koncentraciju proteina i ugljenih hidrata u obliku dijetnih vlakana, a nisku koncentraciju masti, te nisku kalorijsku vrednost. Prema tome, može se reći da gljive spadaju u namirnice koje su idealne za

ishranu ljudi sa poremećajima metabolizma masti, kao što su hipertrigliceridemija i hiperholesterolemija (Kalac P., 2013; Cheung C. K., 2013; Vaz J. A., 2011).

Rezultati određivanja koncentracije lipida u našem istraživanju su pokazali da tretman gljivom *C. comatus* značajno utiče na metabolizam masti u različitim eksperimentalnim modelima. Uočeno je da 7-dnevni tretman gljivom *C. comatus* u dozi od 3,34 g/kg dovodi do značajnog sniženja koncentracije ukupnog holesterola kod životinja sa aloksanskim dijabetesom. Mada je i u većini drugih eksperimentalnih grupa tretiranih *C. comatus*-om niža koncentracija ukupnog holesterola u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu, statistička značajnost ove promene nije ispoljena. Slični rezultati su dobijeni i prilikom praćenja koncentracije ukupnih triglicerida. Kod eksperimentalnih životinja sa aloksanskim dijabetesom je došlo do sniženja koncentracije ukupnih triglicerida u grupama tretiranim *C. comatus*-om u sve tri doze nakon 21-dnevnog tretmana u poređenju sa grupom koja je dobijala aloksan. Iako je došlo do sniženja koncentracije ukupnih triglicerida u velikom broju grupa životinja koje su dobijale *C. comatus*, u nekim grupama je došlo do neočekivanog porasta nivoa triglicerida.

Analizom HDL frakcije holesterola je uočen pozitivan efekat tretmana gljivom *C. comatus* na eksperimentalnim životinjama sa aloksanskim dijabetesom. Iako nema statističke značajnosti, treba reći da je prilikom poređenja grupe životinja koja je nakon aloksana dobijala fiziološki rastvor i grupe životinja koje su tretirane *C. comatus*-om utvrđeno da postoji trend porasta koncentracije HDL holesterola sa povećanjem primenjene doze gljive u 42-dnevnom tretmanu. U drugim vremenskim intervalima tretmana grupa životinja sa aloksanskim dijabetesom ovaj efekat se ne uočava, što je i očekivano jer je za porast HDL holesterola potreban duži vremenski period. U metaanalizi 60 kontrolisanih studija rađenoj od strane Mensink-a i saradnika se navodi da zamena zasićenih masnih kiselina nezasićenim, nakon određenog vremena dovodi do porasta HDL holesterola (Mensink R. P., 2003). Nameće se zaključak da je povećanje koncentracije HDL holesterola izazvano gljivom *C. comatus* posledica visoke koncentracije nezasićenih masnih kiselina u samoj gljivi (Vaz J. A., 2011; Yilmaz N., 2006; Kalac P., 2013; Akata I., 2012). I u grupama koje su dobijale samo *C. comatus* se uočava porast HDL holesterola u odnosu na grupe koje su dobijale samo fiziološki rastvor, ali nije postignuta statistička značajnost niti korelacija promene.

Posmatrajući nivo LDL holesterola, uočeno je da tretman gljivom *C. comatus* nije uspeo da ispolji pozitivne rezultate. U eksperimentalnim grupama životinja sa aloksanskim

dijabetesom, 7-dnevni i 21-dnevni tretman gljivom je doveo do sniženja koncentracije LDL holesterola ali bez statističke značajnosti. U grupama životinja koje su tretirane ugljen-tetrahloridom, metabolizam masti je poremećen, jer je ova supstanca dovela do ozbiljnog oštećenja jetre, glavnog organa za metabolizam lipida. U ovim grupama se uočava porast LDL frakcije holesterola u grupama koje su pretretirane *C. comatus*-om u odnosu na pretretman fiziološkim rastvorom, sa statističkom značajnošću kod samo jedne eksperimentalne grupe.

Rezultati ovog istraživanja ne koreliraju u potpunosti sa rezultatima drugih studija u kojima su korišćeni slični eksperimentalni metodi. U studiji Yu-a i saradnika je praćen nivo lipida u krvi životinja sa aloksanskim dijabetesom. Oni su tretirali dijabetične životinje polisaharidima iz gljive *C. comatus*, neobogaćenim ili obogaćenim selenom. Poredeći rezultate eksperimentalnih grupa miševa sa odgovarajućom kontrolnom grupom, uočeno je da je i tretman polisaharidima obogaćenim i neobogaćenim selenom doveo do sniženja triglicerida, odnosno porasta koncentracije HDL holesterola. Nivo LDL holesterola i ukupnog holesterola je uspeo da snizi samo posttretman polisaharidima obogaćenim selenom u odnosu na grupu koja je nakon indukcije dijabetesa aloksanom dobijala fiziološki rastvor. Na osnovu toga je zaključeno da polisaharadi izolovani iz gljive nisu dovoljni sami da bi u potpunosti ispoljili efekat na metabolizam lipida (Yu J., 2009).

Komatin, kao još jedna supstanca izolovana iz gljive *C. comatus*, pored ranije opisanog hipoglikemijskog dejstva pokazuje i pozitivan efekat na poremećeni metabolizam lipida, navodi se u radu Ding-a i saradnika. Praćen je uticaj komatina na koncentraciju triglicerida i holesterola kod pacova sa aloksanskim dijabetesom. Efekat komatina su poredili sa metforminom, standardnim antihiperглиkemikom, koji se danas smatra lekom prvog izbora u terapiji insulin nezavisnog dijabetesa. Rezultati njihovog istraživanja su pokazali da su efekti ove dve supstance slični, odnosno da obe supstance dovode do sniženja koncentracije triglicerida i holesterola u jednakoj meri (Ding Z., 2010).

C. comatus obogaćen vanadijumom je korišćen u studiji Ma-a i saradnika da bi se pored hipoglikemijskih svojstava ispitivao i uticaj na nivo lipida u krvi miševa kod kojih je hiperglikemija izazvana dugotrajnom primenom saharoze. Za sve studije u kojima je korišćen vanadijum treba napomenuti da je njegova samostalna primena toksična, pa je iz tog razloga vanadijum vezivan za matriks gljive, kako bi se umanjili njegovi toksični, a potencirali njegovi pozitivni efekti na metabolizam ugljenih hidrata i masti. Uočeno je da je tretman *C. comatus*-om

obogaćenim vanadijumom uspeo statistički značajno da snizi nivo triglicerida i holesterola u poređenju sa grupom koja je nakon indukcije hiperglikemije dugotrajnom primenom saharoze dobijala fiziološki rastvor. Za razliku od ovog pozitivnog efekta na ukupni nivo lipida, pomenuti tretman nije uspeo da ispolji povoljan efekat i na pojedinačne frakcije lipoproteina (HDL i LDL) (Ma Z., 2009).

Iz prethodnih razmatranja može se zaključiti da gljiva *C. comatus* u celosti (plodonosno telo i micelijum), sa svim dobro izbalansiranim supstancama koje sadrži, ispoljava hipoglikemijski (antihiperglikemijski) i hipolipemijski efekat u većoj meri u odnosu na svoje sekundarne metabolite ili izolovane konstituense.

6.4. Uticaj na funkciju jetre i bubrega

Jetra je velik, kompleksan organ koji je savršeno dizajniran za centralnu ulogu u metabolizmu ugljenih hidrata, proteina i masti. Ona je odgovorna za sintezu mnogobrojnih plazma proteina, uključujući i lipoproteine. Jetra održava stalan nivo šećera u krvi, tako što višak šećera preuzima i skladišti ga u obliku glikogena, dok ga razlaže kada je potrebno podići nivo glukoze u krvi. Takođe, u njoj se odvija i proces glukoneogeneze, kada se iz neugljenohidratnih izvora, kao što su masne i amino kiseline, stvara glukoza i na taj način se održava nivo šećera u krvi. Jetra ima bitnu ulogu i u metabolizmu i detoksikaciji raznih ksenobiotika koji mogu dovesti do oštećenja organizma, pa i nje same (Soares A., 2013). Oštećenje jetre počinje sa oksidativnim stresom, a to je ujedno i tačka kada se može sprečiti dalja progresija njenog oštećenja. S obzirom na to da je u jetri najintenzivniji metabolizam koji uključuje reakcije u prisustvu kiseonika (citohrom sistem oksidaza), logično je da je ona najpodložnija oštećenju izazvanom slobodnim radikalima. Jetru od oštećenja brani čitav sistem antioksidativne zaštite, uključujući enzimski i neenzimski, o kojima je bilo više reči u prethodnom poglavlju (Yu J., 2009; Jayakumar T., 2006; Jayakumar T., 2011). Ako se taj sistem naruši, dolazi do progresije nastanka slobodnih radikala, koji dalje vrše lipidnu peroksidaciju, odnosno oštećuju ćelijske membrane hepatocita, što vodi gubitku funkcije jetre. Oštećenjem hepatocita dolazi do izlivanja enzima aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferaze (ALT) u serum. Ova dva enzima se nalaze u visokoj koncentraciji u hepatocitima, pa je zato njihova serumaska koncentracija najbolji pokazatelj oštećenja jetre (Soares A., 2013). Kako bi procena toksikoloških svojstava gljive

Coprinus comatus bila potpunija, pored određivanja serumske koncentracije enzima AST i ALT rađena je i histopatološka analiza isečaka tkiva jetre.

Poredeći serumsku koncentraciju AST grupa životinja koje su dobijale gljivu *C. comatus* u tri različite doze i tri različita vremenska intervala sa vrednostima kontrolnih grupa, koje su dobijale fiziološki rastvor, ne uočava se razlika. Kako se AST nalazi u dovoljnoj koncentraciji i u kardiomiocitima, neuronima, nefronima, miocitima i crvenim krvnim zrnima, a ALT u veoma niskim koncentracijama u miocitima i nefronima, ALT predstavlja specifičniji indikator oštećenja jetre (Giannini E. G., 2005; Ozer J., 2008; Soares A., 2013). Imajući tu činjenicu u vidu, može se reći da je tretman gljivom *C. comatus* ispoljio hepatoprotektivno dejstvo, jer su u svim vremenskim intervalima uočene niže vrednosti ALT životinja koje su dobijale ovu gljivu u odnosu na one koje su dobijale samo fiziološki rastvor. Potvrda biohemijskih testova, kojima je dokazano da tretman gljivom *C. comatus* ne dovodi do oštećenja jetre, dobijena je i histološkom analizom tkiva jetre. Na isečcima jetre bojenim standardnom hematoksilin-eozin tehnikom ne uočavaju se promene niti u grupama koje su dobijale samo fiziološki rastvor, niti u grupama koje su tretirane gljivom.

Poredeći rezultate određivanja serumske koncentracije aminotransferaza u grupama životinja koje su imale pretretman aloksanom, uočeno je da je značajno niža koncentracija AST u grupama životinja koje su nakon aloksana dobijale *C. comatus* u dozi od 3,34 g/kg. S obzirom na to da AST postoji, pored jetre, i u mnogim drugim tkivima, može se reći da je tretman gljivom sprečio oštećenja tih tkiva izazvanih primenom aloksana (Soares A., 2013). Kako je ALT specifičniji indikator oštećenja jetre, uočava se da pretretman aloksanom nije ošteti funkciju jetre niti u grupama koje su nakon toga dobijale fiziološki rastvor, niti u onim grupama koje su dobijale vodenu suspenziju gljive *C. comatus* (Giannini E. G., 2005; Ozer J., 2008; Soares A., 2013). Takav rezultat je bio i očekivan ako se ima u vidu mehanizam toksičnog dejstva aloksana, koje se ostvaruje prevashodno u tkivu pankreasa, odnosno u beta ćelijama Langerhansovih ostrvaca (Lenzen S., 2008; Szkudelski T., 2001; Etuk E. U., 2010). Histološkom analizom tkiva jetre grupa životinja koje su pretretirane aloksanom nije uočena razlika između životinja koje su dobijale fiziološki rastvor u odnosu na one koje su dobijale vodenu suspenziju gljive *C. comatus*, što je u korelaciji sa biohemijskim analizama.

Iako je u većini eksperimentalnih grupa tretman gljivom uspeo da spreči porast serumske koncentracije aminotransferaza uzrokovan primenom ugljen-tetrahlorida, do statistički značajne

promene je došlo samo u koncentraciji ALT grupa 7-dnevnog tretmana. Naročito niže vrednosti i AST i ALT se uočavaju u grupi životinja koja je pre primene ugljen-tetrahlorida tretirana 42 dana *C. comatus*-om u dozi od 3,34 g/kg u odnosu na grupu koja je nakon toga dobijala fiziološki rastvor takođe 42 dana. I pored velikih razlika srednjih vrednosti pomenutih grupa, nije doseguta značajnost promene, zbog velikih interindividualnih razlika, odnosno velike standardne devijacije. Patohistološkom analizom tkiva jetre nije uočena razlika između jedinki tretiranih fiziološkim rastvorom u odnosu na one tretirane *C. comatus*-om, jer se u svim grupama koje su dobijale ugljen-tetrahlorid uočavaju znaci oštećenja tkiva istog intenziteta. Rezultati patohistološke analize nisu u skladu sa rezultatima ranije sprovedenog istraživanja u Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, gde je istom analizom uočeno da 7-dnevni tretman vodenom suspenzijom gljive *C. comatus* ispoljava u određenoj meri zaštitni efekat na jetru (Popović M., 2010). Drugih istraživanja vezanih za hepatoprotektivno dejstvo gljive *C. comatus* nema. Istraživanja hepatoprotektivnih osobina drugih gljiva su pokazala da one mogu biti veoma efikasne u zaštiti jetre od agenasa kao što su etanol, ugljen-tetrahlorid i drugi, te bi i gljivu *C. comatus* trebalo detaljnije ispitati (Biswas G., 2011; Nitha B., 2013; Alam N., 2009).

Dijabetesna nefropatija je jedna od glavnih komplikacija dijabetes melitusa, a ujedno je i vodeći uzrok terminalnog stadijuma bubrežne insuficijencije na globalnom nivou. Do sada je izneto nekoliko objašnjenja uzroka nastanka dijabetesne nefropatije, ali tačan mehanizam se još uvek ne zna. Navodi se da su mogući uzroci poremećaji metabolizma, oksidativni stres, neenzimska glikozilacija i stimulacija protein kinaze C ili svi zajedno u kombinaciji. Kako bi se pratila funkcija bubrega u ovom istraživanju određivani su serumski koncentracija kreatinina i uree. Ovi biohemijski parametri su korisni u praćenju ne samo razvoja dijabetesne nefropatije, nego i toksičnosti samog preparata gljive *C.comatus*. Kao dopuna biohemijskim analizama vršen je patohistološki pregled tkiva bubrega (He C. Y., 2006; Gross J. L., 2005; Alam N., 2009).

U grupama životinja koje su dobijale 7, 21 ili 42 dana vodenu suspenziju gljive *C. comatus* nije uočena razlika u vrednostima serumskog kreatinina u odnosu na životinje koje su dobijale samo fiziološki rastvor u istim vremenskim intervalima. Za razliku od kreatinina, serumski koncentracija uree je značajno viša u svim grupama tretiranim gljivom u odnosu na kontrolne grupe, što je naročito uočljivo kod 21-dnevnog tretmana. Porast koncentracije azotnih materija je najverovatnije uzrokovan povećanim unosom proteina, što potvrđuju i histološke analize bubrežnog tkiva, gde se ne uočavaju znaci oštećenja. Već je ranije spomenuto da gljive

sadrže visok procenat proteina, a u literaturi se navodi da je dijeta bogata proteinima jedan od najčešćih uzroka porasta azotnih materija u krvi (Schrier R. W., 2011; Shavit L., 2012; Vaz J. A., 2011). Na osnovu rezultata dobijenih u ovom istraživanju, može se zaključiti da tretman gljivom *C. comatus* nije doveo do oštećenja bubrega.

Koncentracija uree u serumu životinja kojima je izazvan dijabetes primenom aloksana je statistički značajno viša kod jedinki koje su dobijale gljivu ali samo tokom 7 dana i u najvećoj koncentraciji u odnosu na jedinke koje su dobijale fiziološki rastvor. U većini grupa koje su dobijale *C. comatus*, a kod kojih je dijabetes već trajao 21 ili 42 dana, došlo je do značajnog sniženja koncentracije azotnih materija u odnosu na životinje kontrolne grupe. Što se tiče koncentracije kreatinina, uočavaju se niže vrednosti u svim grupama životinja koje su nakon aloksana tretirane 21 ili 42 dana gljivom *C. comatus* u odnosu na one koje su nakon toga dobijale fiziološki rastvor. Iako se u literaturi navodi da se kod dijabetičnih životinja, nakon nekoliko nedelja od indukcije dijabetesa, patohistološkim pregledom mogu uočiti promene u glomerulima i mezengijalnom matriksu bubrega, takve nisu uočene niti kod jedne životinje u ovom ogledu (Jayakumar T., 2008; He C. Y., 2006). Biohemijski parametri su pokazali da je ipak došlo do oštećenja bubrega kod životinja sa aloksanskim dijabetesom i da je tretman gljivom u određenoj meri uspeo da ublaži ovaj poremećaj.

Jayakumar i saradnici navode da ugljen-tetrahlorid nije samo hepatotoksičan agens. Zahvaljujući sposobnosti da produkuje reaktivne kiseonične vrste, on može da dovede i do oštećenja drugih organa, uključujući bubreg (Jayakumar T., 2008). U našem istraživanju tretman gljivom *C. comatus* je uspeo da spreči porast kreatinina uzrokovan primenom ugljen-tetrahlorida, što se može uočiti poređenjem grupa koje su pre ugljen-tetrahlorida dobijale fiziološki rastvor sa grupama koje su pre toga dobijale gljivu. To se naročito uočava kod 21-dnevnog tretmana kada su vrednosti kreatinina statistički značajno niže u sve tri grupe životinja koje su dobijale *C. comatus* u odnosu na grupu koja je dobijala fiziološki rastvor. Posmatrajući koncentraciju uree, ovaj efekat se ne uočava, jer nema statistički značajne razlike između grupa životinja koje su pre ugljen-tetrahlorida dobijale fiziološki rastvor i onih koje su pre toga dobijale *C. comatus*. Histološkim pregledom tkiva bubrega nisu uočene promene niti u jednoj od ispitivanih grupa koje su tretirane ugljen-tetrahloridom.

6.5. Uticaj na parametre oksidativnog stresa

Kiseonik je jedan od osnovnih donora bioenergije i živi sistemi bivaju neprekidno i neizbežno izloženi visokoreaktivnim kiseoničnim vrstama. Ove forme kiseonika, među kojima su najreaktivniji kiseonični radikali, predstavljaju deo normalnog metabolizma svake ćelije, pri čemu se najveći deo stvara u respiratornom lancu mitohondrija (Circu M. L., 2010; Buonocore G., 2010).

Kada redukciono sredstvo odaje svoj elektron, to dovodi do toga da se druga supstanca, koja prima taj elektron, redukuje. Međutim, kada oksidaciono sredstvo primi elektron neke druge supstance, ista biva oksidisana. U biološkim sistemima, redukciono sredstvo daje elektrone, obično tako što drugoj materiji koja učestvuje u reakciji dodaje vodonik ili oduzima kiseonik. Takve reakcije, nazvane oksido-redukционе reakcije, predstavljaju osnovu brojnih biohemijskih zbivanja, biosintetskih i regulacionih mehanizama. Redukciono i oksidaciono sredstvo su termini koji se koriste u hemiji, međutim, u biološkim naukama, prikladnije je koristiti nazive antioksidans i prooksidans, respektivno (Circu M. L., 2010; Buonocore G., 2010).

Generalno, prooksidansi se mogu klasifikovati u dve velike grupe, radikali i neradikali. Grupa radikala sadrži jedinjenja kao što su azotoksid radikal (NO^\bullet), hidroksil radikal (OH^\bullet), superoksid anjon radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroksi radikal (ROO^\bullet), alkoksi radikal (RO^\bullet) i dr. Grupa neradikala sadrži mnogobrojna jedinjenja koja su vrlo reaktivna, npr. hipohlorna kiselina (HClO), ozon (O_3) i aldehidi, ali po definiciji ne pripadaju radikalima. Naime, radikali mogu biti atomi, molekuli ili joni, a zajedničko im je da imaju najmanje jedan ili više nesparenih elektrona, te u težnji da se stabilišu, pokazuju veliku reaktivnost prema drugim molekulima i atomima, pri čemu se pokreće lančana reakcija stvaranja sledećih slobodnih radikala (dodatak „slobodni“ radikal je u suštini suvišan, jer je svaki radikal i slobodan). Međutim, vrlo često se radikali i neradikali nazivaju reaktivne kiseonične vrste (RKV ili eng. ROS – reactive oxygen species), pri čemu se ističe značaj njihove reaktivnosti, bez obzira na njihovu hemijsku klasifikaciju. Ako se stvaranje RKV-a i procesi lančane reakcije ne neutrališu, promene se šire geometrijskom progresijom i neposredno ili posredno mogu da izazovu oštećenja biomolekula i da pokrenu brojne reakcije koje će dovesti do poremećaja vitalnih funkcija i smrti ćelije ili konačno živog sistema (Circu M. L., 2010; Buonocore G., 2010; Kowaltowski A. J., 2009).

Lipidi su bitna meta napada RKV-a, naročito lako se oksidišu polinezasićene masne kiseline u sastavu fosfolipida ćelijskih membrana. Inicijalni događaj je oksidacija vodonikovog atoma na C-atomu dvostruke veze nezasićenih lipida, a dalji tok se odvija po tipu lančane reakcije. Procesi lipidne peroksidacije se odvijaju i pod fiziološkim uslovima, učestvuju u sintezi hormona, nukleinskih kiselina, generisanju energije, procesima ćelijske deobe, nastaju pri aktivnostima krvnih ćelija i neophodni su za funkcionisanje mnogih enzima. Ako se proces lipidne peroksidacije naglo intenzivira, van fiziološkog okvira, dolazi do univerzalnog oštećenja ćelije, pre svega na nivou ćelijskih membrana. Kao posledica povećanja intenziteta lipidne peroksidacije javlja se osmotski disbalans sa ulaskom Ca^{2+} jona i još veća produkcija RKV-a usled aktivacije NO sintetaze i ksantin-oksidge. Pritom dolazi i do oštećenja proteina, najpre oksidacijom tiol grupa najvulnerabilnije aminokiseline cisteina sa mogućim stvaranjem disulfidnih veza unutar proteinskih molekula. Nukleinske kiseline (DNK i RNK) takođe mogu biti oštećene usled dejstva proizvoda oksidacije sa mogućim prekidom DNA-heliksa ili modifikacijom baza (Muller F. L., 2007; Marnett L. J., 2000; Shen G. X., 2010).

Postoje istraživanja koja tvrde da oksidativni stres ima vodeću ulogu u razvoju kako dijabetesa tako i dijabetesnih komplikacija, mikrovaskularnih i makrovaskularnih. Navodi se da metabolički poremećaji u dijabetesu dovode do prekomerne produkcije mitohondrijalnih superoksida, odnosno reaktivnih kiseoničnih vrsta u endotelnim ćelijama i velikih i malih krvnih sudova. Povećana koncentracija reaktivnih kiseoničnih vrsta u endotelnim ćelijama dovodi do aktivacije proinflammatoryh puteva i patološke proliferacije krvnih sudova (defektna angiogeneza). Aktiviranje proinflammatoryh puteva se dešava preko dugotrajnih epigenetskih promena, koje vode ka trajnoj ekspresiji proinflammatoryh gena, čak i ako je glikemija normalizovana. Aterosklerotske promene i kardiomiopatija u dijabetesu tipa 2 nastaju jednim delom zahvaljujući inaktivaciji gena, odnosno antiaterosklerotskih enzima, azot-oksidge sintaze i prostaciklin sintaze. Drugim delom, te promene nastaju zahvaljujući selektivnoj insulinskoj rezistenciji, koja dovodi do povećanja produkcije RKV-a u mitohondrijama iz slobodnih masnih kiselina (Henriksen E. J., 2011; Rains J. L., 2011). S druge strane, povećana produkcija RKV-a dovodi do insulinske rezistencije, prvenstveno u skeletnim mišićima u čijim mitohondrijama dolazi do preterane produkcije vodonik-peroksidge i superoksid jona (Henriksen E. J., 2011; Rains J. L., 2011; Shen G. X., 2010). U prilog pređašnjim tvrdnjama ide i istraživanje sprovedeno na transgeničnim dijabetičnim miševima, gde je povećana ekspresija superoksid-

dismutaze prevenirala nastanak dijabetesne retinopatije, nefropatije i kardiomiopatije (Giacco F., 2010). Opet, ispitivanja uticaja metalitioneina i drugih egzogenih supstanci sa dobro poznatim antioksidativnim svojstvima su dokazala da oni imaju značajnu ulogu u prevenciji nastanka dijabetesa i dijabetesnih komplikacija. Zaključci svih prethodno navedenih studija ističu oksidativni stres kao bitan činilac u etiologiji dijabetesa i dijabetesnih promena. Zbog toga je predložena strategija za tretman insulinske rezistencije u dijabetesu, kao i dijabetesnih komplikacija, preveniranje i ublažavanje oksidativnog stresa i oksidativnog oštećenja (Henriksen E. J., 2011; Rains J. L., 2011; Shen G. X., 2010; Giacco F., 2010; Wei W., 2009).

Prisustvo oksidativnog stresa se može meriti na više načina, kao na primer: direktnim merenjem koncentracije RKV-a, merenjem stepena oštećenja biomolekula i kvantifikacijom prirodnih antioksidativnih i prooksidativnih molekula. Kako su RKV veoma nestabilne, teško ih je direktno meriti, pa se koriste indirektno metode, kao što su *in vitro* testovi za procenu antioksidativnog kapaciteta, u ovom slučaju vodene suspenzije gljive *C. comatus* (Brand-Wiliams W., 1995; Kroyer G. T., 2004; Hagerman A., 2000; Sarikurkcu C., 2010)

Jedan od najčešće korišćenih *in vitro* testova za procenu antioksidativnih sposobnosti supstanci je test DPPH, odnosno sposobnost hvatanja slobodnih radikala nakon reakcije sa DPPH reagensom. DPPH je „stabilan“ slobodan radikal. On ima prednost u odnosu na ostale slobodne radikale proizvedene u laboratoriji, kao što su hidrosil radikal i superoksid anjon, jer je netaknut neželjenim reakcijama, kao što su heliranje jona metala i enzimska inhibicija. Antioksidantni molekuli reaguju sa DPPH reagensom, neutrališu ga i na osnovu procenta neutralizacije DPPH se određuje antioksidativni kapacitet ispitivanih supstanci. Antioksidativni kapacitet određene supstance se poredi sa poznatim, tj. dokazanim antioksidansima (Ferreira I., 2007). Ako se rezultati ovog istraživanja porede sa istraživanjima drugih autora, zapaža se da je antioksidantna aktivnost ovde ispitivanog metanolnog ekstrakta gljive *C. comatus* značajna. IC₅₀ vrednosti dobijene u ovom istraživanju (0,236 mg/ml metanolnog ekstrakta) su niže od vrednosti dobijenih u istraživanjima Li-a i saradnika (0,86 mg/ml etanolnog ekstrakta), Vaz-a i saradnika (2,56 mg/ml etanolnog ekstrakta), kao i Tsai-a i saradnika (3,01 mg/ml etanolnog ekstrakta) (Li B., 2010; Vaz J. A., 2011; Tsai S. Y., 2009). To govori u prilog dobroj antioksidativnoj sposobnosti ispitivanog ekstrakta, jer što je niža IC₅₀ vrednost, to je veća antioksidativna sposobnost uzorka. Poređenjem metanolnog ekstrakta gljive *C. comatus* sa vitaminom E kao poznatim antioksidansom, uočeno je da je vitamin E mnogo potentniji antioksidans, što je i bilo

očekivano, tako da je 1 mg vitamina E po antioksidativnom kapacitetu ekvivalentan 93,28 mg metanolnog ekstrakta gljive *C. comatus*.

Takođe koristan *in vitro* test za ispitivanje antioksidativne sposobnosti supstanci je test FRAP (Ferric reducing ability of plasma – extract). Ovaj test se zasniva na sposobnosti antioksidansa da redukuje feri oblik gvožđa (Fe^{3+}) u fero oblik gvožđa (Fe^{2+}). U sledećoj reakciji se formira prusko plavo na osnovu čijeg intenziteta se meri koncentracija fero gvožđa, odnosno redukujuća (antioksidantna) sposobnost ispitivane supstance (Sarikurkcuc C., 2010). Prema očekivanjima, redukujuća sposobnost ovde ispitivanog metanolnog ekstrakta gljive *C. comatus* je rasla sa porastom koncentracije, što je dokazano testom korelacije ($r=0,99$, $p<0,001$). Kao kontrola i u ovom testu je korišćen vitamin E i opet je uočeno da je njegova antioksidativna sposobnost značajno veća u odnosu na ispitivani ekstrakt. Ako se porede rezultati ovog istraživanja sa rezultatima sličnih istraživanja drugih autora, zapaža se da je redukujuća sposobnost ovde ispitivanog metanolnog ekstrakta značajna. U istraživanju Tsai-a i saradnika za dobijanje vrednosti redoks kapaciteta (apsorbance na 700 nm) 0,5 bila je potrebna koncentracija 9,94 mg/ml etanolnog ekstrakta i 5,27 mg/ml vodenog ekstrakta cele gljive *C. comatus* (Tsai S. Y., 2009). U našem istraživanju ta je vrednost postignuta koncentracijom manjom od 5 mg/ml metanolnog ekstrakta cele gljive *C. comatus*. Ipak, redukujuća sposobnost ovde ispitivanog metanolnog ekstrakta je manja u odnosu na vodeni i etanolni ekstrakt gljive *C. comatus* ispitivan od strane Vaz-a i saradnika (Vaz J. A., 2011). U njihovom ogledu za dobijanje apsorbanca 0,5 bila je potrebna koncentracija od 4,67 mg/ml vodenog i 1,47 mg/ml etanolnog ekstrakta gljive *C. comatus*. Sarikurkcuc i saradnici su ispitivali redukujuću sposobnost metanolnih ekstrakata gljiva *Amanita caesarea*, *Clitocybe geotropa* i *Leucoagaricus pudicus* (Sarikurkcuc C., 2010). U tom istraživanju vrednost apsorbanca 1 je postignuta koncentracijama ekstrakata višim u odnosu na naš ogled, gde je ta vrednost postignuta koncentracijom ekstrakta od približno 10 mg/ml.

Kako bi se jednim delom utvrdilo odakle potiče antioksidativna sposobnost ispitivanog metanolnog ekstrakta gljive *C. comatus*, određen je sadržaj ukupnih fenola. U literaturi se navodi da fenolne supstance poseduju izrazitu antioksidativnu sposobnost, uključujući sposobnost hvatanja slobodnih radikala, menjanja enzimske aktivnosti, kao i redukujuću i helirajuću sposobnost. Duže vreme se zna da su biljke bogate fenolnim jedinjenjima, a od nedavno to je poznato i za gljive (Jayakumar T., 2011). Među fenolna jedinjenja sa dokazanim antioksidativnim svojstvima spadaju prvenstveno flavonoidi: rutin, kvercetin, naringin, galangin

i mnogi drugi. Još neka značajna fenolna jedinjenja su: protokatehuinska, *p*-hidroksibenzoeva i *p*-kumarinska kiselina. U istraživanju Vaz-a i saradnika u kojem su poređene četiri vrste divljih jestivih gljiva: *Armillaria mellea*, *Calocybe gambosa*, *Clitocybe odora* i *Coprinus comatus*, utvrđeno je da *C. comatus* sadrži najveću koncentraciju fenolnih jedinjenja. U zaključku se navodi da odatle potiče antioksidativna sposobnost gljive *C. comatus* koja je ujedno i najjača u poređenju sa ostalim ispitivanim gljivama (Vaz J. A., 2011). Ferreira i saradnici navode da je veća koncentracija ukupnih fenola pronađena u gljivi *Lactarius deliciosus* zaslužna za bolje rezultate u testovima FRAP i DPPH u odnosu na gljivu *Tricholoma portentosum* (Ferreira I., 2007). Na isti način mogu da se objasne i rezultati našeg oglada, jer je dokazana dobra sposobnost hvatanja slobodnih radikala testom DPPH i redukujuća sposobnost testom FRAP, a poredeći ih sa drugim istraživanjima, uočava se i visoka koncentracija ukupnih fenola. Naime, metanolni ekstrakti gljiva *Lactarius deliciosus* i *Tricholoma portentosum* iz ranije pomenute studije su imale koncentracije od 17,25 i 10,8 mg/g ukupnih fenola, respektivno. U istraživanju Li-a i saradnika i Tsai-a i saradnika, etanolni ekstrakti gljive *Coprinus comatus* su imali koncentracije od 9,71 i 5,27 mg/g ukupnih fenola, respektivno (Li B., 2010; Tsai S. Y., 2009). Za sve ove koncentracije ukupnih fenola se navodi da su značajne i visoke, te je jasno da je vrednost od 151,02 mg/g, koja je utvrđena u našoj studiji, stvarno visoka vrednost. Moguće objašnjenje za ovako visok sadržaj fenola je to što je u našoj studiji korišćen fino usitnjeni, osušeni preparat gljive *C. comatus*, te je iz tog razloga i ekstrakcija bila bolja. Da je ekstrakcija bila uspešna, odnosno dobijen veći prinos ukupnih fenola, govori i veoma niska IC₅₀ vrednost u poređenju sa onim dobijenim u gore pomenutim studijama, jer, kao što je rečeno, antioksidativna sposobnost umnogome zavisi od sadržaja ukupnih fenola (Li B., 2010; Tsai S. Y., 2009).

Stalna izloženost slobodnim radikalima je dovela do razvoja mnogobrojnih odbrambenih mehanizama organizma. Odbrambeni mehanizmi koji štite organizam od oksidativnog stresa uključuju: preventivne mehanizme, mehanizme popravke, fizičku odbranu i enzimski i neenzimski antioksidativni odbrambeni sistem. Za organizme čiji život zavisi od kiseonika, možda je najbitniji enzimski i neenzimski antioksidativni odbrambeni sistem. Enzimsku odbranu čine enzimi katalaza, glutation-peroksidaza (GSHPx), superoksid-dismutaza, glutation-reduktaza (GSHR) i nekoliko drugih supstanci koje pomažu u detoksifikaciji RKV ili u održavanju stalnih koncentracija metaboličkih posrednika, kao što su glutation i NADPH. Neenzimski antioksidativni odbrambeni sistem čini pored ranije spomenutih α -tokoferola, flavonoida, fenola

i drugih supstanci izolovanih iz biljaka i gljiva, i jako bitna endogena supstanca, a to je glutathion (Soares A., 2013; Jayakumar T., 2011; Li B., 2010).

Jedan od najčešće korišćenih *in vivo* modela za ispitivanje antioksidativne sposobnosti određenih supstanci je model sa ugljen-tetrahloridom kao prooksidansom (CCl_4). CCl_4 se metabolički aktivira pod uticajem citohrom P450-zavisnih oksidaza u endoplazmatskom retikulumu hepatocita, gde nastaje ugljen-trihlorid (CCl_3) koji u prisustvu kiseonika dovodi do lipidne peroksidacije. Kao posledica, nastaju strukturne promene endoplazmatskog retikuluma i drugih membrana, uključujući ćelijsku, što narušava antioksidativnu zaštitu jetre, te vodi njenom oštećenju (Soares A., 2013; Jayakumar T., 2011). I u ovom istraživanju je korišćen ugljen-tetrahlorid kao prooksidans. Poznato je da se i mehanizam toksičnosti aloksana zasniva na stvaranju slobodnih radikala, te su i uzorci jetri životinja koje su prvobitno tretirane aloksanom, a nakon toga fiziološkim rastvorom ili gljivom *C. comatus* uzimani za dalje analize (Lenzen S., 2008; Szkudelski T., 2001; Etuk E. U., 2010). U ovom istraživanju su postojala dva metodološki različita modela oksidativnog stresa. Prvi, u kojem je oksidativni stres izazvan na početku (aloksanom) i koji je trajao zbog sledstvenog razvitka dijabetesa, pa je praćena sposobnost gljive da pomogne oporavak. I drugi, u kojem je oksidativni stres izazvan na kraju (ugljen-tetrahloridom), a određivana je sposobnost gljive da spreči nastanak oštećenja izazvanog istim.

Postoje dokazi da primena raznih ekstrakata biljaka i gljiva dovodi do smanjenja lipidne peroksidacije i sledstvenog oštećenja ćelijske membrane. Imajući u vidu da praktično nema istraživanja koja se bave procenom *in vivo* antioksidativnih sposobnosti gljive *C. comatus*, u ovom ogledu su određivani intenzitet lipidne peroksidacije, koncentracija redukovanog glutathiona i aktivnosti enzima glutathion-peroksidaze, glutathion-reduktaze, katalaze i ksantin-oksidge. Intenzitet lipidne peroksidacije je procenjivan indirektno, preko koncentracije malondialdehida (MDA), koji je u ovom procesu sekundarni proizvod. MDA je glavni reaktivni aldehid koji nastaje kao posledica peroksidacije bioloških membrana koje sadrže polinezasićene masne kiseline (Jayakumar T., 2011; Jayakumar T., 2006).

U većini grupa tretiranih vodenom suspenzijom gljive *C. comatus* je došlo do statistički značajnog sniženja intenziteta lipidne peroksidacije u poređenju sa grupama koje su dobijale fiziološki rastvor. Prilikom 7-dnevnog tretmana gljivom se uočava da je doza od 3,34 g/kg dovela do najznačajnijeg pada intenziteta lipidne peroksidacije. Ako se posmatraju dva različita modela oksidativnog stresa primenjena u ovom ogledu, uočava se da je u oba slučaja *C. comatus*

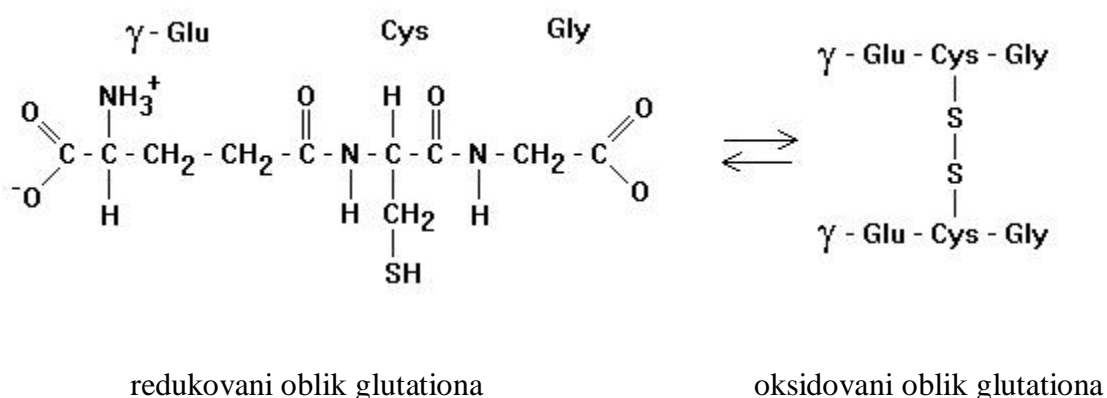
ispoljio protektivno dejstvo. Izrazito nizak intenzitet lipidne peroksidacije se primećuje u svim grupama tretiranim gljivom tokom 42 dana, naročito na modelu oksidativnog stresa izazvanog ugljen-tetrahloridom. Pretpostavlja se da je glavni razlog hepatotoksičnosti ugljen-tetrahlorida lipidna peroksidacija ćelijske membrane hepatocita (Jayakumar T., 2006). Imajući u vidu i rezultate serumske koncentracije aminotransferaza grupa tretiranih ugljen-tetrahloridom, jasno je da je tretman gljivom sprečio oštećenje hepatocita smanjenjem intenziteta lipidne peroksidacije. Rezultati su u skladu sa našim ranijim istraživanjem, kojim je pokazano da 7-dnevni tretman gljivom *C. comatus* u dozi od 1,67 g/kg dovodi do smanjenja intenziteta lipidne peroksidacije izazvane primenom ugljen-tetrahlorida (Popović M., 2010).

Pored lipidne peroksidacije u procesima oštećenja organizma usled oksidativnog stresa bitnu ulogu ima i enzim ksantin-oksidaza. Ksantin-oksidaza je prooksidativni enzim, bitan u metabolizmu purina, ističe se kao katalizator kiseoničnih radikala u postishemijskim stanjima i time učestvuje u reperfuzijskom oštećenju tkiva. Dokazano je da se u jetri nalaze posebno visoke koncentracije enzima ksantin-oksidaze. Ksantin-oksidaza razgrađuje ksantin uz pomoć kiseonika i time dovodi do stvaranja superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) (Hamer I., 1995; Engerson T. D., 1987; Dawson J., 2006; Ardan T., 2004). U radu Dawson-a i Walters-a se navodi da ksantin-oksidazom posredovani oksidativni stres ima značajnu ulogu u razvoju ateroskleroze i da je dokazano da inhibicija ovog enzima dovodi do vraćanja normalne funkcije endotela krvnih sudova (Dawson J., 2006).

U ovom istraživanju 21-dnevni tretman gljivom *C. comatus* u dozi od 0,835 i 3,34 g/kg je doveo do statistički značajnog sniženja aktivnosti enzima ksantin-oksidaze u jetri pacova. Nasuprot očekivanjima, 21-dnevni tretman gljivom *C. comatus* u dozi od 1,67 g/kg je doveo do povišenja aktivnosti istog, što je slučaj i u 7-dnevnom tretmanu. Prilikom 42-dnevnog tretmana nisu uočene razlike u aktivnosti ksantin-oksidaze između eksperimentalnih grupa. Na osnovu toga se može reći da dugotrajno davanje *C. comatus*-a niti potencira niti umanjuje aktivnost ksantin-oksidaze kod životinja koje nisu prethodno bile izložene toksičnim agensima. Kod životinja sa aloksanskim dijabetesom, 7-dnevna primena *C. comatus*-a u dozi od 3,34 g/kg je dovela do statistički značajnog sniženja aktivnosti ksantin-oksidaze, dok je prilikom 42-dnevnog tretmana gljiva u nižim dozama (0,835 i 1,67 g/kg) izazvala porast. Jasniji rezultati su dobijeni na modelu oksidativnog stresa sa ugljen-tetrahloridom. U svim vremenskim intervalima i u svim dozama tretman gljivom *C. comatus* je doveo do sniženja aktivnosti enzima ksantin-oksidaze u

grupama koje su dobijale ugljen-tetrahlorid, te je na taj način najbolje pokazao svoj antioksidativni potencijal.

Od faktora koji štite od oksidativnog stresa u ovoj studiji su određivani koncentracija glutaciona, kao glavnog neenzimskog antioksidansa, i aktivnosti enzima glutation-peroksidaze, glutation-reduktaze i katalaze, kao glavnih predstavnika enzimskog vida zaštite. Glutation je tiol sadržavajuća supstanca, niske molekulske mase i u redukovanom obliku (GSH) predstavlja tripeptid izgrađen iz glutaminske kiseline, cisteina i glicina (**Slika 29**). On igra ključnu ulogu u koordinisanju antioksidativnih odbrambenih mehanizama, odnosno detoksifikaciji reaktivnih toksičnih metabolita uključujući i one nastale primenom ugljen-tetrahlorida. Zastupljen je u skoro svim ćelijama u visokoj koncentraciji, jedna je od najbitnijih supstanci sa ulogom antioksidansa. Kao supstrat za glutation-peroksidazu i kofaktor za peroksidazu, koju snabdeva elektronima u toku razgradnje H_2O_2 , kao i direktnim uklanjanjem OH^\square , RO^\square i ROO^\square , čuva ćelije i subcelularne strukture od oksidacije. Glutation-peroksidaza katalizuje glutation zavisnu redukciju organskih peroksida i vodonik-peroksida, a u katalitičkom centru nosi selenocistein. Donor elektrona u tim reakcijama je glutation. Poremećaji funkcije takvih selenoproteina ogledaju se u nastanku ateroskleroze, neurodegenerativnih oboljenja i neoplazmi. Glutation u svim navedenim reakcijama podleže oksido-redukcionom ciklusu, gde se nastali oksidovani oblik regeneriše pomoću enzima glutation-reduktaze uz utrošak jednog molekula NADPH (Gul M., 2000; Kovačeva J., 2007; Pastore A., 2003; Jayakumar T., 2011).



Slika 29. Redukovani i oksidovani oblik glutaciona.

Ako se porede grupe životinja koje su dobijale fiziološki rastvor sa grupama životinja koje su dobijale gljivu *C. comatus*, uočava se jasna razlika u koncentraciji redukovano glutaciona. Najveću koncentraciju glutaciona su imale životinje koje su dobijale *C. comatus* u dozi od 3,34 g/kg. To je najuočljivije u 42-dnevnom tretmanu u kojem je koncentracija glutaciona grupe koja je dobijala gljivu u dozi od 3,34 g/kg više nego duplo veća u odnosu na grupe koje su dobijale gljivu u manjim dozama, i skoro četiri puta veća u odnosu na grupu koja je dobijala fiziološki rastvor. Kod životinja sa aloksanskim dijabetesom rezultati koncentracije glutaciona nisu toliko drastični. U 7-dnevnom tretmanu sa porastom primenjene doze *C. comatus*-a raste koncentracija glutaciona, odnosno uočava se statistički značajna razlika između eksperimentalnih grupa, što nije slučaj u 21-dnevnom i 42-dnevnom tretmanu. U grupi životinja koja je pre primene ugljen-tetrahlorida dobijala 7 dana *C. comatus* u dozi od 1,67 g/kg je zapažen pad koncentracije glutaciona u poređenju sa grupom fiziološkog rastvora. U svim ostalim grupama pretretmanom gljivom je sprečen pad koncentracije glutaciona uzrokovan primenom ugljen-tetrahlorida.

Iako je prema literaturnim podacima bilo očekivano da primena gljive *C. comatus* dovede do porasta aktivnosti enzima glutation-peroksidaze i glutation-reduktaze, takvi rezultati nisu ispoljeni u potpunosti (Yu J., 2009; Ko W. S. 2010; Jayakumar T., 2011). Naime, aktivnost glutation-peroksidaze je u određenom broju grupa tretiranih gljivom veća, ali u isto tako velikom broju grupa je i manja u odnosu na grupe tretirane samo fiziološkim rastvorom. Rezultati aktivnosti glutation-reduktaze su još upadljiviji, jer je samo u grupi životinja koja je dobijala *C. comatus* tokom 7 dana u dozi od 3,34 g/kg došlo do porasta aktivnosti tog enzima, dok se u svim ostalim grupama tretiranih gljivom uočava niža aktivnost u odnosu na kontrolnu grupu. Slični rezultati su dobijeni i u grupama sa aloksanskim dijabetesom i u grupama koje su na kraju tretmana dobijale ugljen-tetrahlريد. Posmatrajući aktivnost enzima glutation-peroksidaze i glutation-reduktaze ovih grupa, nije uočen pozitivan efekat gljive *C. comatus*, jer je u velikom broju životinja koje su imale višednevni tretman gljivom manja aktivnost pomenutih enzima u odnosu na životinje koje su u istom vremenskom okviru dobijale fiziološki rastvor. Od ovoga treba samo izdvojiti životinje koje su nakon indukcije dijabetesa aloksanom dobijale gljivu u dozi od 3,34 g/kg tokom 7, 21 i 42 dana, jer je kod njih uočena statistički značajno veća vrednost aktivnosti glutation-reduktaze.

Katalaza, kao treći ispitivani enzim antioksidativne zaštite, prisutna je u svim tkivima sisara ali najviše je nalazimo u onim ćelijama koje služe za transport kiseonika, a to su eritrociti ili ćelije sa izrazitim aerobnim metabolizmom, kao što je jetra. Katalaza je enzim koji se ističe neobično visokom Michaelis-ovom konstantom (K_m) za supstrat i u stanju je da ukloni velike količine vodonik-peroksida (H_2O_2). Enzim se sastoji iz četiri subjedinice, od kojih svaka sadrži gvožđe, slično hem grupi preko kojeg se odvijaju oksido-redukционе reakcije tokom katalitičke aktivnosti. Funkcija katalaze je ćelijska zaštita, odnosno zaštita njenih organela, posebno mitohondrija zbog njihove ugroženosti usled procesa ćelijskog disanja (Switala J., 2002; Lardinois O. M., 1995; Chelikani P., 2004).

U ovom istraživanju aktivnost katalaze grupa koje su tretirane gljivom *C. comatus* u najvećoj dozi 7, 21 i 42 dana su izraženije u poređenju sa ostalim eksperimentalnim grupama. Primena gljive na životinje koje su imale aloksanski dijabetes nije u potpunosti uspela da spreči sniženje aktivnosti katalaze. Samo u dve grupe je uočen statistički značajan porast aktivnosti katalaze, u grupama koje su dobijale gljivu u dozi 0,835 g/kg 7 dana i 1,67 g/kg 42 dana. Iako se u većini grupa koje su nakon pretretmana *C. comatus*-om dobile ugljen-tetrahlorid zapažaju više vrednosti aktivnosti katalaze u odnosu na grupe koje su pretretirane fiziološkim rastvorom, ne postoji statistička značajnost.

Ako se *in vivo* ispitivanja parametara oksidativnog stresa posmatraju u celosti, može se reći da je ispoljen potencijal gljive *C. comatus* da štiti organizam, a na šta su ukazivali *in vitro* testovi. Potvrda visokog antioksidativnog kapaciteta, prvobitno utvrđena testovima DPPH i FRAP i određivanjem sadržaja ukupnih fenola, dobijena je *in vivo* testovima. Poredeći rezultate ovog istraživanja sa onima drugih autora, zapaža se da postoji sličnost, jer i u drugim studijama je ukazano na potencijal gljiva da štite od oksidativnog stresa. Jedina *in vivo* studija koja je imala za cilj da ispita antioksidativni kapacitet gljive *C. comatus*, ili bolje reći polisaharida izolovanih iz nje, jeste studija Yu-a i saradnika (Yu J., 2009). Oni su utvrdili da polisaharidi izolovani iz *C. comatus* gljive štite miševe sa aloksanskim dijabetesom od oksidativnog stresa, a da se to dejstvo pojačava dodavanjem selena molekulima polisaharida. Jayakumar i saradnici su na pacovima ispitivali antioksidativne sposobnosti gljive *Pleurotus ostreatus* koristeći isto tako ugljen-tetrahlorid kao proksidativnu supstancu (Jayakumar T., 2006; Jayakumar T., 2011). Višednevni tretman gljivom *Pleurotus ostreatus* je doveo do povišenja koncentracije glutaciona a sniženja intenziteta lipidne peroksidacije u jetri pacova. Postoje studije koje ukazuju i na antioksidativni

potencijal gljive *Cordyceps sinensis*. Pokazano je da tretman komercijalnim preparatom gljive *Cordyceps sinensis* značajno podiže koncentraciju glutaciona i enzima glutation-peroksidaze, glutation-reduktaze i superoksid-dismutaze (Ko W. S., 2010). Treba još napomenuti da su rezultati ove studije u potpunosti u saglasnosti sa rezultatima našeg ranijeg istraživanja antioksidativne sposobnosti gljive *C. comatus* (Popović M., 2010).

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja može se zaključiti da:

1. Primena preparata gljive *Coprinus comatus* značajno smanjuje prirast telesne mase zdravih životinja.
2. Primena preparata gljive *Coprinus comatus* značajno ublažava poremećaj homeostaze glukoze eksperimentalnih životinja.
3. Primena preparata gljive *Coprinus comatus* štiti životinje od reaktivnih kiseoničnih vrsta, odnosno umanjuje posledice izloženosti oksidativnom stresu.
4. Primena preparata gljive *Coprinus comatus* umanjuje oštećenje endokrinog pankreasa životinja tretiranih aloksanom, odnosno ubrzava obnovu β ćelija Langerhansovih ostrvaca.
5. Primena preparata gljive *Coprinus comatus* utiče povoljno na lipidni status eksperimentalnih životinja sa aloksanskim dijabetesom.
6. Višekratna primena različitih doza preparata gljive *Coprinus comatus* ne izaziva toksične promene u krvi, na jetri i bubrezima ispitivanih životinja.

8. LITERATURA

1. Aarons CB et al. Statins (HMG-CoA Reductase Inhibitors) Decrease Postoperative Adhesions by Increasing Peritoneal Fibrinolytic Activity. *Annals of Surgery*. 2007; 245(2):176-84.
2. Akata I, Ergonul B, Kalyoncu F. Chemical Composition and Antioxidant Activities of 16 Wild Edible Mushroom Species Grown in Anatolia. *International Journal of Pharmacology*. 2012; 8(2):134-8.
3. Alam N et al. Comparative Effects of Oyster Mushrooms on Lipid Profile, Liver and Kidney Function in Hypercholesterolemic Rats. *Mycobiology*. 2009; 37(1):37-42.
4. Ardan T, Kovaceva J, Cejkova J. Comparative histochemical and immunohistochemical study on xanthine oxidoreductase/xanthine oxidase in mammalian corneal epithelium. *Acta histochemica*. 2004; 106:69–75.
5. Bailey CJ, Turner SL, Jaheman KJ, Hayes WA. Effect of *Coprinus comatus* on glucose plasma concentration in mice. *Planta Med*. 1984; 50:525–6.
6. Beers RFJ, Sizer JW. Spectrophotometric Method for Measuring of Breakdown of Hydrogen Peroxide by Catalase. *J Biol Chem*. 1950; 195:133-40.
7. Bergmayer UH. *Methoden Der Enzymatischen Analyse*; Verlag Chemie: Weinheim, Germany, 1970; pp. 483-4.
8. Biswas G, Sarkar S, Acharya K. Hepatoprotective activity of the ethanolic extract of *Astraeus hygrometricus* (pers.) Morg. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 2011; 6(2):637-41.
9. Bliss M. Rewriting Medical History: Charles Best and the Banting and Best Myth. *The Journal Of The History Of Medicine And Allied Sciences*. 1993; 48:253-74.
10. Bobek P, Ozdin L, Galbavy S. Dose- and Time-Dependent Hypocholesterolemic Effect of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in Rats. *Nutrition*. 1998; 14:282–6.
11. Brakhage AA. *Molecular Biotechnology of Fungal β -Lactam Antibiotics and Related Peptide Synthetases*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2004.
12. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CL. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. 1995; 28(1):25-30.

13. Buege AJ, Aust DS. In *Methods in Enzymology*; Fleischer, S., Parker L., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, 1988; p. 306.
14. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 2010; 15:186-90.
15. Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev*. 1998; 73:203-66.
16. Centers for Disease Control and Prevention. National diabetes fact sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States, 2005. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2005.
17. Centers for Disease Control and Prevention. National diabetes fact sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States, 2011. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2011.
18. Chang ST, Miles PG. The nutritional attributes of edible mushrooms. In *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*, Chang ST, Miles PG (eds). 2004. CRC Press: Boca Raton, 27–38.
19. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci*. 2004; 61:192–208.
20. Chen S, Ho K, Hsieh Y, Wang L, Mau J. Contents of lovastatin, γ -aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. *LWT - Food Science and Technology*. 2012; 47:274-8.
21. Cheung CK. Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits. *Food Science and Human Wellness*. 2013; Article in Press.
22. Chin PTY, Stults FH, Tappel AL. Purification of Rat Lung Soluble Glutathione Peroxidase. *Biochim Biophys Acta*. 1976; 445:558-660.
23. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2010; 48:749–62.
24. Coppens P, Da Silva MF, Pettman S. European regulations on nutraceuticals, dietary supplements and functional foods: A framework based on safety. *Toxicology*. 2006; 221:59–74.

25. Cowie CC, Rust KF, Engelgau MM et al. Prevalence of Diabetes and Impaired Fasting Glucose in Adults in the U.S. Population. *Diabetes Care*. 2006; 29:1263–8.
26. Dadachova E, Bryan RA, Huang X, Moadel T, Schweitzer AD, et al. Ionizing Radiation Changes the Electronic Properties of Melanin and Enhances the Growth of Melanized Fungi. *PLoS ONE*. 2007; 2(5): e457.
27. Danaei G, Finucane MM, Lu Y et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*. 2011; 378:31–40.
28. Dawson J, Walters M. Uric acid and xanthine oxidase: future therapeutic targets in the prevention of cardiovascular disease? *Br J Clin Pharmacol*. 2006; 62(6):633–44.
29. Dieren S. Management of Type 2 Diabetes Mellitus and Prediction of Cardiovascular Complications. Utrecht, Netherland, 2013.
30. Ding Z, Lu Y, Lu Z et al. Hypoglycaemic effect of comatin, an antidiabetic substance separated from *Coprinus comatus* broth, on alloxan-induced-diabetic rats. *Food Chem*. 2010; 121:39–43.
31. Ding Z, Wang W, Wang F, Wang Q, Zhang K. Polysaccharides production by submerged fermentation of *Coprinus comatus* and their inhibitory effects on non-enzymatic glycosylation. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012; 6(7):1375-81.
32. Dotan N, Wasser SP, Mahajna J. The culinary-medicinal mushroom *Coprinus comatus* as a natural antiandrogenic modulator. *Integr Cancer Ther*. 2011; 10(2):148-59.
33. Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *Journal of Lipid Research*. 1992; 33:1569-82.
34. Engerson TD, McKelvey TG, Rhyne DB, Boggio EB, Snyder SJ, Jones HP. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic at tissues. *J Clin Invest*. 1987; 79:1564-70.
35. Etuk, EU. Animals models for studying diabetes mellitus. *Agric Biol J N Am*. 2010; 1(2):130-4.
36. Fan JM, Zhang JS, Tang QJ, Liu YF, Zhang AQ and Pan YJ. Structural elucidation of a neutral fucogalactan from the mycelium of *Coprinus comatus*. *Carbohydrate Research*. 2006; 341:1130–4.

37. Ferreira I, Baptista P, Vilas-Boas M, Barros L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: individual cap and stipe activity. *Food Chem.* 2007; 100:1511-16.
38. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1975; 44:147-59.
39. Giacco F, Brownlee M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circ Res.* 2010; 107:1058-70.
40. Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: A guide for clinicians. *Can Med Assoc J.* 2005; 172:367–79.
41. Glatzle D, Vuillenmir K. Glutathione Reductase Test with Whole Blood a Convenient Procedure for the Assessment of the Riboflavine Status in Human. *Experientia.* 1974; 30:565-638.
42. Gornall HG, Nardwall CL. Estimation of Total Protein in Tissue Homogenate. *J Biol Chem.* 1949; 177:751-6.
43. Gross JL et al. Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Diabetes Care.* 2005; 28:176–88.
44. Gul M, Kutay FZ, Temocin S, Hanninen O. Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian J Exp Biol.* 2000; 38:625–34.
45. Hagerman A, Harvey-Mueller I, Makkar, HPS. Quantification of tannins in tree foliage – a laboratory manual. FAO/IAEA: Vienna, 2000.
46. Hall M, Felton A. The St Vincent Declaration 20 years on – defeating diabetes in the 21st century. *Diabetes Voice.* 2009; 54(2):42-4.
47. Hamer I, Wattiaux R, Wattiaux-De Coninck S. Deleterious effects of xanthine oxidase on rat liver endothelial cells after chemical reperfusion. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1269:145-52.
48. Han C, Liu T. A Comparison of Hypoglycemic Activity of Three Species of Basidiomycetes Rich in Vanadium. *Biol Trace Elem Res.* 2009; 127:177–82.
49. Han C, Cui B, Wang Y. Vanadium uptake by biomass of *Coprinus comatus* and their effect on hyperglycemic mice. *Biol Trace Elem Res.* 2008; 124:35–9.
50. Han C, Yuan J, Wang Y and Li L. Hypoglycemic activity of fermented mushroom of *Coprinus comatus* rich in vanadium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 2006; 20:191-6.

51. Hawksworth DL. The magnitude of fungal diversity: the 1±5 million species estimate revisited. *Mycol Res.* 2001; 105(12):1422-32
52. He CY, Li WD, Guo SX, Lin SQ, Lin ZB. Effect of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in mice. *Journal of Asian Natural Products Research.* 2006; 8(8):705–711.
53. Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radical Biology & Medicine.* 2011; 51:993–9.
54. Hoffmeister D, Keller NP. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat Prod Rep.* 2007; 24:393–416.
55. Holliday J, Cleaver M. Medicinal Value of the Caterpillar Fungi Species of the Genus *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes). A Review. *International Journal of Medicinal Mushrooms.* 2008; 10(3):219–34.
56. Institute of Public Health of Serbia "Dr Milan Jovanovic Batut". Serbian Diabetes Registry - Incidence and mortality of diabetes in Serbia. Belgrade, Serbia, 2010.
57. International Diabetes Federation Europe, Primary Care Diabetes Europe. Diabetes: The Policy Puzzle: Is Europe Making Progress? 2011.
58. International Diabetes Federation Europe. Diabetes at Glance, IDF Diabetes Atlas, 5th ed. 2012.
59. Jayakumar T, Ramesh E, Geraldine P. Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl₄-induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology.* 2006; 44:1989–96.
60. Jayakumar T, Sakthivel M, Thomas PA, Geraldine P. *Pleurotus ostreatus*, an oyster mushroom, decreases the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain. *Chemico-Biological Interactions.* 2008; 176:108–20.
61. Jayakumar T, Thomas PA, Sheu JR, Geraldine P. *In-vitro* and *in-vivo* antioxidant effects of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Food Research International.* 2011; 44:851–61.
62. Kalac P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *J Sci Food Agric.* 2013; 93:209–18.
63. Kamalakkannan N, Prince PS. Antihyperglycaemic and Antioxidant Effect of Rutin, a Polyphenolic Flavonoid, in Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 2006; 98:97–103.

64. Kapetanović IM, Mieval II. Inhibition of Acetaminophen Induced Hepatotoxicity by Phenacetin and Its Alkoxy Analogs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1979; 209:25-30.
65. Ko WS, Hsu S, Chyau C, Chen K, Peng RY. Compound Cordyceps TCM-700C exhibits potent hepatoprotective capability in animal model. *Fitoterapia.* 2010; 81:1-7.
66. Kohen R, Nyska A. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology* 2002; 30(6):620-650.
67. Kovačeva J, Pláteník J, Vejražka M, et al. Differences in Activities of Antioxidant Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Prooxidant Xanthine Oxidoreductase/Xanthine Oxidase in the Normal Corneal Epithelium of Various Mammals. *Physiol Res.* 2007; 56:105-12.
68. Kowaltowski AJ, De Souza-Pinto N, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine.* 2009; 47:333-43.
69. Kroyer GT. Red Clover extract as antioxidant active and functional food ingredient. *Innovat Food Sci Emerg Tech.* 2004; 5:101-5.
70. Lardinois OM. Reactions of bovine liver catalase with superoxide radicals and hydrogen peroxide. *Free Radic Res.* 1995; 22:251-74.
71. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008; 51:216-26.
72. Li B, Lu F, Suo X et al. Antioxidant Properties of Cap and Stipe from *Coprinus comatus*. *Molecules.* 2010; 15:1473-1486.
73. Lv Y, Han L, Yuan C and Guo J. Comparison of Hypoglycemic Activity of Trace Elements Absorbed in Fermented Mushroom of *Coprinus comatus*. *Biol Trace Elem Res.* 2009; 131:177-85.
74. Ma Z, Fu Q. Comparison of hypoglycemic activity and toxicity of vanadium (IV) and vanadium (V) absorbed in fermented mushroom of *Coprinus comatus*. *Biol Trace Elem Res.* 2009; 132(1-3):278-84.
75. Majkić-Sing N, Spasić S, Stojanov M, Jelić-Ivanović Z, Kalimanovska-Spasojević V. *Medicinska biohemija: principi i metodi. Praktikum.* Beograd, Srbija, 1995.
76. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 2000; 21:361-70.

77. Mensink RP, Zock PL, Kester A, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77:1146–55.
78. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Nacionalni program prevencije i rane detekcije tipa dva dijabetesa. Beograd, Srbija, 2009.
79. Mohammed A, Adelaiye AB, Abubakar MS, Abdurahman EM. Effects of aqueous extract of *Ganoderma lucidum* on blood glucose levels of normoglycemic and alloxaninduced diabetic wistar rats. *Journal of Medicinal Plants Research.* 2007; 1(2):34-7.
80. Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology & Medicine.* 2007; 43:477–503.
81. Nitha B, Fijesh PV, Janardhanan KK. Hepatoprotective activity of cultured mycelium of Morel mushroom, *Morchella esculenta*. *Experimental and Toxicologic Pathology.* 2013; 65:105–12.
82. Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology.* 2008; 245:194–205.
83. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta.* 2003; 333:19–39.
84. Perera PK, Li Y. Mushrooms as a functional food mediator in preventing and ameliorating diabetes. *Functional Foods in Health and Disease.* 2011; 4:161-71.
85. Policy and Care Improvement Team. Prediabetes – Preventing the Type 2 diabetes epidemic. United Kingdom, 2009.
86. Popović M, Vukmirović S, Stilinović N, Čapo I, Jakovljević V. Anti-Oxidative Activity of An Aqueous Suspension of Commercial Preparation of The Mushroom *Coprinus comatus*. *Molecules.* 2010; 15:4564-71.
87. Rains JL, Jain SK. Oxidative Stress, Insulin Signaling And Diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2011; 50(5):567–75.
88. Redhead SA, Vilgalys R, Moncalvo J, Johnson J, Hopple JS. *Coprinus* Pers. and the Disposition of *Coprinus* Species *sensu lato*. *Taxon.* 2001; 50(1):203-41.
89. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse: Diabetes Mellitus. Beograd, Srbija, 2012.

90. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010; 49(11):1603–16.
91. Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences*. 2009; 84:705–12.
92. Sabo A, et al. Consumption of serum lipid-reducing drugs in Serbia compared with Scandinavian countries: a population-based study, 2004–2008. *Pharmacoepidemiology and drug safety*. 2011; 20(1):45-9.
93. Sabo A, Stilinovic N, Vukmirovic S, Bukumiric Z, Capo I, Jakovljevic V. Pharmacodynamic action of a Commercial Preparation of the Mushroom *Coprinus comatus* in Rats. *Phytotherapy Research*. 2010; 24:1532-7.
94. Sarikurkcu C, Tepe B, Semiz DK, Solak MH. Evaluation of metal concentration and antioxidant activity of three edible mushrooms from Mugla, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*. 2010; 48:1230–3.
95. Schneider I, Kressel G, Meyer A, Krings U, Berger RG, Hahn A. Lipid lowering effects of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in humans. *Journal Of Functional Foods*. 2011; 3: 17–24.
96. Schrier RW. Diagnostic Value of Urinary Sodium, Chloride, Urea, and Flow. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22:1610–3.
97. Shavit L, Lifschitz M, Galperin I. Influence of enteric nutrition on blood urea nitrogen (BUN) in very old patients with chronic kidney disease (CKD). *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 2012; 54:228–31.
98. Shaw JE, Sicree RA and Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2010; 87:4–14.
99. Shen GX. Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Can J Physiol Pharmacol*. 2010; 88:241–8.
100. Silberstein SD, McCrory DC. Ergotamine and Dihydroergotamine: History, Pharmacology, and Efficacy. *Headache*. 2003; 43:144-66.
101. Soares A. Hepatoprotective Effects of Mushrooms. *Molecules*. 2013; 18:7609-30.
102. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia*. 2012; 55:88–93.

103. Spasić S, Jelić-Ivanović Z, Kalimanovska-Spasojević V. Medicinska biohemija. Beograd, Srbija, 2003.
104. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. Clin Chem. 1988; 34(3):497-500.
105. Swanston-Flatt SK, Day C, Bailey CJ, Flatt PR. Traditional plant treatments for diabetes: Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. Diabetologia. 1990; 33:462-4.
106. Switala J, Loewen PC. Diversity of properties among catalases. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2002; 401:145-54.
107. Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. Physiol Res. 2001; 50:536-46.
108. The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group. Effects of Intensive Glucose Lowering in Type 2 Diabetes. N Engl J Med. 2008; 358:2545-59.
109. The ADVANCE Collaborative Group. Intensive Blood Glucose Control and Vascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. N Engl J Med. 2008; 358:2560-72.
110. The Decode Study Group. Age- and Sex-Specific Prevalences of Diabetes and Impaired Glucose Regulation in 13 European Cohorts. Diabetes Care. 2003; 26:61-9.
111. Tobert JA. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. Nature Reviews. 2003; 2:517-26.
112. Tsai SY, Tsai HL, Mau JL. Antioxidant properties of *Coprinus comatus*. Journal of Food Biochemistry. 2009; 33:368-389.
113. UK Prospective Diabetes Study Group (UKPDS). Intensive Blood-glucose Control With Sulphonylureas or Insulin Compared With Conventional Treatment and Risk Of Complications In Patients With Type 2 Diabetes (UKPDS 33). Lancet. 1998; 352:837-53.
114. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. Current Neuropharmacology. 2009; 7:65-74.
115. Vaupotic T, Veranic P, Jenoe P, Plemenitas A. Mitochondrial mediation of environmental osmolytes discrimination during osmoadaptation in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. Fungal Genetics and Biology. 2008; 45:994-1007.

116. Vaz JA, Barros L, Martins A, et al. Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. *Food Chemistry*. 2011; 126:610–16.
117. Vellinga EC, De Kok RPJ, Bruns TD. Phylogeny and taxonomy of *Macrolepiota* (Agaricaceae). *Mycologia*. 2003; 95(3):442–56.
118. Vlada Republike Srbije. Strategija za prevenciju i kontrolu hroničnih nezaraznih bolesti. Beograd, Srbija, 2009.
119. Wasser SP. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011; 89:1323–32.
120. Wei W, Liu Q, Tan Y, Liu L, Li X, Cai L. Oxidative Stress, Diabetes, And Diabetic Complications. *Hemoglobin*. 2009; 33(5):370–7.
121. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2011; 94:311–21.
122. Whittaker RH. New Concepts of Kingdoms of Organisms. *Science*. 1969; 163(3863):150-60.
123. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004; 27:1047–53.
124. Wright JR. Almost famous: E. Clark Noble, the common thread in the discovery of insulin and vinblastine. *CMAJ*. 2002; 167(12):1391-6.
125. Yamac M, Zeytinoglu M, Kanbak G, Bayramoglu G and Senturk H. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by *Cerrena unicolor*, *Coprinus comatus*, and *Lenzites betulina* isolates in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmaceutical Biology*. 2009; 47(2):168-74.
126. Yilmaz N, Solmaz M, Turkecul I and Elmastas M. Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. *Food Chemistry*. 2006; 99:168-74.
127. Yu J, Cui P, Zeng W et al. Protective effect of selenium-polysaccharides from the mycelia of *Coprinus comatus* on alloxan-induced oxidative stress in mice. *Food Chemistry*. 2009; 117:42–7.

128. Zaidman BZ, Wasser SP, Nevo E and Mahajna J. *Coprinus comatus* and *Ganoderma lucidum* interfere with androgen receptor function in LNCaP prostate cancer cells. *Mol Biol Rep.* 2008; 35:107–17.
129. Zhang HN, He JH, Yuan L, Lin ZB. In vitro and in vivo protective effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on alloxan-induced pancreatic islets damage. *Life Sciences.* 2003; 73:2307–19.
130. Zhang HN, Lin Z. Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Acta Pharmacol Sin.* 2004; 25(2):191-5.
131. Zhang Z, Cui F. Non-enzymatic glycosylation reaction contributes to a rise of blood glucose in alloxan-induced diabetic rats. *Int J Diabetes & Metabolism.* 2007; 15:52-9.
132. Zhou G, Han C. The Co-effect of Vanadium and Fermented Mushroom of *Coprinus comatus* on Glycaemic Metabolism. *Biol Trace Elem Res.* 2008; 124:20–7.
133. Zhou X, Gong Z, Su Y, Lin J, Tang K. Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products. *Journal Of Pharmacy And Pharmacology.* 2009; 61:279–91.
134. Ziech D, Franco R, Pappa A, Panayiotidis MI. Reactive Oxygen Species (ROS)—Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutation Research.* 2011; 711:167–73.