

# Citotoksično djelovanje ekstrakta gljive *Cantharellus cibarius* na OVCAR-3 staničnoj liniji karcinoma jajnika

---

**Merčep, Anđela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:138400>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-05**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**  
**I**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Anđela Merčep**

**CITOTOKSIČNO DJELOVANJE EKSTRAKTA GLJIVE *CANTHARELLUS CIBARIUS*  
NA OVCAR-3 STANIČNOJ LINIJI KARCINOMA JAJNIKA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2022./2023.**

**Mentor:**

**izv. prof. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić**

**Split, listopad 2023.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet  
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA  
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti

**Znanstveno polje:** Farmacija

**Tema rada:** prihvaćena je na 79. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 35. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko- tehnološkog fakulteta i na 24. sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić

## CITOTOKSIČNO DJELOVANJE EKSTRAKTA GLJIVE *CANTHARELLUS CIBARIUS* NA STANIČNOJ LINIJI KARCINOMA JAJNIKA OVCAR-3

Anđela Merčep, broj indeksa 201818

### Sažetak:

**Cilj istraživanja:** Cilj ovog istraživanja bio je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje vodenih ekstrakata gljive *Cantharellus cibarius* dobivenih pri 25°C i 70°C na staničnoj liniji karcinoma jajnika OVCAR-3. Pretpostavljeno je da će se broj stanica karcinoma jajnika, nakon tretiranja vodenim ekstraktima gljive *Cantharellus cibarius*, smanjiti u odnosu na kontrolnu skupinu.

**Materijali i metode:** Citotoksično djelovanje ispitivano je korištenjem MTT testa. Ekstrakti su pripremljeni u 6 različitih koncentracija: 1 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL i 1000 µg/mL, a učinak je promatran nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije. Djelotvornost ekstrakata gljive *Cantharellus cibarius* određivana je spektrofotometrijski pri 570 nm. Usporedbom apsorbancije nastalog formazana kod stanica tretiranih ekstraktima gljive (ispitivana skupina) i netretiranih stanica (kontrolna skupina) određen je postotak metabolički aktivnih stanica.

**Rezultati:** Rezultati su prikazani grafički u odnosu stanične vijabilnosti (%) i koncentracije ekstrakta. Vodeni ekstrakti gljive *Cantharellus cibarius* dobiveni pri 25°C i 70°C pokazali su sličan učinak. Za oba ekstrakta najznačajniji rezultati ostvareni su nakon 72 sata inkubacije pri koncentracijama od 500 µg/mL i 1000 µg/mL. Ekstrakt dobiven pri 25°C pri koncentraciji od 500 µg/mL smanjio je staničnu vijabilnost na 81,5%, a pri koncentraciji od 1000 µg/mL stanična vijabilnost iznosila je 68%. Ekstrakt dobiven pri 70°C pri objema koncentracijama smanjio je staničnu vijabilnost na 69%.

**Zaključak:** Vodeni ekstrakti gljive *Cantharellus cibarius* dobiveni pri 25°C i 70°C doveli su do smanjenja stanične vijabilnosti stanica karcinoma jajnika stanične linije OVCAR-3. Ispitivani ekstrakti uglavnom pokazuju citotoksičnu aktivnost ovisnu o vremenu izlaganja i koncentraciji ekstrakta. U nekim slučajevima citotoksična aktivnost ekstrakata gljive nije razmjerna povećanju koncentracije ekstrakta i vremena izlaganja, a nekim slučajevima došlo je i do blagog porasta broja metabolički aktivnih stanica. Vodeni ekstrakti gljive *Cantharellus cibarius* dobiveni pri 25°C i 70°C pokazuju slično citotoksično djelovanje. Oba ekstrakta značajne rezultate ostvaruju nakon 72 sata inkubacije pri koncentracijama od 500 µg/mL i 1000 µg/mL. Ekstrakti gljive nisu postigli IC<sub>50</sub> vrijednost. Dobiveni rezultati pokazuju citotoksično djelovanje vodenih ekstrakata gljive *Cantharellus cibarius*, no za potvrdu dobivenih rezultata i citotoksične aktivnosti potrebna su dodatna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja.

**Ključne riječi:** gljiva *Cantharellus cibarius*, OVCAR-3, karcinom jajnika, MTT test

**Rad sadrži:** 56 stranica, 8 tablica, 18 slika i 48 referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

### Sastav povjerenstva:

1. doc. dr. sc. Dario Leskur - predsjednik povjerenstva
2. doc. dr. sc. Marina Degoricija - član
3. izv. prof. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić - član - mentor

**Datum obrane:** 9. listopada 2023.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## GRADUATE THESIS

**Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine  
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy  
University of Split, Croatia**

**Scientific area:** Biomedical science

**Scientific field:** Pharmacy

**Thesis subject:** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 79 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 35 and Faculty Council of School of Medicine, session no. 24

**Mentor:** Assoc. prof. Nikolina Režić Mužinić

### **CYTOTOXIC EFFECT OF *CANTHARELLUS CIBARIUS* MUSHROOM EXTRACT ON OVARIAN CANCER CELL LINE OVCAR-3**

Andela Merčep, index number 201818

#### **Summary:**

**Objective:** The aim of this research was to examine the potential cytotoxic effect of *Cantharellus cibarius* mushroom aqueous extracts obtained at 25°C and 70°C on the ovarian cancer cell line OVCAR-3. It was assumed that the number of ovarian cancer cells, after treatment with aqueous extracts of *Cantharellus cibarius* mushroom, will decrease compared to the control group.

**Materials and methods:** Cytotoxic activity was examined using the MTT assay. The extracts were prepared in 6 different concentrations: 1 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL and 1000 µg/mL and the effect was observed after 24, 48 and 72 hours of incubation. The effectiveness of *Cantharellus cibarius* mushroom extracts was determined spectrophotometrically at 570 nm. The percentage of metabolically active cells was determined by comparing the absorbance of the formed formazan in cells treated with mushroom extracts (test group) and untreated cells (control group).

**Results:** The results are graphically presented in relation to cell viability (%) and extract concentration. Aqueous extracts of *Cantharellus cibarius* mushroom obtained at 25°C and 70°C showed similar effects. For both extracts, the most significant results were achieved after 72 hours of incubation at concentrations of 500 µg/mL and 1000 µg/mL. The extract obtained at 25°C at a concentration of 500 µg/mL reduced the cell viability to 81.5%; at a concentration of 1000 µg/mL, the cell viability was 68%. The extract obtained at 70°C at both concentrations reduced cell viability to 69%.

**Conclusion:** Aqueous extracts of *Cantharellus cibarius* mushroom obtained at 25°C and 70°C led to a decrease in cell viability of *in vitro* exposed ovarian cancer cells of the OVCAR-3 cell line. The examined extracts mainly show cytotoxic activity depending on the exposure time and the concentration of the extract. In some cases, the cytotoxic activity of the mushroom extracts is not proportional to the increase in the concentration of the extract, and the exposure time and in some cases, there was a slight increase in the number of metabolically active cells. Aqueous extracts of *Cantharellus cibarius* obtained at 25°C and 70°C show a similar cytotoxic effect on ovarian cancer cells of the OVCAR-3 cell line. Both extracts achieve significant results after 72 hours of incubation at concentrations of 500 µg/mL and 1000 µg/mL. Mushroom extracts did not reach the IC<sub>50</sub> value. The obtained results show the cytotoxic effect of *Cantharellus cibarius* mushroom aqueous extracts, but additional *in vitro* and *in vivo* studies are needed to confirm the obtained results and cytotoxic activity.

**Keywords:** *Cantharellus cibarius* mushroom, OVCAR-3, ovarian cancer, MTT assay

**Thesis contains:** 56 pages, 8 tables, 18 figures i 48 references

**Original in:** Croatian

#### **Defence committee:**

1. Asst. prof. Dario Leskur PhD - chair person
2. Asst. prof. Marina Degoricija PhD - member
3. Assoc. prof. Nikolina Režić Mužinić PhD - member - supervisor

**Defence date:** October 9<sup>th</sup>, 2023.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD.....  | 1  |
| 1.1. NOVOTVORINE .....  | 2  |
| 1.2. KARCINOM.....  | 4  |
| 1.3. ONKOGENI I TUMORSUPRESORSKI GENI.....                                  | 5  |
| 1.4. RAK JAJNIKA .....  | 10 |
| 1.4.1. ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA .....                                    | 10 |
| 1.4.2. KLINIČKA SLIKA.....  | 12 |
| 1.4.3. DIJAGNOZA .....  | 12 |
| 1.4.4. LIJEČENJE.....   | 14 |
| 1.5. GLJIVA <i>CANTHARELLUS CIBARIUS</i> .....                              | 15 |
| 1.6. FENOLNI SPOJEVI IZOLIRANI IZ GLJIVE <i>CANTHARELLUS CIBARIUS</i> ..... | 17 |
| 1.6.1. GALNA KISELINA .....   | 17 |
| 1.6.2. PROTOKATEHUINSKA KISELINA.....                                       | 18 |
| 1.6.3. P-HIDROKSIBENZOJEVA KISELINA.....                                    | 18 |
| 1.6.4. KOFEINSKA KISELINA.....  | 19 |
| 1.6.5. FERULINSKA KISELINA .....  | 19 |
| 1.6.6. MIRICETIN .....  | 20 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....  | 21 |
| 2.1. CILJ ISTRAŽIVANJA .....  | 22 |
| 2.2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA.....   | 22 |
| 3. MATERIJALI I METODE.....   | 23 |
| 3.1. STANIČNA LINIJA OVCAR-3.....   | 24 |
| 3.2. PRIPREMA VODENIH EKSTRAKATA GLJIVE <i>CANTHARELLUS CIBARIUS</i> .....  | 25 |
| 3.3. POSTUPAK.....  | 25 |
| 3.4. TEST CITOTOKSIČNOSTI - MTT TEST .....                                  | 27 |
| 3.5. STATISTIČKA ANALIZA .....  | 29 |
| 4. REZULTATI.....   | 30 |

|  |    |
|--|----|
| 4.1. STANIČNA LINIJA OVCAR-3 - REZULTATI NAKON 24 h.....                         | 31 |
| 4.1.1. VODENI EKSTRAKT GLJIVE <i>CANTHARELLUS CIBARIUS</i> DOBIVEN PRI 25°C..... | 31 |
| 4.1.2. VODENI EKSTRAKT GLJIVE <i>CANTHARELLUS CIBARIUS</i> DOBIVEN PRI 70°C..... | 32 |
| 4.2. STANIČNA LINIJA OVCAR-3 - REZULTATI NAKON 48 h.....                         | 33 |
| 4.2.1. VODENI EKSTRAKT GLJIVE <i>CANTHARELLUS CIBARIUS</i> DOBIVEN PRI 25°C..... | 33 |
| 4.2.2. VODENI EKSTRAKT GLJIVE <i>CANTHARELLUS CIBARIUS</i> DOBIVEN PRI 70°C..... | 34 |
| 4.3. STANIČNA LINIJA OVCAR-3 - REZULTATI NAKON 72 h.....                         | 35 |
| 4.3.1. VODENI EKSTRAKT GLJIVE <i>CANTHARELLUS CIBARIUS</i> DOBIVEN PRI 25°C..... | 35 |
| 4.3.2. VODENI EKSTRAKT GLJIVE <i>CANTHARELLUS CIBARIUS</i> DOBIVEN PRI 70°C..... | 36 |
| 5. RASPRAVA .....  | 37 |
| 6. ZAKLJUČCI.....  | 42 |
| 7. LITERATURA .....  | 44 |
| 8. SAŽETAK .....   | 50 |
| 9. SUMMARY .....   | 52 |
| 10. ŽIVOTOPIS .....  | 55 |

## **Zahvala**

*Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr.sc. Nikolini Režić Mužinić na stručnom vodstvu, posvećenom vremenu i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala mojim prijateljima što su razdoblje studiranja učinili lakšim i ljepšim.*

*Veliko hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi i podršci tijekom cijelog obrazovanja.*

## POPIS KRATICA:

$\beta$ -hCG – (engl. *β-human chorionic gonadotropin*); beta humani korionski gonadotropin

BRCA1, BRCA2 - (engl. *BReast CAncer gene*); geni čije su mutacije povezane s nasljednom sklonošću razvoja raka dojke i jajnika

CA 125 – (engl. *cancer antigen 125*); tumorski antigen 125, tipični tumorski marker

CDK – (engl. *cyclin-dependent kinases*); kinaze ovisne o ciklinima

COX 1, COX 2 – (engl. *cyclooxygenase*); ciklooksigenaza, enzim odgovoran za formiranje bioloških medijatora koji imaju ulogu u pojavi upale i boli

CTLA-4 – (engl. *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*); citotoksični protein povezan s T-limfocitima

DKS – diferencijalna krvna slika

DMEM – (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*); hranjivi medij za uzgoj stanica

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

EGFR – (engl. *epidermal growth factor receptor*); receptor epidermalnog faktora rasta

ERK – (engl. *extracellular signal-regulated kinases*); kinaza regulirana izvanstaničnim signalom

FBS – (engl. *fetal bovine serum*); fetalni goveđi serum

HER2 – (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*); receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2

KKS – kompletna krvna slika

LDH – (engl. *lactate dehydrogenase*); laktat dehidrogenaza

LHRH agonist – (engl. *luteinizing hormone-releasing hormone*); agonist hormona koji stimulira lučenje luteinizirajućeg hormona

LH – (engl. *luteinizing hormone*); luteinizirajući hormon

MAP-kinaza – (engl. *mitogen-activated protein kinase*); mitogenom aktivirana protein kinaza

MEK – (engl. *mitogen-activated protein kinase enzyme*); enzim koji fosforilira protein kinazu aktiviranu mitogenima

MET – (engl. *mesenchymal epithelial transition*); mezenhimalna epitelna tranzicija, gen za receptor s tirozin-kinaznom aktivnošću



MSCT – (engl. *multi-slice computer tomography*); kompjutorizirana tomografija

mTOR – (engl. *the mammalian target of rapamycin*); meta rapamicina kod sisavaca

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat

NF- $\kappa$ B – (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*); nuklearni faktor kapa-lakih lanaca-pojačivač aktiviranih B stanica

PARP – (engl. *poly (ADP-ribose) polymerase*); poli (ADP-riboza) polimeraza

PBS – (engl. *phosphate-buffered saline*); fosfatni pufer

PD-1 – (engl. *programmed cell death protein 1*); protein programirane stanične smrti 1

P53 – gen za protein p53

p53 – tumorsupresorski protein

Ras – (engl. *rat sarcoma*; protoonkogen); nazvan po otkriću transformirajućeg načela virusa štakorskog sarcoma

Raf – (engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*; retrovirusni onkogen); transduciran izolatom mišjeg sarcoma

RB – (engl. *retinoblastoma*); prvi izolirani tumorsupresorski gen izoliran kod retinoblastoma

Rb – (engl. *retinoblastoma protein*); proteinski produkt tumorsupresorskog gena RB

RET – (engl. *rearranged during transfection*; protoonkogen); gen za receptor s tirozin-kinaznom aktivnošću

ROS – (engl. *reactive oxygen species*); reaktivni kisikovi spojevi

VEGF – (engl. *vascular endothelial growth factor*); vaskularni endotelni faktor rasta

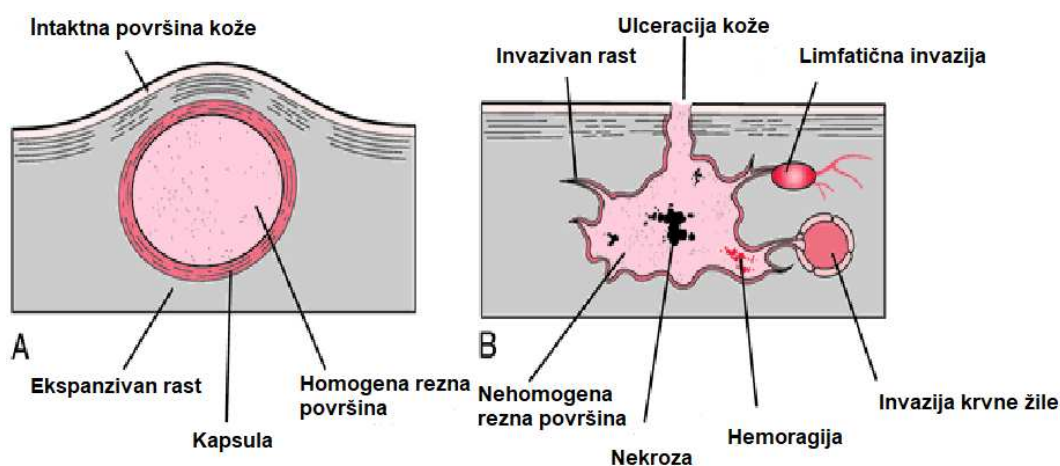
## **1. UVOD**

## 1.1. NOVOTVORINE

Novotvorine, tumori ili neoplazme patološke su tvorbe nastale trajno poremećenom proliferacijom abnormalnih stanica (1). Proces pretvorbe normalnih stanica u tumorske stanice naziva se neoplastičnom pretvorbom. To je složen proces koji rezultira pojavom nasljednih genetskih promjena kod potomaka transformiranih stanica. Genetske razlike među normalnim i malignim stanicama uključuju kvalitativne promjene (mutacije gena) i kvantitativne promjene (delecije ili amplifikacije specifičnih gena ili cijelih kromosoma) (2). Maligne stanice imaju poremećaj u regulaciji mehanizama koji sudjeluju u proliferaciji, diferencijaciji i preživljenju normalnih stanica. Ove stanice imaju smanjenu potrebu za faktorima rasta što pridonosi njihovoj nereguliranoj proliferaciji. Do navedenog dolazi zbog činjenice da maligne stanice same stvaraju faktore rasta potrebne za vlastitu proliferaciju, a u nekim slučajevima posljedica je poremećaja unutarstaničnog signalnog puta, kao što je nekontrolirana aktivnost receptora za faktor rasta. Još jedna značajka malignih stanica je izostanak normalne diferencijacije, stanice ostaju zaustavljene u ranoj fazi diferencijacije u kojoj se događa stalna aktivna proliferacija pa su stanice sposobne dijeliti se i umnožavati. Dok normalne stanice nakon oštećenja DNK (deoksiribonukleinske kiseline) umiru apoptozom, programiranom staničnom smrću, kod malignih stanica to se ne događa. Osim što uspješno izbjegavaju apoptozu, većina ovih stanica može se neograničeno dijeliti zbog eksprimiranja telomerase potrebne za održavanje krajeva eukariotskih kromosoma što igra ulogu u nezaustavljivom rastu tumorskih stanica (3).

Tumori se svrstavaju na osnovu nekoliko principa, pa tako razlikujemo kliničku, morfološku, etiološku i histogenetsku klasifikaciju. Za kliničke i terapijske svrhe tumori se dijele u dvije skupine: dobroćudne i zloćudne novotvorine. Dobroćudne tumore karakterizira ograničen rast na mjestu nastanka, ne šire se u okolna normalna tkiva niti u druge dijelove tijela. Ovi tumori ne narušavaju bitno zdravlje čovjeka, te imaju povoljne kliničke ishode. S druge strane, zloćudni tumori, koji se nazivaju još i rakom, obilježeni su bržim rastom u odnosu na dobroćudne tumore, širenjem u susjedna normalna tkiva, te mogućnošću širenja u druge dijelove tijela preko krvožilnog ili limfnog sustava (slika 1). Ovakav način širenja naziva se metastaziranje (grč. *metastasis* - promjena mjesta) (1, 4). Pretpostavlja se da su za metastaziranje tumor zaslužne tumorske karakteristike kao što su imunosupresija, upala, angiogeneza/vaskularna propusnost, limfangiogeneza, organotropizam i reprogramiranje (5).

Sposobnost širenja i metastaziranja čini zloćudne tumore opasnim za ljudsko zdravlje. Dok je dobroćudne tumore najčešće moguće kirurški ukloniti, zloćudne tumore često nije moguće u cijelosti ukloniti zbog čega učestalo recidiviraju nakon operacije. Zloćudni tumori mogu uzrokovati i sistemske simptome, kao što su slabost, gubitak tjelesne mase, a ukoliko se ne liječe mogu djelovati pogubno, te dovesti do smrti oboljelog (1, 4).



**Slika 1.** Razlike u morfologiji dobroćudnog i zloćudnog tumora

Preuzeto s: <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/benign+tumor>

Datum preuzimanja: 4.9.2023.

Morfološka podjela tumora nije jedinstvena već ovisi o primjenjenim metodama i kliničkopatološkom pristupu. Ovom podjelom određuje se stadij tumora, njegova veličina, lokalno širenje u susjedna tkiva i organe, te proširenost na udaljena mjesta u tijelu (6).

Etiološkom klasifikacijom tumora cilj je otkriti uzrok razvoja različitih tumora. Tumori nastaju međusobnim djelovanjem faktora okoliša (karcinogeni) i individualnih (genetičkih) predispozicija bolesnika. Poremećaj u ravnoteži između ovih čimbenika dovodi do nastanka somatskih genetskih (DNK) promjena. Kada se u stanicama dogode genetske promjene dolazi do nekontroliranog i neusklađenog rasta tih stanica. Iako i faktori okoliša i genetičke predispozicije imaju ulogu u razvoju tumora, u većini tumora glavna etiološka komponenta upravo su faktori okoliša (6). Među neke od uzročnika nastanka raka spadaju zračenje, kemikalije i virusi.

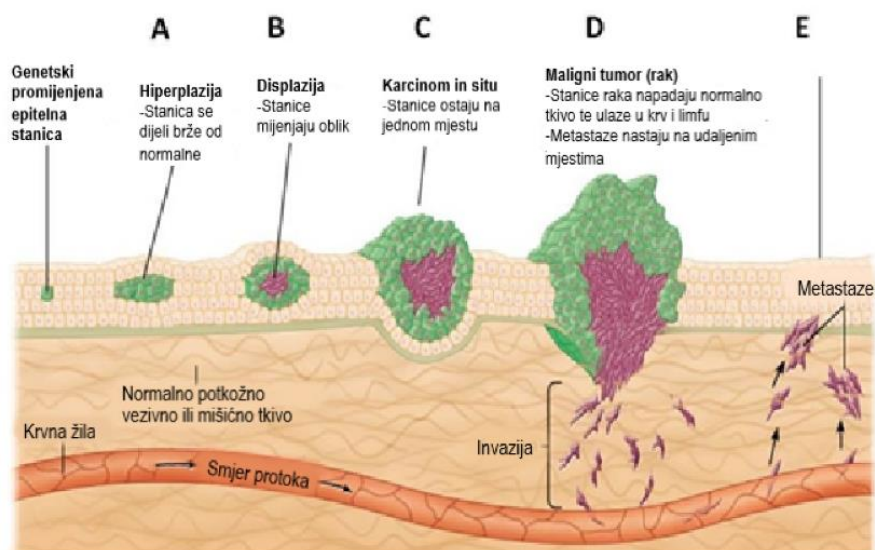
Zračenje i mnogi kemijski karcinogeni djeluju na način da oštećuju DNK i induciraju nastanak mutacija. Karcinogeni koji najčešće dovode do nastanka raka kod ljudi su Sunčevo ultraljubičasto zračenje, kemikalije iz duhanskog dima, te aflatoksin (karcinogen koji nastaje zbog neodgovarajuće pohrane različitih vrsta zrnja). Kemikalije iz duhanskog dima povezane su sa skoro 90% svih slučajeva raka pluća, a odgovorni su i za jednu trećinu smrtnih slučajeva uzrokovanih rakom. Neki karcinogeni ne dovode do nastanka mutacija, već stimuliraju proliferaciju stanica, te na taj način dovode do razvoja raka. Takvi spojevi nazivaju se promotorima tumora. Hormoni kao što su estrogeni, važni su promotori nastanka raka kod ljudi. Prekomjerno izlaganje estrogenima, zbog njihove stimulacije proliferacije stanica endometrija, može dovesti do nastanka karcinoma trupa maternice. Uzročnici raka mogu biti i virusi i bakterije. Infekcija bakterijom *Helicobacter pylori* poznat je uzročnik raka želuca, dok su najčešće vrste raka uzrokovane virusima rak jetre i rak grlića maternice, one zajedno čine 10-20% svih dijagnosticiranih slučajeva raka u svijetu (7).

Histogenetski i dobroćudne i zloćudne tumore razlikujemo prema vrsti stanica ili tkiva iz kojih se tumor razvio. Tako razlikujemo epitelne, mezenhimalne, neuralne tumore, tumore limfocita i hematopoetskih stanica, tumore potpornih stanica živčanog sustava te tumore spolnih stanica (6).

## 1.2. KARCINOM

Karcinom (lat. *carcinoma*) je maligni tumor epitelnih stanica. U većini slučajeva zadržava pojedine značajke epitela iz kojeg se razvio, zbog čega se po njemu i naziva. Tako razlikujemo karcinom prijelaznog epitela mokraćnog mjehura ili urotelni karcinom i karcinom pločastog epitela. Karcinomi se dijele u dvije glavne podskupine: adenokarcinome, koji se razvijaju u organu ili žlijezdi i karcinome pločastih stanica, koji nastaju u pločastom epitelu. Adenokarcinomi predstavljaju zloćudne tumore žljezdanog podrijetla. Pojavljuju se u sluznicama i prvo su vidljivi kao bijelo zadebljanje sluznice poput plaka. Često se lako šire kroz meka tkiva u kojima se pojavljuju. Najčešće nastaju od epitelnih stanica endometrija, sluznice dišnog i probavnog sustava, epitelnih slojeva dojke, te površinskog sloja jajnika. Maligni tumori solidnih unutarnjih organa nazivaju se prema organima u kojima su nastali, kao naprimjer

hepatocelularni karcinom ili karcinom bubrega. Karcinom karakterizira invazivan rast, razvija se postupno iz preinvazivnih promjena u žljezdanom ili pločastom epitelu iz kojeg tumor potječe (slika 2.). Pojava karcinoma vrlo je česta, te predstavlja 80-90% svih dijagnosticiranih slučajeva raka (8, 9).



**Slika 2.** Faze razvoja tumora i mehanizam metastaziranja

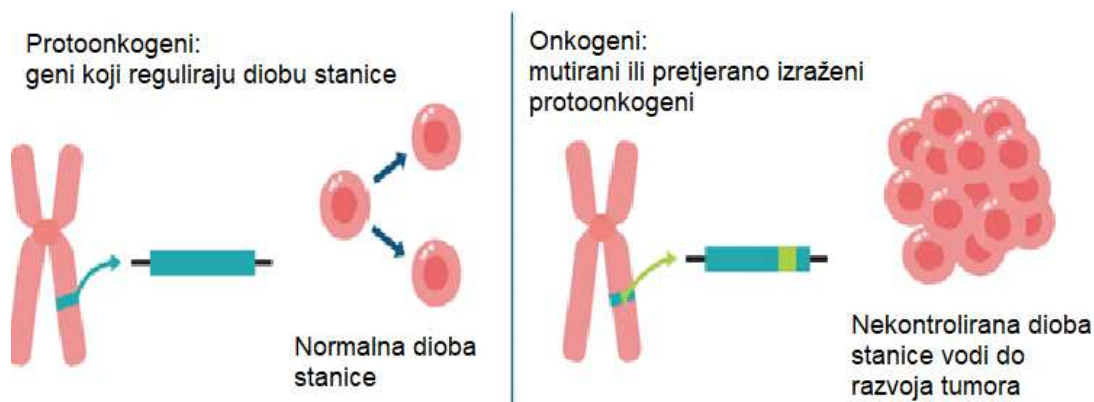
Preuzeto s: [https://www.researchgate.net/figure/Stages-of-tumor-development-and-mechanism-of-metastasis\\_fig2\\_278644130](https://www.researchgate.net/figure/Stages-of-tumor-development-and-mechanism-of-metastasis_fig2_278644130)

Datum preuzimanja: 4.9.2023.

### 1.3. ONKOGENI I TUMORSUPRESORSKI GENI

Protoonkogeni su normalni stanični geni koji sudjeluju u regulaciji staničnog rasta i diobe, a ujedno su uključeni i u prijenos signala u stanici. Promjena protoonkogena ili njihovih proteinskih produkata u aktivniju inačicu dovodi do nastanka onkogena. Ovaj proces naziva se aktivacijom onkogena. Onkogeni predstavljaju prve gene za koje se otkrilo da imaju glavnu ulogu u nastanku raka. Aktivacijom onkogena dolazi do nekontroliranog rasta i diobe stanica, što dovodi do nastanka raka (slika 3). Aktivacija onkogena događa se na nekoliko načina, među kojima se ističu mutacija u samom genu (RAS), genska amplifikacija, odnosno povećanje broja

kopija gena (ERBB2 poznatiji kao HER2/neu), te kromosomska translokacija, poremećaj u kojem se jedan dio kromosoma odlomi te premjesti na drugi kromosom (MYC) (10).



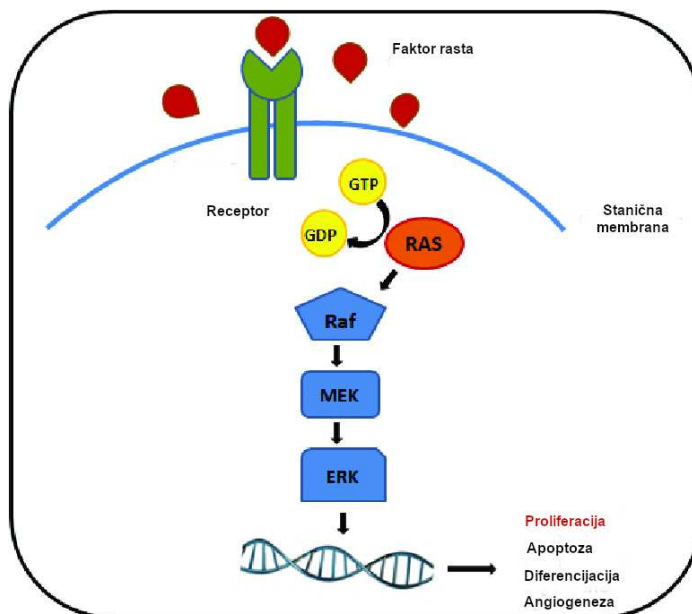
**Slika 3.** Aktivacija onkogeni

Preuzeto s: <https://biocare.net/news/biocare-basics-oncogenes/>

Datum preuzimanja: 4.9.2023.

Otkriveni su brojni onkogeni koji sudjeluju u različitim fazama prijenosa signala. Onkogeni kao što su EGFR, ERBB2, MET, RET i KIT geni su za receptore čimbenika rasta koji se većinom ubrajaju u skupinu receptora s tirozin-kinaznom aktivnošću. Onkogeni RAF, RAS, MOS, SRC geni su za molekule koje prenose signal nizvodno od receptora čimbenika rasta, dok su JUN, FOS, MYB, MYC geni za transkripcijske čimbenike na kraju signalnog puta. U nastanku raka važnu ulogu ima Ras-Raf-MEK-ERK signalni put (slika 4). Različite komponente ovog puta mutirane su u različitim tipovima raka. Neki lijekovi kao što su sorafenib, dabrafenib, vemurafenib, kobimetinib, trametinib djeluju specifično na Ras-Raf-MEK-ERK signalni put, dok su mutacije gena Ras zaslužne za rezistenciju na terapiju panitumumabom i cetuksimabom. Ras je uključen i u druge signalne puteve poput onoga koji aktivira protein mTOR. Ovaj protein cilj je djelovanja lijekova za rak everolimusa i temsirolimusa. Poznavanje uloge onkogeni i signalnih putova u nastanku raka omogućilo je razvoj brojnih ciljanih lijekova kao što su

monoklonalna protutijela među kojima se ističu cetuksimab, panitumumab, trastuzumab te inhibitori protein-kinaza sunitinib, sorafenib, imatinib, lapatinib i brojni drugi (10).



**Slika 4.** Biološka uloga signalnog puta Ras-Raf-MEK-ERK

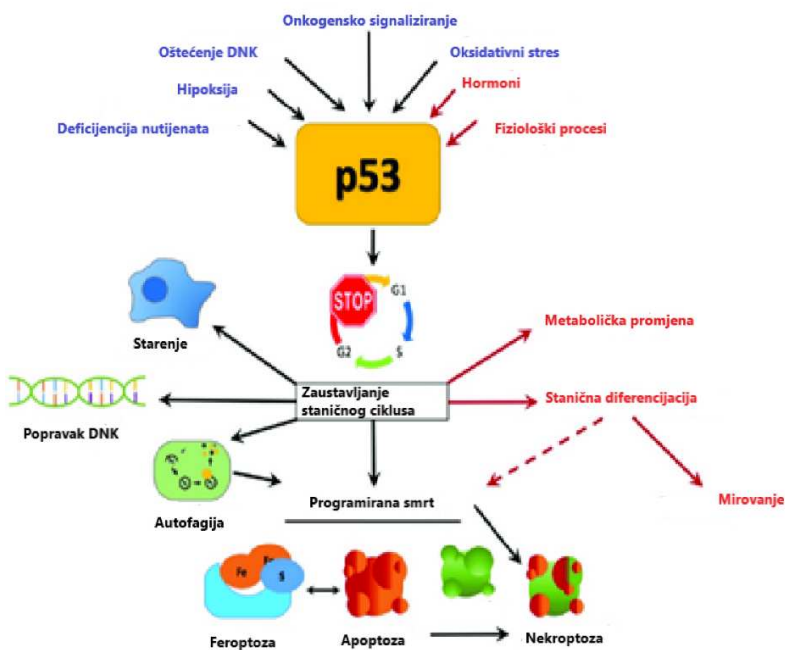
Preuzeto s: [https://www.researchgate.net/figure/The-biological-role-of-the-Ras-Raf-MEK-ERK-signaling-pathway-in-the-occurrence-and\\_fig1\\_329322564](https://www.researchgate.net/figure/The-biological-role-of-the-Ras-Raf-MEK-ERK-signaling-pathway-in-the-occurrence-and_fig1_329322564)

Datum preuzimanja: 4.9.2023.

Tumorsupresorski geni, prigušivači ili kočničari raka geni su koji zaustavljaju rast novotvorina. Djeluju kao antionkogeni, te suprimiraju prekomjernu proliferaciju stanica. Kada se ovi geni izgube delecijom ili zbog mutacije prestanu normalno funkcionirati dolazi do nastanka raka. Gubitak tumorsupresorskog gena evidentira se kao gubitak heterozigotnosti (11). Prvi otkriveni tumorsupresorski gen bio je RB, povezan s retinoblastomom, rakom mrežnice. Drugi posebno važan tumorsupresorski gen je p53 koji je često mutiran u različitim tipovima raka. Transkripcijski čimbenik p53, proteinski produkt gena p53, aktivira se zbog oštećenja stanične DNK ili nekih drugih poremećaja nastalih zbog staničnog stresa. Aktivirani p53 zaustavlja prolazak stanice s oštećenom DNK iz faze G1 u S-fazu ciklusa, te aktivira popravak oštećene DNK ili apoptozu. Oštećenje stanične DNK povećava mogućnost pretvorbe normalne stanice u



stanicu raka. P53, zaustavljajući prolazak stanice kroz stanični ciklus, omogućuje popravak oštećene stanične DNK prije nego što se oštećena DNK replicira. Ako je popravak oštećenja nepotpun ili defektan, stanica se upućuje u apoptozu ili alternativno ostaje trajno zakočena, što se očituje starenjem. Ako se oštećenje prepozna kao nepopravljivo, djelovanjem transkripcijskog čimbenika p53, stanica odmah ulazi u apoptozu i umire (slika 5.). Na taj način sprječava se mogućnost razvoja raka. U slučaju nedostatka ili inaktivacije gena p53, u diobu stanice ulaze i stanice s oštećenom DNK čime se povećava mogućnost nastanka raka (11, 12).



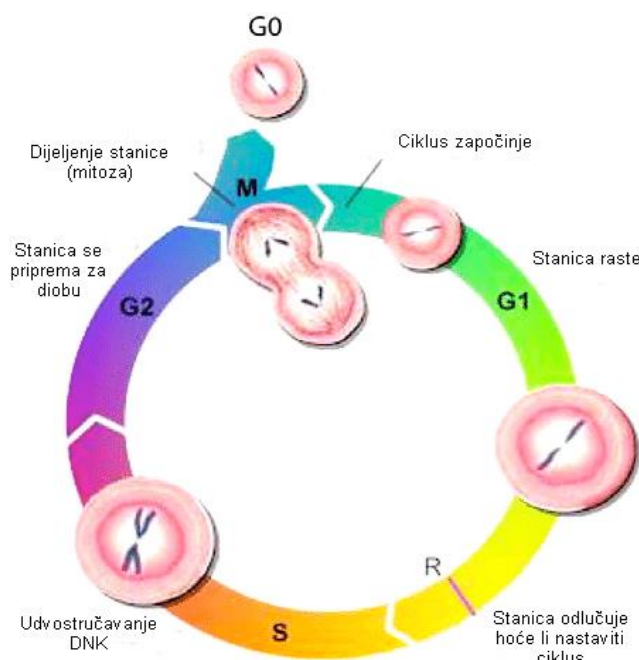
**Slika 5.** Uloga tumorsupresorskog gena p53

Preuzeto s: [https://www.researchgate.net/figure/p53-canonical-and-non-canonical-tumor-suppressor-roles-of-p53-p53-is-activated-by-a\\_fig1\\_325657277](https://www.researchgate.net/figure/p53-canonical-and-non-canonical-tumor-suppressor-roles-of-p53-p53-is-activated-by-a_fig1_325657277)

Datum preuzimanja: 5.9.2023.

Nastanak raka može biti posljedica poremećaja u regulaciji staničnog ciklusa. Stanični ciklus sastoji se od četiriju faza. U fazi G1 stanica se priprema za sintezu DNK, dok fazu S karakterizira udvostručavanje DNK. Nadalje, u fazi G2 stanica se priprema za mitozu, te se naposljetku u fazi M mitozom dijeli na dvije stanice kćeri (slika 6.). Prolazak kroz stanični ciklus

složeno je reguliran i pod utjecajem je brojnih signala koji dolaze od same stanice i iz njezine okoline. U kontrolnim točkama staničnog ciklusa provjerava se je li stanica spremna za ulazak u sljedeću fazu ciklusa. U ovim točkama zaustavlja se prolazak stanica s oštećenom DNK u iduću fazu ciklusa. Budući da stanice raka imaju oštećenu DNK, za razvoj raka nužno je postojanje poremećaja u regulaciji staničnog ciklusa. U regulaciji staničnog ciklusa važnu ulogu imaju kinaze ovisne o ciklinima (engl. *cyclin-dependent kinases* - CDK) i inhibitori kinaza ovisnih o ciklinima. S obzirom da je za normalan rast i diobu stanica važna kontrola staničnog ciklusa, nije iznenađujuće što su kod raka često mutirani geni uključeni u ovu regulaciju. Istaknutu ulogu u toj regulaciji ima prethodno spomenuti tumorsupresorski gen RB (12). Rb, produkt tumorsupresorskog gena RB, sprječava prolazak stanice kroz restriksijsku točku u G1 fazu ciklusa. Kod normalnim stanicama ovaj prolazak je reguliran kompleksima Cdk4,6/ciklin D koje Rb fosforilira i inaktivira (13). U većini stanica različitih tipova raka narušena je uloga ovog gena zbog inaktivirajućih mutacija u samom genu ili zbog pojačane ekspresije ciklina D (12).



**Slika 6.** Faze staničnog ciklusa

Preuzeto s: [https://www.researchgate.net/figure/Overview-of-the-cell-cycle-The-cell-cycle-is-divided-in-four-distinct-phases-G1-S\\_fig7\\_276906930](https://www.researchgate.net/figure/Overview-of-the-cell-cycle-The-cell-cycle-is-divided-in-four-distinct-phases-G1-S_fig7_276906930)

Datum preuzimanja: 5.9.2023.

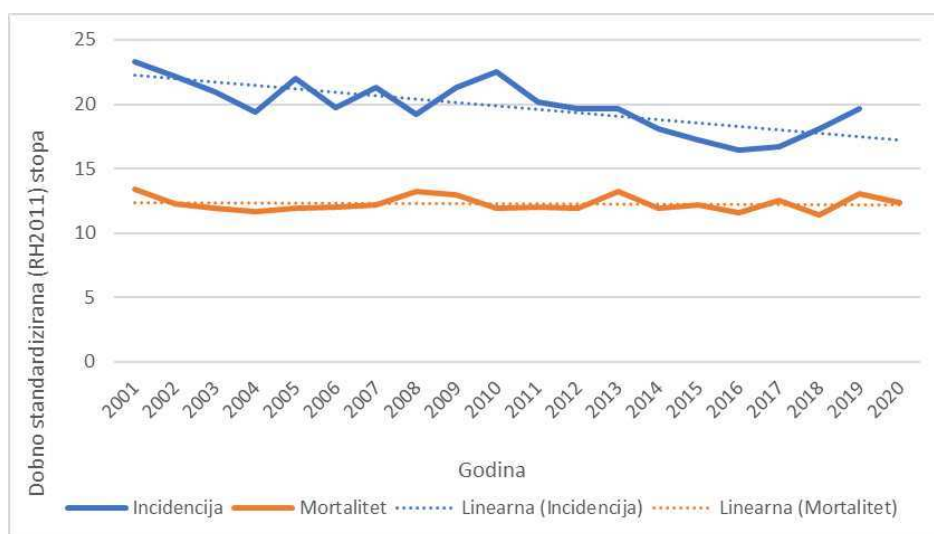
Genomska nestabilnost, nastala kao posljedica poremećaja u mehanizmima koji osiguravaju nisku razinu mutacija u genomu, smatra se bitnim obilježjem raka. Spomenuta nestabilnost povećava vjerojatnost da će se u istoj stanici raka dogoditi više mutacija u ključnim onkogenima i tumorsupresorskim genima potrebnim za nastanak i progresiju raka. Stoga su geni povezani s očuvanjem genomske stabilnosti, povezani s nastankom raka na sličan način kao i tumorsupresorski geni. Kada se dogode inaktivirajuće mutacije obaju alela tih gena nastaju povoljne okolnosti na razvoj raka. Ovi geni nazivaju se još i genima skrbnicima (engl. *caretakers*). U skupinu gena skrbnika ubrajaju se geni BRCA1 i BRCA2 povezani s nasljednim rakom dojke i jajnika. Popravlak oštećene DNK kod raka s mutiranim BRCA1 i BRCA2 genima događa se homolognom rekombinacijom. Blokiranje ovog mehanizma popravka lijekovima kao što su PARP inhibitori (olaparib, rucaparib), dolazi do smrti stanice koja više ne može popraviti oštećenje DNK (12).

## **1.4. RAK JAJNIKA**

### **1.4.1. ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA**

Rak jajnika vodeći je uzrok smrtnosti među ginekološkim tumorima, stoga predstavlja velik javnozdravstveni problem. Rak epitelnih stanica jajnika (karcinom jajnika) najčešći je tip raka koji se pojavljuje u 80% žena. Većinu karcinoma čine serozni cistadenokarcinomi, a manje zastupljeni su endometrioidni, mucinozni, svijetlostanični, nediferencirani te Brennerov karcinom. Preostalih 20% raka jajnika potječu iz zametnih stanica jajnika, stanica strome i spolnih tračaka ili se javljaju kao metastaze u jajniku. Bolest se najčešće dijagnosticira u 6. i 7. desetljeću života. Čimbenici rizika za nastanak raka jajnika dijele se na genetičke i negenetičke. Među genetičkim čimbenicima ističe se obiteljska opterećenost mutacijama gena BRCA1 i BRCA2 koje povezuju karcinom jajnika s karcinomom dojke. S druge strane, u negenetičke čimbenike rizika svrstavaju se nuliparitet, rana menarha, dugotrajno liječenje neplodnosti, kasna menopauza, endometrioza, te loše životne navike (loša prehrana, pušenje, pretilost, izostala tjeleježba) (14).

Prema procjeni Međunarodne agencije za istraživanje raka, od raka jajnika 2020. godine oboljelo je 314 000 žena, a umrlo njih 207 000. U Hrvatskoj od raka jajnika godišnje obolijeva 400-500 žena, a umire njih više od 300. Češće se javlja kod starijih žena, no međutim u preko 35% oboljelih žena karcinom jajnika bio je dijagnosticiran prije 60-te godine života. Prema procjenama Europske komisije za 2020. godinu, po dobno standardiziranoj stopi incidencije raka jajnika, Hrvatska se nalazi na 7. mjestu (20,2/100 000), dok je po mortalitetu na 9. mjestu (12,5/100 000). Raširena primjena oralne kontracepcije, uz smanjenu upotrebu hormonske nadomjesne terapije, dovela je do pada standardizirane stope incidencije raka jajnika u Hrvatskoj i ostalim europskim zemljama. S druge strane, mortalitet od raka jajnika u Hrvatskoj je i dalje stabilan (slika 7.) (15).



**Slika 7.** Trend incidencije i mortaliteta od raka jajnika u Hrvatskoj, 2001.-2020.

Preuzeto s: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/svjetski-dan-borbe-protiv-raka-jajnika-2/>

Datum preuzimanja: 5.9.2023.

#### 1.4.2. KLINIČKA SLIKA

Rak jajnika se u oko 70% oboljelih žena otkriva u FIGO stadiju III i IV (tablica 1.). Razlog ovako kasne dijagnoze jest činjenica da ovu bolest karakteriziraju nespecifični simptomi, koji se pojavljuju relativno kasno. Nespecifični simptomi vezani za gastrointestinalni i urinarni trakt, kao što su povećan opseg trbuha, nelagoda u truhu, pretakanje u crijevima najčešći su simptomi raka jajnika (16). Osim navedenih simptoma često se javljaju i umor, mučnina, proljev, zatvor, bol u zdjelici, rana zasićenost i bol u leđima. Prema nekim istraživanjima prisustvo gastrointestinalnih simptoma (mučnina, proljev, zatvor) bilo je povezano s kasnijim stadijem bolesti i potrebnim dužim vremenom za uspostavljanje dijagnoze kod takvih pacijentica u odnosu na one koje su imale genitalne simptome (abnormalno vaginalno krvarenje, bol genitalnih organa) (17). Za razliku od raka jajnika, kod pacijentica oboljelih od tumora stromalnih stanica dolazi do poremećaja u produkciji spolnih hormona. Kao posljedica navedenog poremećaja javlja se promjena sekundarnih spolnih obilježja, koja olakšava postavljanje dijagnoze. Tumore zametnih stanica karakterizira nagli rast i sklonost torziji infudibulopelvičnog ligamenta, zbog čega se očituju akutnom boli u maloj zdjelici. Iz tog razlog, kod većine pacijentica tumor zametnih stanica dijagnosticiran je u stadiju I (tablica 1.) (16).

#### 1.4.3. DIJAGNOZA

Dijagnoza raka jajnika započinje uzimanjem onkološke anamneze i ginekološkim pregledom. Bimanualna palpacija i ultrazvučni pregled predstavljaju prve korake u postavljanju moguće dijagnoze raka jajnika. Nalazi ultrazvuka koji mogu ukazivati na rak su pronalazak solidnih sastavnica, površinskih izraslina, nepravilnih obrisa i veličine > 6 cm. U postavljanju dijagnoze važnu ulogu ima i određivanje razine tumorskih biljega, uključujući  $\alpha$ -fetoprotein, inhibin B,  $\beta$  podjedinicu humanog korionskog gonadotropina ( $\beta$ -hCG), LDH, androgene, kortizol, a osobito karcinomski antigen 125 (engl. *cancer antigen 125* - CA 125). Ovaj tumorski biljeg je povišen u oko 80% uznapredovalih karcinoma jajnika, no može biti blago povišen i u stanjima kao što su trudnoća, upalna bolest zdjelice, endometrioza, miomi, upale ili primarni rak peritoneuma. Pronalazak cistično-solidne mase u zdjelici postmenopauzalnih žena, uz povišen CA 125 ukazuje na rak jajnika. Za procjenu lokoregionalne proširenosti bolesti, te zahvaćenosti paraaortalnih i zdjelčnih limfnih čvorova ili parenhimalnih organa bolešću prijeko je potreban

pregled abdomena i zdjelice MSCT-om. Rendgenski pregled pluća, nalazi KKS (kompletne krvne slike), DKS (diferencijalne krvne slike), te biokemijske pretrage krvi, neizostavan su dio onkološke obrade. Konačna dijagnoza raka jajnika i stadij bolesti (tablica 1.) postavljaju se histopatološkim pregledom materijala dobivenog u sklopu dijagnostičke laparoskopije ili primarne citoreduktivne operacije (18, 19).

**Tablica 1.** FIGO klasifikacija raka jajnika

| TNM | FIGO |   |
|-----|------|---|
| TX  |      | Prisutnost primarnog tumora se ne može procijeniti  |
| T0  |      | Nema dokaza postojanja primarnog tumora   |
| T1  | I    | Tumor ograničen na jajnike  |
| T1a | IA   | Tumor ograničen na jedan jajnik; bez zloćudnih stanica u ascitesu; bez tumora na vanjskoj površini jajnika; intaktna kapsula jajnika  |
| T1b | IB   | Tumor na oba jajnika; bez zloćudnih stanica u ascitesu; intaktna kapsula jajnika  |
| T1c | IC   | Tumor jajnika stadija IA ili IB ali sa tumorom na površini jednog ili oba jajnika ili puknute kapsule jajnika, ili zloćudnim stanicama u ascitesu ili pozitivnim peritonealnim ispirkom   |
| T2  | II   | Tumor zahvaća jedan ili oba jajnika sa širenjem na tkivo zdjelice   |
| T2a | IIA  | Širenje na i/ili presadnice u maternicu i/ili jajovode  |
| T2b | IIB  | Širenje tumora na drugo zdjelično tkivo   |
| T2c | IIC  | Tumor stadija IIA ili IIB, ali sa tumorom na površini jednog ili oba jajnika i/ili puknutom kapsulom i/ili zloćudnim stanicama u ascitesu i/ili pozitivnim peritonealnim ispirkom   |
| T3  | III  | Tumor ograničen na jedan ili oba jajnika sa histološki potvrđenim peritonealnim implantatima izvan zdjelice i/ili pozitivnim regionalnim limfnim čvorovima. Površinske jetrene presadnice su stadij III. Tumor ograničen na zdjelicu, ali sa histološki potvrđenim širenjem na tanko crijevo ili omentum. |
| T3a | IIIA | Mikroskopske peritonealne presadnice izvan zdjelice   |
| T3b | IIIB | Peritonealni implantati izvan zdjelice veličine do 2 cm u najvećem promjeru   |
| T3c | IIIC | Peritonealne presadnice izvan zdjelice promjera većeg od 2 cm i/ili zahvaćeni regionalni limfni čvorovi   |
| T4  | IV   | Prisustvo udaljenih presadnica (isključujući peritonealne presadnice). Ukoliko postoji pleuralni izljev, mora postojati citološka potvrda zloćudnih stanica da bi se pridijelio stadij IV   |

Preuzeto s:

<https://www.hdgo.hr/userFiles/upload/documents/HDGO%20smjernice/ONK/HDGO-S1-Onkologija-Ovarij.pdf>

Datum preuzimanja: 5.9.2023.

#### 1.4.4. LIJEČENJE

Strategija liječenja raka jajnika ovisi o njegovom patološkom stadiju, te se treba zasnivati na odluci multidisciplinarnog tima. Trenutačne mogućnosti liječenja temelje se na kombinaciji operacije i kemoterapije. Neke od novijih opcija liječenja uključuju primjenu ciljane terapije, imunoterapije i hormonske terapije. Liječenje bolesti koja nije jako uznapredovala (FIGO I, II i početni III) započinje citoreduktivnim kirurškim zahvatom. Svrha ovog zahvata je ukloniti sve vidljive tumorske tvorbe u zdjelici i abdomenu, odnosno postići R0 resekciju (bez ostatnog tumora). Ovakva resekcija osigurava pacijenticama bolje ukupno preživljenje. Nakon citoreduktivnog zahvata, slijedi liječenje kemoterapijom ili kemoimunoterapijom. Kod uznapredovalog stadija bolesti (FIGO III C) uvodi se neoadjuvantna terapija kojom je cilj smanjiti tumorsku masu, te tako omogućiti kvalitetnu citoreduktivnu resekciju. Nakon tog zahvata uvodi se primjena kemoterapije ili kemoimunoterapije. Odabir kemoterapijskog lijeka temelji se na stadiju bolesti, no najčešće su korišteni pripravci na bazi platine (cisplatin, karboplatin) i taksani (paklitaksel, docitaksel). Karboplatin se zbog svoje smanjenje toksičnosti i manje vjerojatnosti pojave nuspojava, te podjednakog terapijskog odgovara, češće koristi od cisplatina. Liječenje se provodi 6-8 ciklusa u trotjednim ili tjednim intervalima. Većina pacijentica odgovori na ovo liječenje, no u oko 80% pacijentica recidiv se događa u naredne dvije godine. Ako do pojave recidiva dođe u intervalu kraćem od 6 mjeseci od posljednjeg ciklusa primjene terapije, govori se o platina rezistentnom recidivu. U tom slučaju kao lijekovi izbora primjenjuju se gemcitabin, doksorubicin i bevacizumab (inhibitor angiogeneze) (20, 21).

Kod većine žena nakon nekog vremena javlja se rezistencija na kemoterapijski lijek. Njihova primjena ujedno je povezana s pojavom nuspojava i lošijom kvalitetom života. Iz navedenih razloga željelo se pokušati provesti liječenje s terapijom koja bi imala manje nuspojava, što je razlog pokušaja liječenja recidivirajućeg epitelnog karcinoma jajnika hormonskom terapijom. Agonist hormona koji stimulira lučenje luteinizirajućeg hormona (LHRH) djeluje na način da inhibira žlijezdu hipofizu, zbog čega se prestaje lučiti luteinizirajući hormon (LH). Kao rezultat ove inhibicije tumorske stanice, koje bi mogle biti ovisne o ovom hormonu, više se ne mogu stimulirati. Međutim, istraživanja su pokazala da upotrebom LHRH agonista nema poboljšanja u preživljenju i preživljenju bez progresije tijekom 6-12 mjeseci liječenja (22).

U liječenju karcinoma jajnika koriste se i PARP inhibitori (olaparib i niraparib). Ovi lijekovi ometaju sposobnost tumorskih stanica da popravljaju oštećenje DNK, stoga su posebno učinkoviti u podskupini tumora s postojećim oštećenjem funkcije DNK. PARP inhibitori inicijalno su korišteni samo kod pacijentica koje su imale karcinom jajnika s BRCA1 ili BRCA2 mutacijom, no od 2018. godine, u nekim kliničkim ispitivanjima korišteni su kao prva linija liječenja kod pacijentica koje su imale odgovor na kemoterapiju temeljenu na pripravcima platine. Primjena ovih lijekova u kombinaciji s kemoterapijom ili bevacizumabom pokazala je poboljšanje kliničkih ishoda liječenja (23).

Noviju mogućnost u terapiji karcinoma jajnika predstavlja primjena imunoterapije, točnije inhibitora imunoloških kontrolnih točaka. Ovi inhibitori djeluju mehanizmom povratne sprege, modulirajući odgovore efektornih stanica kako bi zaštitili domaćina od autoimunosti, te održali samotoleranciju. Imaju važnu ulogu u tumorigenezi, budući da su glavni mehanizam imunološke otpornosti tumorskih stanica. Najčešće su korišteni inhibitori točaka CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*) i PD-1 (engl. *programmed cell death protein 1*). Bez obzira na važnost inhibitornih točaka u patogenezi tumora, klinička primjena imunoterapije u liječenju raka jajnika još uvijek nije provedena, uglavnom zbog nedovoljno eksperimentalnih dokaza njihove učinkovitosti. Bolje razumijevanje ključnih bioloških mehanizama, zajedno s budućim tehnološkim razvojem, najvjerojatnije će biti ključno za proširenje upotrebe imunoloških terapeutika (24).

## **1.5. GLJIVA *CANTHARELLUS CIBARIUS***

*Cantharellus cibarius*, lisičarka ili bjelkasta lisičica vrsta je jestive gljive iz porodice *Cantharellaceae*. Karakterizira ju čvrst i gladak klobuk, blijedožute do narančaste boje, promjera do 12 centimetara, rijetki rebrasti listići koji se spuštaju niz stručak, te kratak, nepravilan, mesnat stručak boje klobuka (slika 8.). Rasprostranjena je u Europi, Sjevernoj i Srednjoj Americi, Aziji te nekim dijelovima Afrike. Staništa su joj bjelogorične, crnogorične i mješovite šume. Najčešće raste u skupinama i može se pronaći u planinskim područjima. Sezona sakupljanja joj je od lipnja do studenog. Kvalitetna je gljiva koja je u upotrebi od davnih vremena. Zbog tvrdog mesa, obično se priprema kuhanjem, no može se kiseliti i sušiti (25).



Gljiva *Cantharellus cibarius* bogata je ugljikohidratima (polisaharidima, glukanima, mananima i galaktanima), aminokiselinama (posebice treoninom i lizinom), polinezasićenim masnim kiselinama, sekundarnim metabolitima (fenolima, vitaminima, terpenoidima i indolima) te mikronutrijentima (bakrom, cinkom, selenom i željezom) (26). Zbog povoljnog nutritivnog sastava, ima brojne zdravstvene pogodnosti. Bogata je antioksidansima, stoga neutralizirajući slobodne radikale, sprječava nastanak upale i kroničnih bolesti. Brojni biološki aktivni spojevi, među kojima se ističu polinezasićene masne kiseline, vitamin D, fenoli i cink, odgovorni su za protuupalna svojstva gljive *Cantharellus cibarius*. Visok sadržaj vitamina D ima ulogu u apsorpciji kalcija i mineralizaciji kostiju što je važno za održavanje zdravlja kostiju. Gljiva *Cantharellus cibarius* bogata je i polisaharidima hitinom i hitozanom, komponentama koje štite stanice od oštećenja i potiču imunološke stanice na proizvodnju novih stanica (27, 28). Istraživanja su pokazala da polisaharidi izolirani iz gljive inhibiraju enzime COX-1 i COX-2, odgovorne za razvoj upale, što pridonosi snažnom protuupalnom učinku. Pokazalo se da imaju i prebiotički potencijal, potiču rast bakterija *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus rhamnosus* snažnije od dosad poznatih prebiotika, inulina i fruktooligosaharida (FOS). Osim već nabrojenih učinaka, polisaharidi također imaju i snažan antiproliferativni učinak na stanice karcinoma kolona, pri čemu ne oštećuju ostale normalne stanice (29).



**Slika 8.** Gljiva *Cantharellus cibarius*

Preuzeo s: <https://www.wildfooduk.com/mushroom-guide/chanterelle/>

Datum preuzimanja: 6.9.2023.

## 1.6. FENOLNI SPOJEVI IZOLIRANI IZ GLJIVE *CANTHARELLUS CIBARIUS*

Fenolni spojevi sekundarni su metaboliti nastali kao produkti šikiminskog, pentoza-fosfatnog i fenilpropanoidnog metaboličkog puta. Građeni su od aromatskog prstena i jedne ili više hidroksilnih skupina. Ovisno o strukturi razlikuje se nekoliko vrsta spojeva, među kojima su jednostavni flavonoidi, fenolne kiseline, složeni flavonoidi i obojeni antocijani. Fenolni spojevi obično su povezani s obrambenim reakcijama u biljkama. Međutim, igraju važnu ulogu i u drugim procesima, kao što su privlačenje kukaca za oprašivanje, bojenje za kamuflažu i obranu od biljojeda, a posjeduju i antibakterijsko i antifungalno djelovanje. Brojna istraživanja pokazala su povoljne terapijske učinke fenolnih spojeva, kao što su učinak usporavanja starenja, protuupalno, antiproliferativno i antioksidativno djelovanje (30). Zbog mogućnosti inhibicije različitih enzima koriste se za liječenje raznih uobičajenih ljudskih bolesti, uključujući hipertenziju, metaboličke probleme, infekcije i neurodegenerativne bolesti. Inhibicija angiotenzin-konvertirajućeg enzima fenolnim spojevima koristi se za liječenje hipertenzije. Inhibicija enzima za hidrolizu ugljikohidrata predstavlja terapiju dijabetesa melitusa tipa 2, a inhibicija kolinesteraze primijenjuje se u liječenju Alzheimerove bolesti. Polifenoli se koriste i za prevenciju i liječenje alergijskih bolesti (31). Osim povoljnog terapijskog učinka, fenoli su pokazali i potencijal korištenja u biomedicinskoj nanotehnologiji, naročito u izgradnji višenamjenskih nanosustava (nanočestice jezgra-ljuska, mezoporozne nanočestice, Janus nanočestice), no potrebna su daljna istraživanja (32). Iz gljive *Cantharellus cibarius*, koja je tema ovog istraživanja, izolirane su fenolne kiseline: galna, protokatehuinska, p-hidroksibenzojeva, kofeinska i ferulinska kiselina. Također je izoliran i flavonoid miricetin.

### 1.6.1. GALNA KISELINA

Galna kiselina (GA), također poznata kao 3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina, prirodni je sekundarni metabolit, izoliran iz gljive *Cantharellus cibarius* i velikog broja drugih biljaka i orašastih plodova. Galna kiselina poznata je po svom protuupalnom učinku koji se zasniva na djelovanju galne kiseline na MAPK i NF- $\kappa$ B signalne puteve. Time ublažava upalni odgovor smanjujući otpuštanje upalnih citokina, kemokina, adhezijskih molekula, te smanjujući staničnu infiltraciju. Zbog svog farmakološkog djelovanja, galna kiselina potencijalni je kandidat za

liječenje raznih bolesti povezanih s upalama (33). Osim protuupalnog djelovanja, galna kiselina ima i snažno antitumorsko djelovanje koje se zasniva na ispravljanju epigenetskih promjena koje dovode do aktivacije onkogenih i inaktivacije tumorsupresorskih gena (34).

#### 1.6.2. PROTOKATEHUINSKA KISELINA

Protokatehuinska kiselina, poznata kao 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, sekundarni je metabolit brojnih biljaka. Karakterizira ju antioksidativno, protuupalno i antitumorsko djelovanje zbog čega se koristi za zaštitu od mnogih kroničnih poremećaja kao što su neurodegenerativne bolesti, dijabetes, kardiovaskularne bolesti i rak. Štiti stanice od oksidativnog stresa regulacijom endotelih antioksidansa i čišćenjem slobodnih radikala. Antitumorsko djelovanje protokatehuinske kiseline povezano je s antioksidativnom aktivnošću. Osim toga, izravno blokira specifična mjesta vezanja krajnjih karcinogenih molekula DNK, čime se sprječava nastanak mutacija i neoplastične transformacije. Također, utječe i na aktivnost inducibilnog izoenzima ciklooksigenaze i sintaze dušikovog oksida, proteina koji reguliraju stanični ciklus i upalne citokine koji su uključeni u onkogenezu (35, 36).

#### 1.6.3. P-HIDROKSIBENZOJEVA KISELINA

P-hidroksibenzojeva kiselina (PHBA) fenolna je kiselina, čiji se derivati mogu pronaći prirodno u velikom broju biljaka, kao i kemijski sintetizirani. Posjeduje niz bioloških aktivnosti kao što su antimikrobna, antihiperlipidemična, antiaterogena, protuupalna te antioksidativna aktivnost. Osim toga, esteri PHBA (također poznati kao parabeni) široko se koriste kao konzervansi u hrani, kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima. Unatoč velikom broju povoljnih bioloških aktivnosti, broj studija koje se bave istraživanjem potencijalnog farmakološkog djelovanja p-hidroksibenzojeve kiseline vrlo je ograničen (37).

#### 1.6.4. KOFEINSKA KISELINA

Kofeinska kiselina pripada spojevima polifenola koje svakodnevno konzumiramo, često u obliku kave. Kofeinska kiselina ima učinke na bolesti poput raka, dijabetesa, ateroskleroze, Alzheimerove bolesti ili bakterijske i virusne infekcije. Posebno se ističe njena antioksidativna aktivnost koja je odgovorna za povoljne učinke na ljudsko zdravlje. Kofeinska kiselina zbog svoje strukture, čija je osnova zajednička svim fenolnim spojevima, osigurava delokalizaciju nesparenih elektrona te služi kao primarni antioksidans. Također inhibira enzim 5-lipoksigenazu i na taj način sprječava nastanak reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species* - ROS). Opisano je i antiproliferativno djelovanje kofeinske kiseline na različite vrste stanica raka. Kofeinska kiselina može se koristiti sama ili u kombinaciji s antitumorskim lijekovima, na taj način postiže se smanjenje doze primjenjenog lijeka i sprječava razvoj terapijske rezistencije (38).

#### 1.6.5. FERULINSKA KISELINA

Ferulinska kiselina, kao i prethodno spomenute kiseline, fenolni je spoj niske toksičnosti koji ima mnoge fiziološke funkcije (protuupalno, antioksidativno, antimikrobno, antikancerogeno i antidijabetičko djelovanje). Široko je primjenjivana u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Djeluje kao hvatač slobodnih radikala, ali i inhibitor enzima koji kataliziraju stvaranje slobodnih radikala i pojačivač aktivnosti enzima hvatača. Brojne studije izvještavaju o antineoplastičnoj ulozi ferulinske kiseline u različitim stanicama raka, uključujući rak mozga, rak dojke, rak želuca, rak prostate, rak vrata maternice i rak debelog crijeva. Utvrđeno je da ova bioaktivna prirodna tvar može imati učinke na inhibiciju rasta tumora, indukciju apoptoze, supresiju angiogeneze i pojave metastaza, te se pokazuje kao jedna od alternativa koja najviše obećava trenutnim kemoterapijskim metodama liječenja za povećanje terapijske moći i smanjenje sistemske toksičnosti (39, 40).

#### 1.6.6. MIRICETIN

Miricetin je flavonoid sa snažnim antioksidativnim, antitumorskim, antidijabetičkim i protuupalnim djelovanjem. Posjeduje aktivnosti povezane sa središnjim živčanim sustavom zbog čega su provedena mnoga istraživanja o potencijalnom korištenju miricetina u prevenciji Parkinsonove i Alzheimerove bolesti. U slučaju disfunkcije miokarda, dokazano je da miricetin suzbija upalne citokine i smanjuje stopu smrtnosti. Također je utvrđeno da miricetin smanjuje agregaciju trombocita i kontrolira virusne infekcije djelujući na puteve replikacije DNK (41). Zbog sposobnosti sprječavanja oksidacije lipida, miricetin se često koristi kao konzervans hrane koja sadrži ulja i masne kiseline (42). Tavsan i Kayali istraživali su antitumorsko djelovanje miricetina na stanicama karcinoma jajnika stanične linije OVCAR-3. Istraživanje je pokazalo da miricetin suzbija rast stanica raka jajnika, inducira apoptozu, zaustavlja stanični ciklus i također ima potencijal inhibirati invaziju stanica. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako miricetin pokazuje potencijal primjene u terapiji karcinoma jajnika (43).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

## **2.1. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog istraživanja je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje vodenih ekstrakata gljive *Cantharellus cibarius* dobivenih pri 25°C i 70°C na staničnoj liniji humanog karcinoma jajnika.

## **2.2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA**

Hipoteza o potencijalnom citotoksičnom djelovanju ispitivana je na stanicama humanog karcinoma jajnika OVCAR-3.

1. Ekstrakti gljive *Cantharellus cibarius* dovest će do smanjenja broja stanica karcinoma jajnika stanične linije OVCAR-3.
2. Ekstrakti gljive *Cantharellus cibarius* doseći će IC<sub>50</sub> vrijednost.

### **3. MATERIJALI I METODE**



### 3.1. STANIČNA LINIJA OVCAR-3

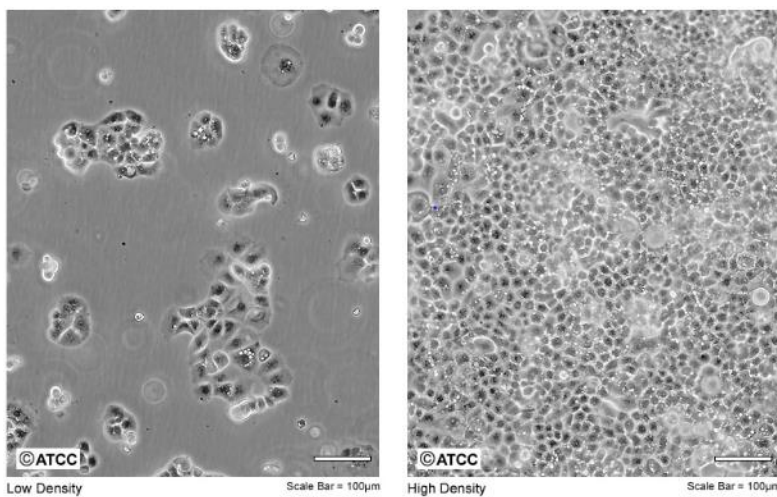
Potencijalno citotoksično djelovanje vodenih ekstrakata gljive *Cantharellus cibarius* ispitivano je na staničnoj liniji karcinoma jajnika OVCAR-3. Osnovne karakteristike stanične linije prikazane su u tablici 2.

**Tablica 2.** Karakteristike stanične linije OVCAR-3

|                             |                              |
|-----------------------------|------------------------------|
| <b>Kategorija proizvoda</b> | humane stanice               |
| <b>Organizam</b>            | <i>Homo sapiens</i> , čovjek |
| <b>Morfologija</b>          | epitelna                     |
| <b>Tkivo</b>                | jajnik                       |
| <b>Bolest</b>               | adenokarcinom                |
| <b>Oblik proizvoda</b>      | smrznuto                     |
| <b>Uvjeti čuvanja</b>       | parna faza tekućeg dušika    |

Preuzeto i prilagođeno s : <https://www.atcc.org/products/htb-161>

Datum preuzimanja: 7.9.2023.



**Slika 9.** Stanice stanične linije OVCAR-3

Preuzeto s : <https://www.atcc.org/products/htb-161>

Datum preuzimanja: 7.9.2023.

### 3.2. PRIPREMA VODENIH EKSTRAKATA GLJIVE *CANTHARELLUS CIBARIUS*

Prašasti ekstrakt gljive *Cantharellus cibarius* nabavljen je od lokalnog dobavljača (Mush-roomcups, Solin, Hrvatska). Ekstrakt gljive otopljen je u deioniziranoj vodi (1 mg/mL) na temperaturama od 25°C i 70°C kako bi se simulirano prosječan hladni i topli napitak (za slučaj da je gljiva u prahu dodana u sok ili kavu). Nakon 1 minute miješanja, vodena ekstrakcija je temperirana na sobnoj temperaturi. Zatim su alikvoti od ekstrakta centrifugirani 2 minute na 1000 okretaja u minuti (Eppendorf centrifuga 5702, Hamburg, Njemačka). Nakon provedenog centrifugiranja, vodeni ekstrakti pohranjeni su na temperaturi od 4°C do analize.

### 3.3. POSTUPAK

Rad sa stanicama provodio se u kabinetu za sterilan rad s laminarnim protok zraka, kako bi se minimizirao rizik kontaminacije stanične kulture. Nakon odmrzavanja stanica, stanice karcinoma jajnika OVCAR-3, uzgajane su u DMEM mediju (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) uz dodatak 20% fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum* - FBS), antibiotika penicilina i streptomcina, te 0,01 mg/mL inzulina. Uzgoj stanica provodio se u CO<sub>2</sub> inkubatoru za uzgoj stanica pri 37°C uz 5% CO<sub>2</sub> i visoku vlažnost zraka (slika 10.). Stanice su inkubirane nekoliko dana kako bi se postiglo njihovo umnažanje. Nakon predviđenog vremena inkubacije, stanice su izvađene iz inkubatora. Budući da su stanice adherirane za dno Petrijeve zdjelice u kojoj su uzgajane, uz pomoć vakuuma odsisan je DMEM hranjivi medij. Stanice su zatim isprane PBS-om (fosfatnim puferom) kako bi se uklonio zaostali medij. Potom je dodan tripsin, proteolitički enzim, koji kidanjem peptidnih veza omogućava odvajanje stanica od podloge. Stanice su s dodanim tripsinom inkubirane u CO<sub>2</sub> inkubatoru (37°C uz 5% CO<sub>2</sub>) nekoliko minuta. Inkubacija ne smije biti prekratka, u tom slučaju neće doći do odvajanja stanica od podloge, a ni preduga jer u tom slučaju može doći do uništenja stanica djelovanjem tripsina. Nakon provedene inkubacije stanice su resuspendirane dodatkom svježeg hranjivog medija.

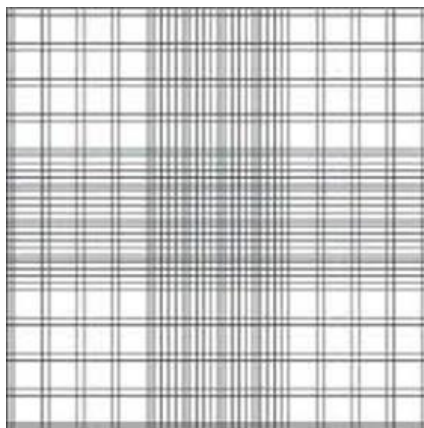


**Slika 10.** CO<sub>2</sub> inkubator

Preuzeto s : <https://www.medicalexpo.com/prod/nueve/product-69565-608309.html>

Datum preuzimanja: 7.9.2023.

Brojanje stanica provedeno je na način da se 10  $\mu$ L stanica pomiješalo s 90  $\mu$ L Trypan Blue boje. Provedeno je brojanje samo živih, nebojenih stanica. Stanice pomiješane s Trypan Blue bojom nanijete su na Bürker - Türkovu komoricu (slika 11.), a brojanje je provedeno pod mikroskopom u 5 kvadratića navedene komorice. Ukupan broj stanica izračunat je po formuli:  $N \times 10 \times 10^4$  stanica/mL (N = broj živih stanica u kvadratićima u kojima je provedeno brojanje, 10 = faktor razrijeđenja,  $10^4$  = volumen komorice). Nakon provedenog brojanja, na 3 mikrotitarske pločice s po 96 jažica, presađen je jednak broj stanica u njihovom hranjivom mediju (volumen u svakoj jažici bio je 100  $\mu$ L), te su ostavljene u CO<sub>2</sub> inkubatoru preko noći kako bi se prihvatile za podlogu.



**Slika 11.** Bürker - Türkova komorica

Preuzeto s: <https://www.scienceabc.com/pure-sciences/what-is-a-hemocytometer-calculation-counting-how-to-use.html>

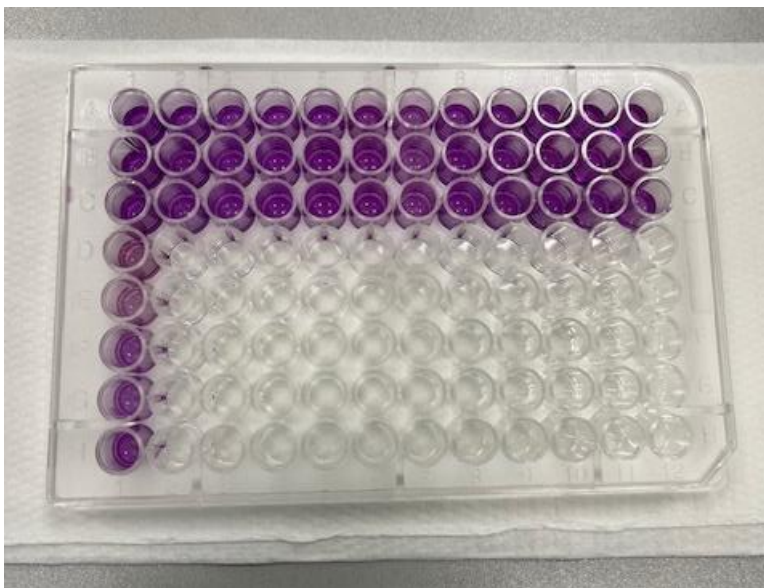
Datum preuzimanja: 7.9.2023.

Idućeg dana stanice karcinoma jajnika stanične linije OVCAR-3, tretirane su različitim koncentracijama vodenih ekstrakata gljive *Cantharellus cibarius* dobivenih pri 25°C i 70°C. To je učinjeno na način da je adheriranim stanicama odsisan hranjivi medij, a zatim dodan medij pomiješan s ekstraktima gljive u ispitivanim koncentracijama 1 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL (ukupan volumen u svakoj jažici bio je 100 µL). U jažice koje predstavljaju kontrolnu skupinu dodan je samo hranjivi medij. Mikrotitarske pločice ostavljene su u inkubatoru 24, 48 i 72 sata.

### **3.4. TEST CITOTOKSIČNOSTI - MTT TEST**

MTT test koristi se za određivanje stanične vijabilnosti i proliferacije na osnovu mjerenja metaboličke aktivnosti stanica. Reakcija se zasniva na redukciji žutog tetrazolina MTT-(3-(4,5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) u netopljivi formazan koji je ljubičaste boje. Redukcija se odvija uz pomoć NADPH i enzima mitohondrijske reduktaze u mitohondrijima živih stanica, dok mrtve stanice nemaju sposobnost vezanja MTT-a, pa ne dovode do nastanka

ljubičastog formazana. Ta činjenica omogućava određivanje postotka metabolički aktivnih stanica preostalih nakon tretiranja stanica vodenim ekstraktima gljive *Cantharellus cibarius* dobivenim pri 25°C i 70°C. Intenzivnija ljubičasta boja predstavlja veće preživljenje stanica (slika 12.).



**Slika 12.** Ljubičasto obojenje nakon dodatka otopine DMSO-a na mikrotitarskoj pločici sa staničnom linijom OVCAR-3

Test se proveo na način da je iz inkubatora izvađena jedna mikrotitarska pločica koja je analizirana nakon 24 sata te joj je dodana otopina MTT-a. Zatim su stanice s otopinom MTT-a inkubirane 2 sata pri temperaturi od 37°C. Budući da je formazan netopljiv spoj, kako bi se mogla očitati apsorbancija potrebno ga je otopiti dodatkom DMSO-a (dimetil sulfoksida). Mikrotitarska pločica inkubirana je 10 minuta pri temperaturi od 37°C uz treskanje. Zatim je provedeno mjerenje apsorbancije pri 570 nm korištenjem čitača mikrotitarskih pločica. Opisani postupak proveo se s po jednom mikrotitarskom pločicom nakon 48 sati, a potom i nakon 72 sata.

Citotoksično djelovanje vodenih ekstrakata gljive određeno je omjerom apsorbancije stanica tretiranih uzorcima ekstrakata i apsorbancije stanica koje su predstavljale kontrolnu skupinu (dodan im je samo hranjivi medij).

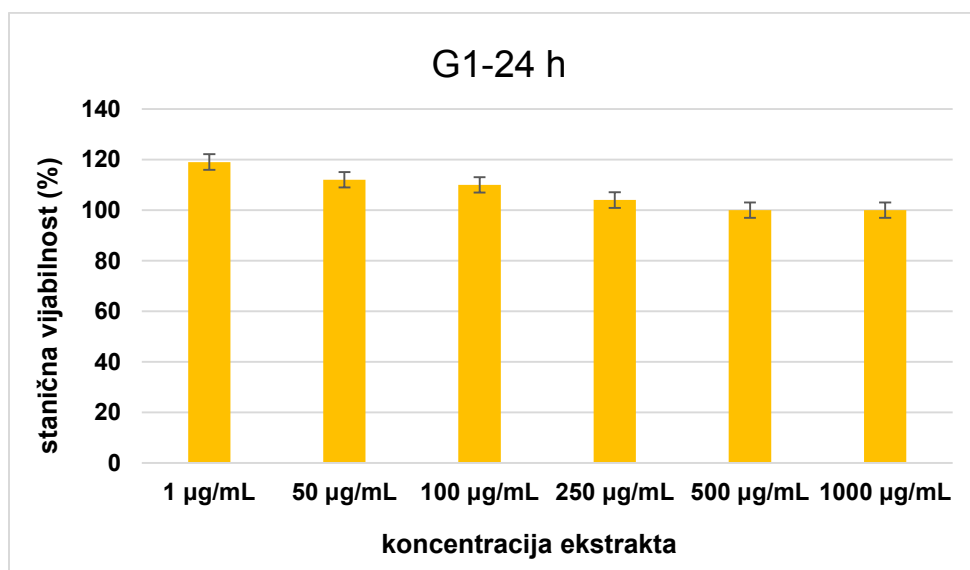
### 3.5. STATISTIČKA ANALIZA

Nakon što su izmjerene apsorbancije stanica tretiranih ispitivanim uzorcima vodenih ekstrakata gljive *Cantharellus cibarius* dobivenih pri 25°C i 70°C (ispitivana skupina), te stanica koje su se nalazile samo u hranjivom mediju (kontrolna skupina), obrađeni su rezultati. Uz pomoć programa Microsoft Excel 2016 izračunata je srednja vrijednost apsorbancije ispitivane i kontrolne skupina nakon 24, 48 i 72 sata, a zatim i vrijednost omjera srednje vrijednosti apsorbancije ispitivane i kontrolne skupine za svaku koncentraciju korištenih ekstrakata gljive *Cantharellus cibarius* nakon 24, 48 i 72 sata. Rezultati su prikazani grafički i statistički obrađeni u programu Past 4.03, korištenjem ANOVA testa uz statističku značajnost  $P < 0,05$ .

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. STANIČNA LINIJA OVCAR-3 - REZULTATI NAKON 24 h

##### 4.1.1. VODENI EKSTRAKT GLJIVE *CANTHARELLUS CIBARIUS* DOBIVEN PRI 25°C



**Slika 13.** Citotoksično djelovanje ekstrakta gljive *Cantharellus cibarius* na stanice karcinoma jajnika OVCAR-3 nakon 24 h (G1-vodeni ekstrakt gljive *Cantharellus cibarius* dobiven pri 25°C)

**Tablica 3.** Statistička značajnost dobivenih rezultata za ekstrakt gljive *Cantharellus cibarius* dobiven pri 25°C nakon 24 h inkubacije

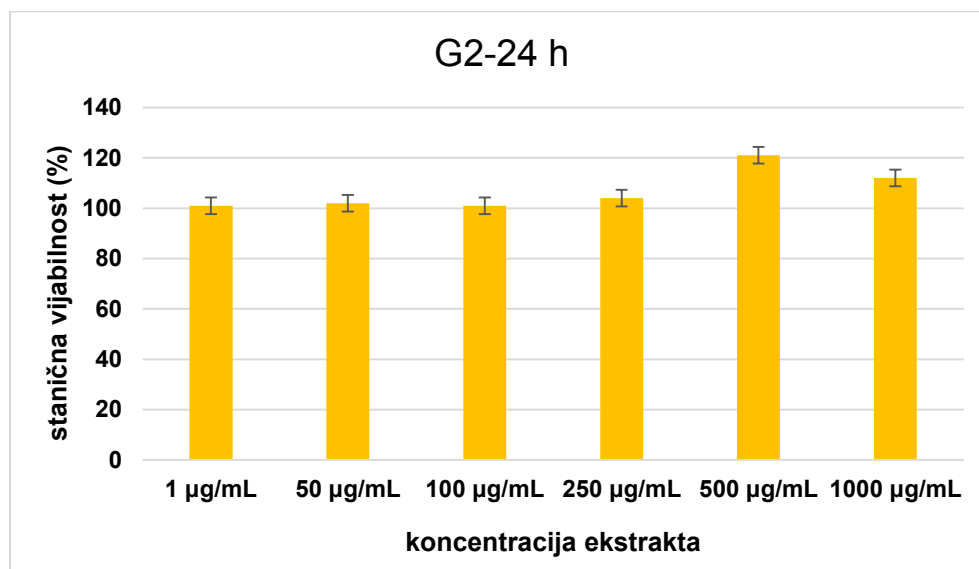
| Koncentracija (µg/mL) | 1     | 50    | 100   | 250   | 500   | 1000  |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>P</i> *            | 0,214 | 0,362 | 0,495 | 0,701 | 0,932 | 0,924 |

\* Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA)

Nakon 24 sata inkubacije, vodeni ekstrakt gljive *Cantharellus cibarius* dobiven pri 25°C ne pokazuje statistički značajno citotoksično djelovanje na stanice karcinoma jajnika stanične linije OVCAR-3 (slika 13.). Vidljiv je blagi porast stanične vijabilnosti.



#### 4.1.2. VODENI EKSTRAKT GLJIVE *CANTHARELLUS CIBARIUS* DOBIVEN PRI 70°C



**Slika 14.** Citotoksično djelovanje ekstrakta gljive *Cantharellus cibarius* na stanice karcinoma jajnika OVCAR-3 nakon 24 h (G2- vodeni ekstrakt gljive *Cantharellus cibarius* dobiven pri 70°C)

**Tablica 4.** Statistička značajnost dobivenih rezultata za ekstrakt gljive *Cantharellus cibarius* dobiven pri 70°C nakon 24 h inkubacije

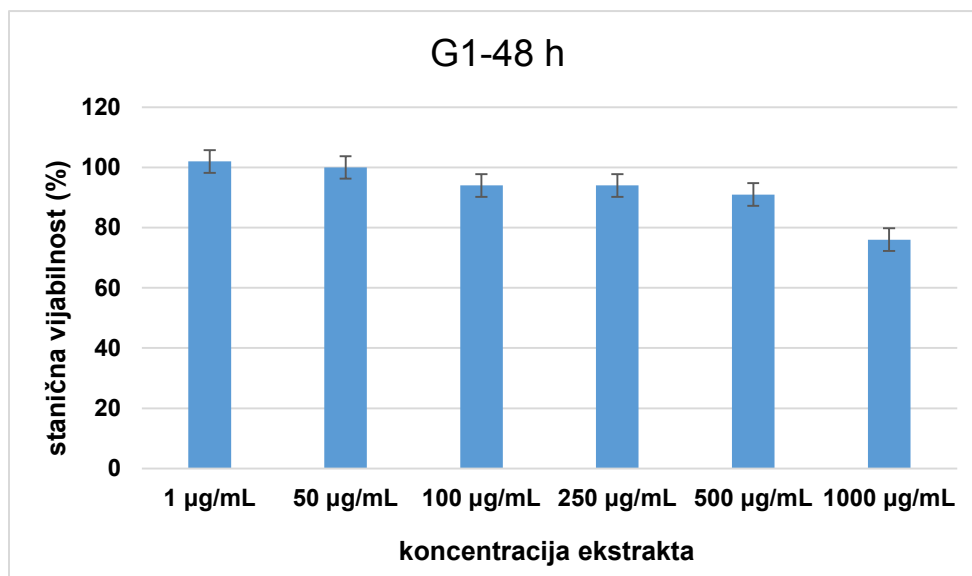
| Koncentracija (µg/mL) | 1     | 50    | 100   | 250   | 500  | 1000  |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| <i>P</i> *            | 0,910 | 0,792 | 0,872 | 0,701 | 0,05 | 0,346 |

\* Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA)

Nakon 24 sata tretiranja stanica karcinoma jajnika OVCAR-3 vodenim ekstraktom gljive *Cantharellus cibarius* dobivenim pri 70°C, nije došlo do značajnijeg smanjenja njihove stanične vijabilnosti. Naprotiv, na slici 14. vidljiv je blagi porast stanične vijabilnosti.

## 4.2. STANIČNA LINIJA OVCAR-3 - REZULTATI NAKON 48 h

### 4.2.1. VODENI EKSTRAKT GLJIVE *CANTHARELLUS CIBARIUS* DOBIVEN PRI 25°C



**Slika 15.** Citotoksično djelovanje ekstrakta gljive *Cantharellus cibarius* na stanice karcinoma jajnika OVCAR-3 nakon 48 h (G1- vodeni ekstrakt gljive *Cantharellus cibarius* dobiven pri 25°C)

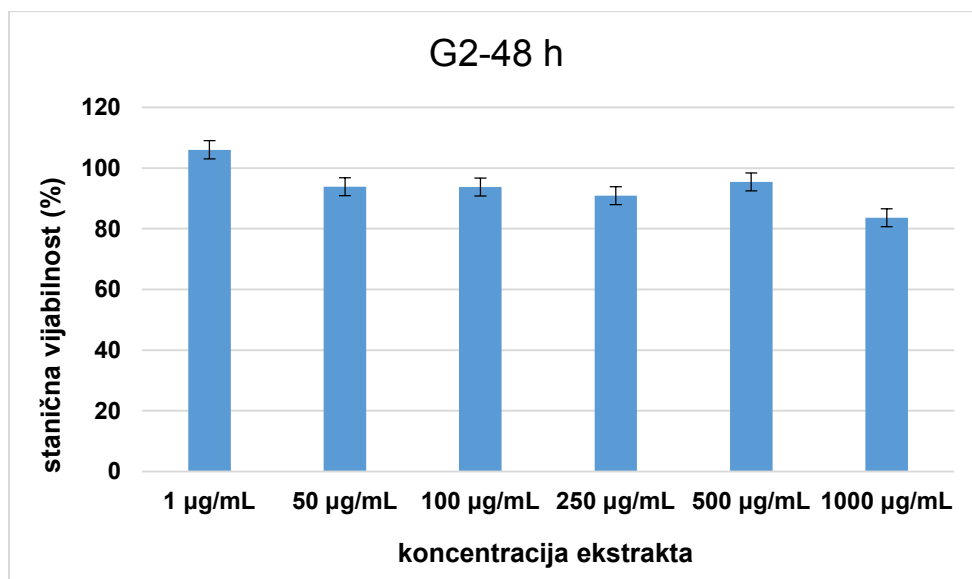
**Tablica 5.** Statistička značajnost dobivenih rezultata za ekstrakt gljive *Cantharellus cibarius* dobiven pri 25°C nakon 48 h inkubacije

| Koncentracija (µg/mL) | 1     | 50    | 100   | 250   | 500   | 1000  |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>P</i> *            | 0,485 | 0,585 | 0,985 | 0,761 | 0,549 | 0,088 |

\* Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA)

Nakon 48 sati izlaganja stanica karcinoma jajnika OVCAR-3 vodenom ekstraktu gljive *Cantharellus cibarius* dobivenom pri 25°C, najbolji rezultat ostvaren je pri koncentraciji od 1000 µg/mL, gdje se stanična vijabilnost smanjila na 76%. IC<sub>50</sub> vrijednost nije dosegnuta (slika 15.).

#### 4.2.2. VODENI EKSTRAKT GLJIVE *CANTHARELLUS CIBARIUS* DOBIVEN PRI 70°C



**Slika 16.** Citotoksično djelovanje ekstrakta gljive *Cantharellus cibarius* na stanice karcinoma jajnika OVCAR-3 nakon 48 h (G2-vodeni ekstrakt gljive *Cantharellus cibarius* dobiven pri 70°C)

**Tablica 6.** Statistička značajnost dobivenih rezultata za ekstrakt gljive *Cantharellus cibarius* dobiven pri 70°C nakon 48 h inkubacije

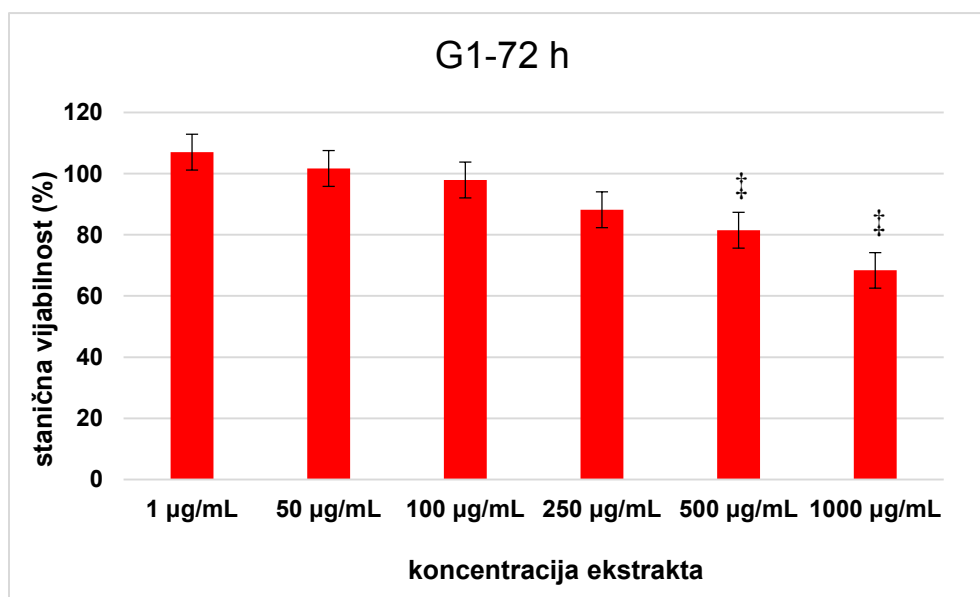
| Koncentracija (µg/mL) | 1     | 50    | 100   | 250  | 500   | 1000  |
|-----------------------|-------|-------|-------|------|-------|-------|
| <i>P</i> *            | 0,175 | 0,969 | 0,969 | 0,71 | 0,882 | 0,214 |

\* Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA)

Nakon 48 sati inkubacije, vodeni ekstrakt gljive *Cantharellus cibarius* dobiven pri 70°C ne pokazuje značajno smanjene stanične vijabilnosti stanica karcinoma jajnika OVCAR-3 (tablica 6.). Najbolji rezultat, kao i kod ekstrakta dobivenog pri 25°C, ostvaren je pri koncentraciji od 1000 µg/mL i iznosi 83,5%. IC<sub>50</sub> vrijednost nije postignuta (slika 16.).

### 4.3. STANIČNA LINIJA OVCAR-3 - REZULTATI NAKON 72 h

#### 4.3.1. VODENI EKSTRAKT GLJIVE *CANTHARELLUS CIBARIUS* DOBIVEN PRI 25°C



**Slika 17.** Citotoksično djelovanje ekstrakta gljive *Cantharellus cibarius* na stanice karcinoma jajnika OVCAR-3 nakon 72 h (G1- vodeni ekstrakt gljive *Cantharellus cibarius* dobiven pri 25°C, ‡-  $P$  vrijednost < 0,05)

**Tablica 7.** Statistička značajnost dobivenih rezultata za ekstrakt gljive *Cantharellus cibarius* dobiven pri 25°C nakon 72 h inkubacije

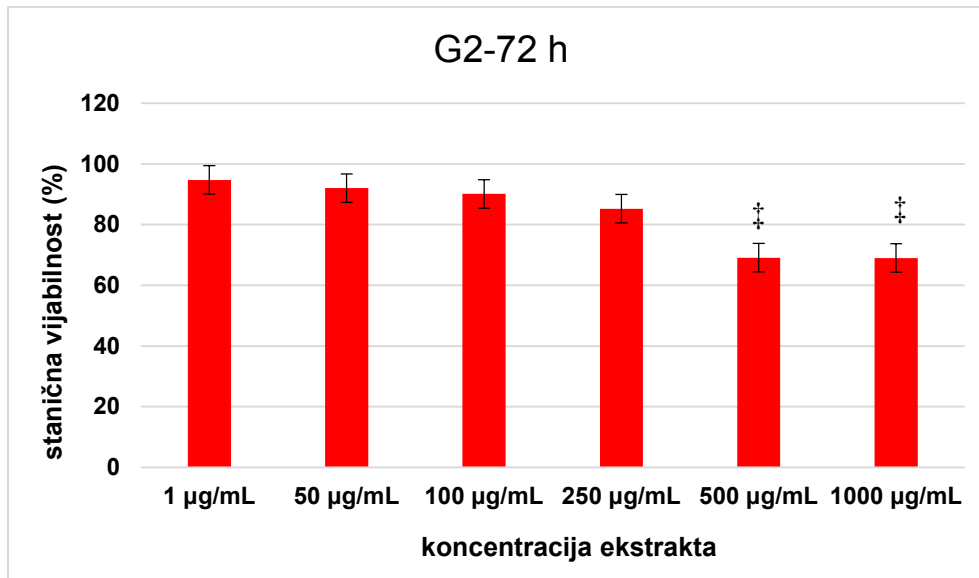
| Koncentracija (µg/mL) | 1     | 50    | 100   | 250   | 500    | 1000   |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| $P^*$                 | 0,538 | 0,903 | 0,853 | 0,205 | 0,036‡ | 0,005‡ |

\* Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA)

‡  $P$  vrijednost < 0,05

Nakon 72 sata tretiranja stanica karcinoma jajnika stanične linije OVCAR-3 vodenim ekstraktom gljive *Cantharellus cibarius* dobivenim pri 25°C, postignuto je smanjene broja preživjelih stanica. Statistički značajno smanjenje postignuto je pri koncentraciji od 500 µg/mL ( $P = 0,036$ ) gdje postotak preživjelih stanica iznosi 81,5%, te pri koncentraciji od 1000 µg/mL ( $P = 0,005$ ) gdje je preživljenje 68%.  $IC_{50}$  vrijednost nije moguće odrediti (slika 17.).

#### 4.3.2. VODENI EKSTRAKT GLJIVE *CANTHARELLUS CIBARIUS* DOBIVEN PRI 70°C



**Slika 18.** Citotoksično djelovanje ekstrakta gljive *Cantharellus cibarius* na stanice karcinoma jajnika OVCAR-3 nakon 72 h (G2-vodeni ekstrakt gljive *Cantharellus cibarius* dobiven pri 70°C, ‡-  $P$  vrijednost < 0,05)

**Tablica 8.** Statistička značajnost dobivenih rezultata za ekstrakt gljive *Cantharellus cibarius* dobiven pri 70°C nakon 72 h inkubacije

| Koncentracija (µg/mL) | 1     | 50    | 100   | 250   | 500                | 1000               |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|--------------------|--------------------|
| $P^*$                 | 0,417 | 0,289 | 0,186 | 0,073 | 0,011 <sup>‡</sup> | 0,006 <sup>‡</sup> |

\* Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA)

<sup>‡</sup>  $P$  vrijednost < 0,05

Nakon 72 sata inkubacije, postignuti su statistički značajni rezultati tretiranjem karcinomskih stanica OVCAR-3 vodenim ekstraktom gljive dobivenim pri 70°C. Kao i kod ekstrakta dobivenog pri 25°C, ti su rezultati ostvareni pri najvećim koncentracijama od 500 µg/mL ( $P = 0,011$ ) i 1000 µg/mL ( $P = 0,006$ ). Postotak preživjelih stanica pri objema koncentracijama iznosi 69%.  $IC_{50}$  vrijednost nije postignuta (slika 18.).

## **5. RASPRAVA**

Rak je drugi vodeći uzrok smrti u svijetu iza bolesti srca i krvnih žila, zbog čega predstavlja velik javnozdravstveni problem. Nastaje trajno poremećenom proliferacijom abnormalnih stanica do koje dolazi zbog poremećaja u regulaciji mehanizama koji sudjeluju u proliferaciji, diferencijaciji i preživljenju normalnih stanica (1, 3). Ulogu u razvoju raka imaju faktori okoliša i individualna (genetska) predispozicija bolesnika. Neravnoteža između navedenih čimbenika dovodi do pojave genetskih promjena koje uzrokuju nekontroliran i neusklađen rast stanica s tim promjenama. Među najčešće uzročnike pojave raka kod ljudi ubrajaju se Sunčevo ultraljubičasto zračenje, kemikalije iz duhanskog dima, te aflatoksin. Uzročnici raka mogu biti i virusi i bakterije. Najčešće vrste raka uzrokovane virusima su rak jetre i rak grlića maternice, one zajedno čine 10-20% svih dijagnosticiranih slučajeva raka u svijetu (7).

Prema podacima GLOBOCAN-a za 2020. godinu, procjenjuje se da je incidencija raka u svijetu iznosila 19,3 milijuna slučajeva, dok je zabilježeno 10 milijuna smrtnih slučajeva. Najčešća sijela raka kod muškaraca predstavljaju rak pluća (14,3%), rak prostate (14,1%), nemelanomski rak kože (7,2%) i rak želuca (7,1%), dok su kod žena najčešće dijagnosticirani rak dojke (24,5%), rak pluća (8,4%) i rak grlića maternice (6,5%) (44).

Rak jajnika 7. je najčešći rak kod žena u svijetu, dok je po mortalitetu na 8. mjestu. Prema istraživanjima za 2020. godinu, do 2040. godine broj žena s dijagnosticiranim rakom jajnika porast će za gotovo 42% na 445 721. Predviđa se da će se broj žena koje svake godine umiru od raka jajnika povećati na 313 617, što je povećanje od preko 50% u odnosu na 2020. godinu. Petogodišnje stope preživljenja od raka jajnika razlikuju se među zemljama. U razvijenijim zemljama trenutne stope kreću se od 36% do 46%, dok su u nekim zemljama te brojke znatno niže. Općenito, stope preživljenja znatno su ispod onih za druge vrste raka, poput raka dojke, gdje su stope petogodišnjeg preživljenja u mnogim zemljama blizu 90% (45).

Karcinom jajnika najučestaliji je oblik raka jajnika dijagnosticiran u 80% žena (14). Nespecifični simptomi vezani za urinarni i gastrointestinalni trakt, koji se pojavljuju relativno kasno, glavna su karakteristika karcinoma jajnika, a ujedno i razlog njegove kasne dijagnoze (16). Liječenje karcinoma jajnika temelji se na odluci multidisciplinarnog tima, te ovisi o stadiju u kojem je karcinom dijagnosticiran. Liječenje se zasniva na kombinaciji operacije i

kemoterapije. PARP inhibitori dosad su se koristili u liječenju karcinoma jajnika s BRCA1 ili BRCA2 mutacijama, no prema novijim ispitivanjima upotreba PARP inhibitora u prvoj liniji liječenja zajedno s kemoterapijom dovela je do poboljšanja kliničkih ishoda (23). Noviju mogućnost u liječenju karcinoma jajnika predstavlja upotreba hormonske terapije i inhibitora imunoloških kontrolnih točaka kao što su CTLA-4 i PD-1, no za njihovu rašireniju primjenu potrebno je bolje razumijevanje temeljnih bioloških mehanizama i bolji tehnološki razvoj (24). Osim navedenih metoda liječenja, potencijal u liječenju karcinoma jajnika pokazala je primjena prirodnih spojeva izoliranih iz biljaka i gljiva.

Gljiva *Cantharellus cibarius*, lisičarka ili bjelkasta lisičica u upotrebi je od davnih vremena. Pozitivne učinke na ljudsko zdravlje ostvaruje zbog povoljnog nutritivnog sastava. Bogata je ugljikohidratima, polinezasićenim masnim kiselinama, sekundarnim metabolitima te mikronutrijentima. Pokazuje snažno antioksidativno i protuupalno djelovanje (26). Polisaharidi izolirani iz gljive *Cantharellus cibarius* pokazali su značajan antiproliferativni učinak za stanice karcinoma kolona, bez štetnog djelovanja na normalne stanice (29). Za blagotvorne učinke gljive *Cantharellus cibarius* zaslužan je i visok sadržaj fenolnih spojeva.

Fenolni spojevi sekundarni su metaboliti građeni od aromatskog prstena i jedne ili više hidroksilnih skupina. Ovisno o strukturi, dijele se na jednostavne i složene flavonoide, fenolne kiseline i antocijane. Kod biljaka imaju obrambenu funkciju, služe za zaštitu od biljojeda, privlačenje kukaca za oprašivanje, a pokazuju i antibakterijsko i antifungalno djelovanje (30). Gljiva *Cantharellus cibarius* ima visok sadržaj fenolnih kiselina među kojima su galna, protokatehuinska, p-hidroksibenzojeva, kofeinska, te ferulinska kiselina, a pronađen je i flavonoid miricetin. Fenolne kiseline pokazuju snažno antioksidativno, protuupalno, antidijabetičko i antitumorsko djelovanje. Stoga imaju potencijal u liječenju brojnih kroničnih poremećaja kao što su neurodegenerativne bolesti, dijabetes, kardiovaskularne bolesti, te u liječenju raka.

Istraživanja koja su proveli He i sur. pokazuju citotoksično djelovanje galne kiseline na stanice karcinoma jajnika stanične linije OVCAR-3. Galna kiselina selektivno inhibira proliferaciju karcinomskih stanica, dok na normalne stanice jajnika ne djeluje. Inhibiciju angiogeneze postiže inhibicijom sekrecije vaskularnog endotelnog faktora rasta. Istraživanja su



pokazala značajno smanjenje vijabilnosti stanica karcinoma jajnika stanične linije OVCAR-3 (46, 47). Istraživanje koje su proveli Xie i sur. pokazalo je citotoksično djelovanje protokatehuinske kiseline na OVCAR-3 stanice karcinoma jajnika. Kod ovih stanica, protokatehuinska kiselina zaustavlja prijelaz stanica iz faze G2 u fazu M staničnog ciklusa, aktivira PARP i kaspaze 3 te pojačava i smanjuje izražaj regulatora apoptoze Bax i Bcl2. Protokatehuinska kiselina može inhibirati OVCAR-3 stanice budući da povećava razinu glutationa unutar stanice, a snižava razinu unutarstaničnih reaktivnih kisikovih spojeva (ROS). Općenito se može koristiti kao kemopreventivno sredstvo u liječenju raka jajnika jer ima utjecaj na apoptozu i autofagiju (48). Prema istraživanju Tavsana i Kayalija, upotreba flavonoida miricetina također pokazuje antitumorsko djelovanje na OVCAR-3 stanice karcinoma jajnika. Miricetin suzbija rast stanica raka jajnika, inducira apoptozu, zaustavlja stanični ciklus, te može inhibirati invaziju stanica zbog čega pokazuje potencijal primjene u terapiji karcinoma jajnika (43).

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi potencijalno citotoksično djelovanje vodenih ekstrakata gljive *Cantharellus cibarius* dobivenih pri 25°C i 70°C na staničnoj liniji karcinoma jajnika OVCAR-3. Citotoksično djelovanje ispitivano je korištenjem MTT testa kojim se određuje broj metabolički aktivnih stanica nakon tretiranja stanica vodenim ekstraktima gljive *Cantharellus cibarius*, nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije. Vodeni ekstrakti gljive *Cantharellus cibarius* dobiveni pri 25°C i 70°C doveli su do smanjenja broja metabolički aktivnih stanica. Vidljiv je djelomični utjecaj vremena inkubacije i koncentracije ekstrakta na njihovu citotoksičnu aktivnost. Za oba ekstrakta najznačajniji rezultati ostvareni su pri koncentracijama od 500 µg/mL i 1000 µg/mL nakon 72 sata inkubacije. Vodeni ekstrakt dobiven pri 25°C pri koncentraciji od 500 µg/mL smanjio je staničnu vijabilnost na 81,5%, a pri koncentraciji od 1000 µg/mL stanična vijabilnost iznosila je 68%. S druge strane, vodeni ekstrakt dobiven pri 70°C pri koncentracijama 500 µg/mL i 1000 µg/mL smanjio je broj preživjelih stanica na 69%. S nijednim od dvaju ispitivanih ekstrakata nije postignuta IC<sub>50</sub> vrijednost (koncentracija ekstrakta koja inhibira rast stanica za 50%) .

Na temelju *in vitro* dobivenih rezultata ovog istraživanja, dokazano je citotoksično djelovanje vodenih ekstrakata gljive *Cantharellus cibarius* dobivenih pri 25°C i 70°C na karcinomu jajnika stanične linije OVCAR-3. Stoga je potvrđena hipoteza i ostvaren cilj

istraživanja. Unatoč tome što nije ostvarena  $IC_{50}$  vrijednost, vidljiv je potencijal vodenih ekstrakata gljive *Cantharellus cibarius* za daljna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja kojim bi se potvrdio njihov citotoksični učinak i utvrdio mehanizam djelovanja.

## **6. ZAKLJUČCI**

- I. Vodeni ekstrakti gljive *Cantharellus cibarius* dobiveni pri 25°C i 70°C doveli su do smanjenja stanične vijabilnosti *in vitro* izloženih stanica karcinoma jajnika stanične linije OVCAR-3.
- II. Ispitivani ekstrakti uglavnom pokazuju citotoksičnu aktivnost ovisnu o vremenu izlaganja i koncentraciji ekstrakta.
- III. U nekim slučajevima citotoksična aktivnost vodenih ekstrakata gljive nije razmjerna povećanju koncentracije ekstrakta i vremena izlaganja.
- IV. U nekim slučajevima došlo je i do blagog porasta broja metabolički aktivnih stanica.
- V. Vodeni ekstrakti gljive *Cantharellus cibarius* dobiveni pri 25°C i 70°C pokazuju slično citotoksično djelovanje na stanice karcinoma jajnika stanične linije OVCAR-3. Oba ekstrakta statistički značajne rezultate ostvaruju nakon 72 sata inkubacije pri najvećim koncentracijama od 500 µg/mL i 1000 µg/mL.
- VI. Vodeni ekstrakti gljive *Cantharellus cibarius* nisu postigli IC<sub>50</sub> vrijednost.
- VII. Dobiveni rezultati pokazuju citotoksično djelovanje vodenih ekstrakata gljive *Cantharellus cibarius*, no za potvrdu dobivenih rezultata i citotoksične aktivnosti potrebna su dodatna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja.

## **7. LITERATURA**

1. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, urednik. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 149-152.
2. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, urednik. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 163-164.
3. Cooper GM, Hausman RE. Rak. U: Lauc G, urednik. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 730-734.
4. Cooper GM, Hausman RE. Rak. U: Lauc G, urednik. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 725-726.
5. Liu Y, Cao X. Characteristics and significance of the pre-metastatic niche. *Cancer Cell*. 2016;30:668-681.
6. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, urednik. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 152-157.
7. Cooper GM, Hausman RE. Rak. U: Lauc G, urednik. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 729.
8. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, urednik. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 157-159.
9. National Cancer Institute SEER Training modules. Cancer classification [Internet]. [citirano 8.9.2023.]. Dostupno na:  
<https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html#carcinoma>
10. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, urednici. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 4-8.
11. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, urednik. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 184-186.
12. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, urednici. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 8-10.
13. Cooper GM, Hausman RE. Rak. U: Lauc G, urednik. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 758.

14. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Tumori ženskog spolnog sustava. U: Raič A, urednici. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 185.
15. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Svjetski dan borbe protiv raka jajnika [Internet]. [citirano 5.9.2023.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologijaprevencija-nezaraznih-bolesti/svjetski-dan-borbe-protiv-raka-jajnika-2/>
16. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. Tumori ženskog spolnog sustava. U: Raič A.,ur. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 186-187.
17. Roett, Michelle A, and Patricia Evans. "Ovarian cancer: an overview." American family physician vol. 2009; 80: 609-616.
18. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. Tumori ženskog spolnog sustava. U: Raič A., ur. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 186.
19. MSD priručnik dijagnostike i terapije. Rak jajnika [Internet]. [citirano 5.9.2023.]. Dostupno na: <http://www.msdprirucnici.placebo.hr/msdprirucnik/ginekologija/ginekoloski-tumori/rak-jajnika>.
20. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. Tumori ženskog spolnog sustava. U: Raič A.,ur. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 187-188.
21. Chandra A, Pius C, Nabeel M, Nair M, Vishwanatha JK, Ahmad S i sur. Ovarian cancer: Current status and strategies for improving therapeutic outcomes. Cancer Med. 2019; 8:7018-7031.
22. Wuntakal R, Seshadri S, Montes A, Lane G. Luteinising hormone releasing hormone (LHRH) agonists for the treatment of relapsed epithelial ovarian cancer. Cochrane Database of Systematic Reviews 2016. doi:10.1002/14651858.CD011322.pub2.
23. Kurnit KC, Fleming GF, Lengyel E. Updates and new options in advanced epithelial ovarian cancer treatment. Obstet Gynecol. 2021;137:108-121.
24. Siminiak N, Czepczyński R, Zaborowski MP, Iżycki D. Immunotherapy in ovarian cancer. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2022;70:19.

25. Plantea: Priroda i biljke. Bjelkasta lisičica *Cantharellus cibarius* [Internet]. [citirano 6.9.2023.]. Dostupno na: <https://www.plantea.com.hr/bjelkasta-lisicica/>.
26. Režić Mužinić N, Veršić Bratinčević M, Grubić M, Frleta Matas R, Čagalj M, Visković T i sur. Golden Chanterelle or a gold mine? Metabolites from aqueous extracts of Golden Chanterelle (*Cantharellus cibarius*) and their antioxidant and cytotoxic activities. *Molecules*. 2023;28:2110.
27. Healthline. Chanterelle mushrooms: nutrients, benefits, and recipe [Internet]. Rachael Ajmera, MS, RD; 2022 [citirano 6.9.2023.]. Dostupno na: <https://www.healthline.com/nutrition/chanterelle-mushrooms#recipes>.
28. WebMD. Health benefits of Chanterelle mushrooms [Internet]. WebMD editorial contributors; 2022. [citirano 6.9.2023.]. Dostupno na: <https://www.webmd.com/diet/health-benefits-chanterelle-mushrooms>.
29. Nowacka-Jechalke N, Nowak R, Juda M, Malm A, Lemieszek M, Rzeski W i sur. New biological activity of the polysaccharide fraction from *Cantharellus cibarius* and its structural characterization. *Food chemistry*. 2018;268:355-361.
30. Lin D, Xiao M, Zhao J, Li Z, Xing B, Li X i sur. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*. 2016;21:1374.
31. Rahman MM, Rahaman MS, Islam MR, Rahman F, Mithi FM, Alqahtani T i sur. Role of phenolic compounds in human disease: current knowledge and future prospects. *Molecules*. 2021;27:233.
32. Wu D, Zhou J, Creyer MN, Yim W, Chen Z, Messersmith PB i sur. Phenolic-enabled nanotechnology: versatile particle engineering for biomedicine. *Chem Soc Rev*. 2021;50:4432-4483.
33. Bai J, Zhang Y, Tang C, Hou Y, Ai X, Chen X i sur. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. *Biomed Pharmacother*. 2021;133:110985. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110985.
34. Rajendran P, Abdelsalam SA, Renu K, Veeraraghavan V, Ben Ammar R, Ahmed EA. Polyphenols as potent epigenetics agents for cancer. *Int J Mol Sci*. 2022;23:11712. doi: 10.3390/ijms231911712.



35. Kakkar S, Bais S. A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential. *ISRN Pharmacol.* 2014;2014:952943. doi: 10.1155/2014/952943.
36. Zhang S, Gai Z, Gui T, Chen J, Chen Q, Li Y. Antioxidant effects of protocatechuic acid and protocatechuic aldehyde: old wine in a new bottle. *Evid based complement alternat med.* 2021;2021:6139308. doi: 10.1155/2021/6139308.
37. Syarifah-Noratiqah SB, Zulfarina MS, Ahmad SU, Fairus S, Naina-Mohamed I. The pharmacological potential of oil palm phenolics (OPP) individual components. *Int J Med Sci.* 2019;16:711-719.
38. Pavlíková N. Caffeic acid and diseases-mechanisms of action. *Int J Mol Sci.* 2022;24:588.
39. Zduńska K, Dana A, Kolodziejczak A, Rotsztein H. Antioxidant properties of ferulic acid and its possible application. *Skin Pharmacol Physiol.* 2018;31:332-336.
40. Singh Tuli H, Kumar A, Ramniwas S, Coudhary R, Aggarwal D, Kumar M i sur. Ferulic acid: A natural phenol that inhibits neoplastic events through modulation of oncogenic signaling. *Molecules.* 2022;27:7653.
41. Semwal DK, Semwal RB, Combrinck S, Viljoen A. Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities. *Nutrients.* 2016;8:90.
42. Taheri Y, Suleria HAR, Martins N, Sytar O, Beyatli A, Yeskaliyeva B i sur. Myricetin bioactive effects: moving from preclinical evidence to potential clinical applications. *BMC Complement Med Ther.* 2020;20:241.
43. Tavsan Z, Kayali HA. Flavonoids showed anticancer effects on the ovarian cancer cells: Involvement of reactive oxygen species, apoptosis, cell cycle and invasion. *Biomed pharmacother.* 2019;116:109004.
44. Chhikara BS, Parang K. Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chem biol lett* [Internet]. 2023 [citirano 19.9.2023.]. Dostupno na: <https://pubs.thesciencein.org/journal/index.php/cbl/article/view/451>.
45. World Ovarian Cancer Coalition. Ovarian cancer key stats [Internet]. Globocan; 2020. [citirano 14.9.2023.]. Dostupno na: <https://worldovariancancercoalition.org/about-ovarian-cancer/key-stats/>.

46. He Z, Li B, Rankin GO, Rojanasakul Y, Chen YC. Selecting bioactive phenolic compounds as potential agents to inhibit proliferation and VEGF expression in human ovarian cancer cells. *Oncol Lett.* 2015;9:1444-1450.
47. He Z, Chen AY, Rojanasakul Y, Rankin GO, Chen YC. Gallic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenic effects via the PTEN/AKT/HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway in ovarian cancer cells. *Oncol Rep.* 2016;35:291-7.
48. Xie Z, Guo Z, Wang Y, Lei J, Yu J. Protocatechuic acid inhibits the growth of ovarian cancer cells by inducing apoptosis and autophagy. *Phytother Res.* 2018;32:2256-2263.

## **8. SAŽETAK**

**Cilj istraživanja:** Cilj ovog istraživanja bio je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje vodenih ekstrakata gljive *Cantharellus cibarius* dobivenih pri 25°C i 70°C na staničnoj liniji karcinoma jajnika OVCAR-3. Pretpostavljeno je da će se broj stanica karcinoma jajnika, nakon tretiranja vodenim ekstraktima gljive, smanjiti u odnosu na kontrolnu skupinu.

**Materijali i metode:** Citotoksično djelovanje ispitivano je korištenjem MTT testa. Ekstrakti su pripremljeni u 6 različitih koncentracija: 1 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL i 1000 µg/mL, a učinak je promatran nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije. Djelotvornost ekstrakata gljive *Cantharellus cibarius* određivana je spektrofotometrijski pri 570 nm. Usporedbom apsorbancije nastalog formazana kod stanica tretiranih ekstraktima gljive *Cantharellus cibarius* (ispitivana skupina) i netretiranih stanica (kontrolna skupina) određen je postotak metabolički aktivnih stanica.

**Rezultati:** Rezultati su prikazani grafički u odnosu stanične vijabilnosti (%) i koncentracije ekstrakta. Vodeni ekstrakti gljive *Cantharellus cibarius* dobiveni pri 25°C i 70°C pokazali su sličan učinak. Za oba ekstrakta najznačajniji rezultati ostvareni su nakon 72 sata inkubacije pri koncentracijama od 500 µg/mL i 1000 µg/mL. Ekstrakt dobiven pri 25°C pri koncentraciji od 500 µg/mL smanjio je staničnu vijabilnost na 81,5%, a pri koncentraciji od 1000 µg/mL stanična vijabilnost iznosila je 68%. Ekstrakt dobiven pri 70°C pri objema koncentracijama smanjio je staničnu vijabilnost na 69%.

**Zaključak:** Vodeni ekstrakti gljive *Cantharellus cibarius* dobiveni pri 25°C i 70°C doveli su do smanjenja stanične vijabilnosti stanica karcinoma jajnika stanične linije OVCAR-3. Ispitivani ekstrakti uglavnom pokazuju citotoksičnu aktivnost ovisnu o vremenu izlaganja i koncentraciji ekstrakta. U nekim slučajevima citotoksična aktivnost ekstrakata gljive nije razmjerna povećanju koncentracije ekstrakta i vremena izlaganja, a nekim slučajevima došlo je i do blagog porasta broja metabolički aktivnih stanica. Vodeni ekstrakti gljive *Cantharellus cibarius* dobiveni pri 25°C i 70°C pokazuju slično citotoksično djelovanje. Oba ekstrakta značajne rezultate ostvaruju nakon 72 sata inkubacije pri koncentracijama od 500 µg/mL i 1000 µg/mL. Ekstrakti gljive nisu postigli IC<sub>50</sub> vrijednost. Dobiveni rezultati pokazuju citotoksično djelovanje vodenih ekstrakata gljive *Cantharellus cibarius*, no za potvrdu dobivenih rezultata i citotoksične aktivnosti potrebna su dodatna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja.

## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:** Cytotoxic effect of *Cantharellus cibarius* mushroom extract on ovarian cancer cell line OVCAR-3

**Objective:** The aim of this research was to examine the potential cytotoxic effect of *Cantharellus cibarius* mushroom aqueous extracts obtained at 25°C and 70°C on the ovarian cancer cell line OVCAR-3. It was assumed that the number of ovarian cancer cells, after treatment with aqueous extracts of mushroom, will decrease compared to the control group.

**Materials and methods:** Cytotoxic activity was examined using the MTT assay. The extracts were prepared in 6 different concentrations: 1 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL and 1000 µg/mL, and the effect was observed after 24, 48 and 72 hours of incubation. The effectiveness of *Cantharellus cibarius* mushroom extracts was determined spectrophotometrically at 570 nm. The percentage of metabolically active cells was determined by comparing the absorbance of the formed formazan in cells treated with *Cantharellus cibarius* mushroom extracts (test group) and untreated cells (control group).

**Results:** The results are graphically presented in relation to cell viability (%) and extract concentration. Aqueous extracts of *Cantharellus cibarius* mushroom obtained at 25°C and 70°C showed similar effects. For both extracts, the most significant results were achieved after 72 hours of incubation at concentrations of 500 µg/mL and 1000 µg/mL. The extract obtained at 25°C at a concentration of 500 µg/mL reduced the cell viability to 81.5%; at a concentration of 1000 µg/mL, the cell viability was 68%. The extract obtained at 70°C at both concentrations reduced cell viability to 69%.

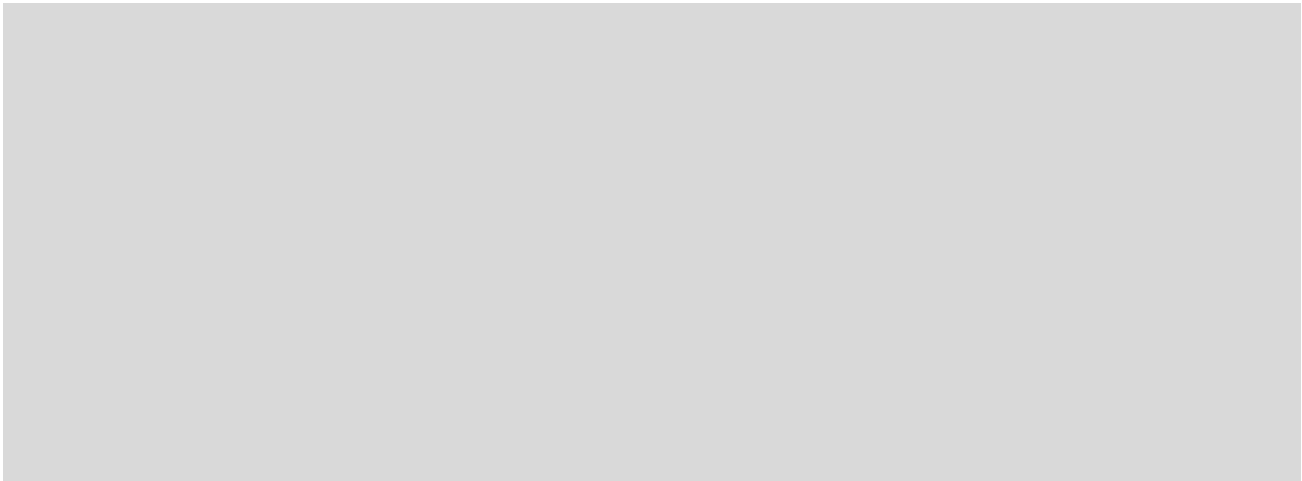
**Conclusion:** Aqueous extracts of *Cantharellus cibarius* mushroom obtained at 25°C and 70°C led to a decrease in cell viability of *in vitro* exposed ovarian cancer cells of the OVCAR-3 cell line. The examined extracts mainly show cytotoxic activity depending on the exposure time and the concentration of the extract. In some cases, the cytotoxic activity of the mushroom extracts is not proportional to the increase in the concentration of the extract, and the exposure time and in some cases, there was a slight increase in the number of metabolically active cells. Aqueous extracts of *Cantharellus cibarius* mushroom obtained at 25°C and 70°C show a similar cytotoxic effect on ovarian cancer cells of the OVCAR-3 cell line. Both extracts achieve significant results after 72 hours of incubation at concentrations of 500 µg/mL and 1000 µg/mL.

Mushroom extracts did not reach the IC<sub>50</sub> value. The obtained results show the cytotoxic effect of *Cantharellus cibarius* mushroom aqueous extracts, but additional *in vitro* and *in vivo* studies are needed to confirm the obtained results and cytotoxic activity.

## **10. ŽIVOTOPIS**



## **OSOBNİ PODACI:**



## **OBRAZOVANJE:**

- **2006. – 2014.** Osnovna škola „Sućidar”, Split, Republika Hrvatska
- **2014. – 2018.** Opća gimnazija „Marko Marulić”, Split, Republika Hrvatska
- **2018. – 2023.** Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet, studij: Farmacija
- **Veljača 2023. – Kolovoz 2023.** Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Sućidar

## **NAGRADE:**

- Dekanova nagrada za izvrsnost za akademsku godinu 2019./2020.

## **POSEBNE VJEŠTINE:**

**Rad na računalu:** MS Office, Eskulap 2000

**Strani jezici:** engleski jezik

**Vozačka dozvola:** B kategorija