

# Utjecaj gljive *Ophiocordyceps sinensis* na imunosni sustav ljudi

---

Reljić, Mirna

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:134512>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Mirna Reljić

**Utjecaj gljive *Ophiocordyceps sinensis* na imunosni  
sustav ljudi**

***Influence of *Ophiocordyceps sinensis* on human  
immune system***

Završni rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić.

# Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	1
<b>2. Klasifikacija, stanište i životni ciklus</b> .....	2
<b>3. Uzgoj</b> .....	4
<b>4. Ekstrakcija bioaktivnih tvari</b> .....	5
<b>4.1. Vodeni ekstrakti</b> .....	6
<b>4.2. Alkoholni ekstrakti</b> .....	6
<b>4.3. Etil acetatni ekstrakti</b> .....	6
<b>5. Bioaktivne tvari</b> .....	7
<b>5.1. Polisaharidi</b> .....	8
<b>5.1.1. Izvanstanični polisaharidi</b> .....	8
<b>5.1.2. Unutarstanični polisaharidi</b> .....	9
<b>5.2. Nukleozidi i njihovi derivati</b> .....	9
<b>5.2.1. Kordicepin</b> .....	9
<b>5.2.2. Adenozin</b> .....	10
<b>5.3. Kordicepinska kiselina</b> .....	10
<b>5.4. Steroli</b> .....	10
<b>5.4.1. Ergosterol</b> .....	10
<b>5.4.2. H1-A</b> .....	10
<b>5.4.3. Ostali steroli</b> .....	11
<b>5.5. Proteini, peptidi i aminokiseline</b> .....	11
<b>5.5.1 CSDNaza</b> .....	11
<b>5.5.2. Serinska proteaza (OSP ili CSP)</b> .....	11
<b>5.5.3. Triptofan</b> .....	12
<b>5.5.4. Kordimin</b> .....	12
<b>5.5.5. Kordicedipeptid A</b> .....	13
<b>5.5.6. Kordiceamid A i B</b> .....	13

5.6. Kordisinini.....	13
6. Farmakološka aktivnost <i>O. sinensis</i> .....	14
6.1. Imunomodulatorna aktivnost .....	14
6.2. Protuupalna aktivnost .....	17
6.3. Antioksidativna aktivnost .....	19
6.4. Utjecaj na apoptozu .....	20
6.5. Antitumorska i antimetastazna aktivnost .....	21
6.6. Aktivnost protiv dijabetesa .....	23
6.7. Zaštita kardiovaskularnog sustava .....	24
6.8. Zaštita bubrega .....	24
6.9. Utjecaj na reproduktivni sustava .....	25
6.10. Prevencija osteoporoze .....	26
6.11. Ostale farmakološke aktivnosti .....	27
7. Korištenje pripravaka gljive <i>O. sinensis</i> i zabilježene nuspojave .....	28
8. Problematika istraživanja gljive <i>O. sinensis</i> .....	29
9. Zaključak .....	30
10. Literatura .....	31
11. Sažetak.....	42
12. Summary .....	43
13. Životopis .....	44

# 1. Uvod

Gljiva gusjenica (engl. *Caterpillar fungus*) *Ophiocordyceps sinensis*, prije poznata kao *Cordyceps sinensis*, je entomopatogena gljiva s dugom poviješću primjene u tradicionalnoj kineskoj medicini (engl. *traditional Chinese medicine*, TCM). Kolokvijalno se naziva *dongchong xiacao* što je kineski prijevod tibetskog naziva *Yartsa gunbu* koji u doslovnom prijevodu znači „ljetna trava, zimski crv“ (Winkler 2008). Koristi se u tretiranju umora, kašlja, smanjenog seksualnog nagona, izrazite slabosti nakon teških bolesti, disfunkcije i zatajenja bubrega (Lin i Li 2011). *O. sinensis* je privukao interes šire znanstvene zajednice nakon Nacionalnih igara u Pekingu 1993. godine zbog uspjeha ženskih trkačica koje su koristile pripravke ove gljive (Steinkraus i Whitfield 1994).

Zbog povećane potražnje i male dostupnosti, cijena *O. sinensis* naglo je porasla te je u 2006. godini iznosila 32 000 USD po kili (engl. *United States dollar*, USD) (Winkler 2008), a 2012. godine čak 111 560 USD po kili (Lo i sur. 2013). *O. sinensis* je u potpunosti uspješno uzgojen u kulturi 2015. godine (Cao i sur. 2015). U istraživanjima se koriste različiti ekstrakti izolirani iz gljive *O. sinensis*, a danas se na tržištu mogu kupiti kapsule, tablete, granule te prah micelija ili čitave gljive *O. sinensis* (Chen i sur. 2013).

Brojne bioaktivne tvari izolirane iz *O. sinensis* imaju niz funkcionalnih učinaka na organizam poput imunomodulatorne, protuupalne, antitumorske i antioksidativne aktivnosti, poticanja i inhibicije apoptoze, zaštite kardiovaskularnog sustava, reproduktivnog sustava i bubrega, prevencije osteoporoze i dijabetesa (Lo i sur. 2013; J. Xu i sur. 2016; Belwal i sur. 2019). Imunosni sustav je najvažniji sustav u obrani organizma od bolesti, pa se velik interes posvetio istraživanju bioaktivnih tvari izoliranih iz *O. sinensis* s imunomodulatornim svojstvima zbog čega je na ovu temu stavljen veći naglasak (Lin i Li 2011; Xu i sur. 2016; Das i sur. 2021). Osim napredaka u istraživanju gljive *O. sinensis* i njenih bioaktivnih tvari i utjecaja na organizam čovjeka, u ovome radu analizirat će se i zabilježeni problemi i propusti u istraživanjima.

## 2. Klasifikacija, stanište i životni ciklus

*O. sinensis* pripada porodici *Ophiocordycipitaceae* (Tablica 1.) te je endemska vrsta specifična za travnjake Tibetanske visoravni (3000 – 5000 metara nadmorske visine) (Chen i sur. 2010a) (Slika 1. A, B). Ova endoparazitska gljiva za domaćina ima više od 50 vrsta ličinki moljaca iz reda *Lepidoptera*, preciznije porodice *Hepialidae* (Tablica 1.) (Kinjo i Zang 2001, Sung i sur. 2007, Wang i Yao 2011b, Wu i sur. 2020a).

Tablica 1. Klasifikacija gljive *O. sinensis* i njezinih domaćina.

	<i>O. sinensis</i>	domaćin
Carstvo	Fungi	Animalia
Koljeno	Ascomycota	Artropoda
Razred	Sordariomycetes	Insecta
Red	Hypocreales	Lepidoptera
Porodica	<i>Ophiocordycipitaceae</i>	<i>Hepialidae</i>
Rod	<i>Ophiocordyceps</i>	<i>Thitarodes/Hepialus</i>
Vrsta	<i>O. sinensis</i> , <i>H. sinensis</i> *	više vrsta

\* *Hirsutella sinensis* je naziv za anamorf (nespolna reproduktivna faza) *O. sinensis*, naziv nije u upotrebi od 2013. godine (Lo i sur 2013.)

U kasnu jesen spore gljive zaraze ličinku domaćina tako što se prilipe na egzoskelet te ga probiju mehaničkim pritiskom i izlučivanjem lipaza i proteaza (Xu i sur. 2016). Prijašnja istraživanja tvrde kako je način infekcije nepoznat (Xing i Guo 2008; Zhang i sur. 2012). Nakon infekcije, gljiva raste, ispunjava tijelo gusjenice hifama i mijenja njeno ponašanje. Nezaražene jedinke gusjenica hiberniraju dublje u tlu, dok su zaražene jedinke potaknute na migraciju 2 – 5 centimetara ispod površine tla gdje ugibaju glavom prema gore (Zhang i sur. 2012). Gljiva zatim izrasta iz tijela ličinke i stvara stromalni pupoljak koji u proljeće izrasta iz zemlje i formira plodište sa sporama koje mogu zaraziti druge gusjenice (Buenz i sur. 2005; Winkler 2008) (Slika 1. A). Osim telemorfa (spolna reproduktivna faza) u kojoj *O. sinensis* proizvodi askospore, postoji i anamorf (nespolna reproduktivna faza) poznat kao *Hirsutella sinensis* kada nastaju aseksualne konidije (aseksualne, nepokretne spore) (Liu i sur. 1989). Naziv *H. sinensis* nije u upotrebi od 2013. godine (Lo i sur. 2013), već se za spolnu i nespolnu reproduktivnu fazu koristi naziv *O. sinensis*.



Slika 1. Plodište gljive *O. sinensis* koje izrasta iz gusjenice (A) i područje rasprostranjenosti (B) (preuzeto i prilagođeno iz: Winkler 2008 (A) i Buenz i sur. 2005 (B)).



### 3. Uzgoj

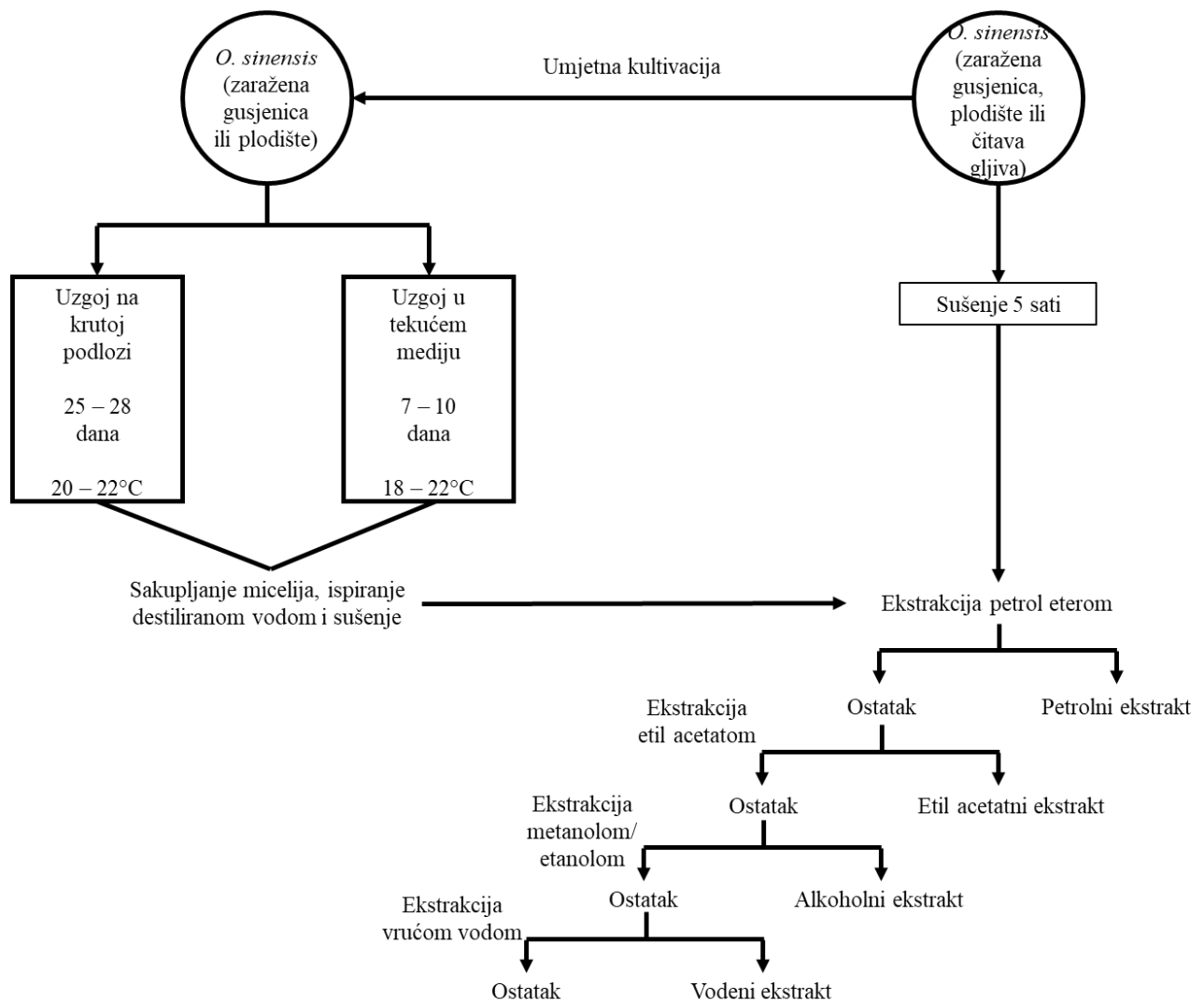
Oskudica *O. sinensis*, zbog povećanog sakupljanja i geografskih ograničenja uzgoja, potaknula je razvoj kultivacije u kulturi, što je i pouzdaniji izvor za masovnu proizvodnju (Yan i sur. 2014). Micelij gljive uspješno je uzgojen u tekućim podlogama uz protresanje te na krutim podlogama (Dong i Yao 2005; Li i sur. 2009a; Lo i sur. 2013; Yue i sur. 2013). Uzgojeni micelij pokazao je slične farmakološke aktivnosti kao i divlji *O. sinensis* što ga čini pogodnim za primjenu u medicini (Cheung i sur. 2009; Chen i sur. 2010b; Chen i sur. 2013). U svrhu poboljšanja sastava bioaktivnih tvari uzorci se često fermentiraju (engl. *submerged fermentation*), što se pokazalo izuzetno pogodnim za poboljšanje udjela polisaharida (Yan i sur. 2014). Budući da telemorf (spolna reproduktivna faza) gljive *O. sinensis* dugo nije mogao biti uzgojen *in vitro*, istraživanja su se usredotočila na uzgoj micelija tj. anamorfa (nespolna reproduktivna faza) (Cao i sur. 2015). Cao i sur. (2015) su prvi s vjerodostojnim rezultatima uzgojili plodište gljive *O. sinensis* u umjetnom mediju. Osim uzgoja *in vitro* postoji mogućnost inokulacije gusjenica s kultiviranim sojevima gljive, nakon čega se gusjenice nastavljaju uzgajati dok ne proizvedu plodište koje se može sakupiti. Budući da je uzgoj u laboratoriju skup, u prirodu se nekada puštaju zaražene ličinke koje se kasnije skupljaju na području gdje su ranije puštene (Yue i sur. 2013).

U kulturi se uzgaja i niz različitih sojeva gljiva (*Paecilomyces hepiali*, *Mortierella hepiali*, *Cephalosporium sinensis* i *Clonostachys rosea*) izoliranih iz jedinki *O. sinensis* sakupljenih u prirodi koji su klasificirani kao gljive izolirane iz divljih jedinki *O. sinensis* (engl. *Chinese cordyceps-associated fungi*) (Yan i sur. 2014; Dong i sur. 2015).

Unatoč svim napredcima na području uzgoja, današnja proizvodnja ne može zadovoljiti sve veću potražnju za pripravcima gljive *O. sinensis*. Daljnji razvoj uzgoja svakako je potreban zajedno s istraživanjem i upotrebom gljiva izoliranih iz divljih jedinki *O. sinensis* koje imaju slična farmakološka svojstva (Dong i sur. 2015), te mogu zamijeniti pripravke vrste *O. sinensis*.

## 4. Ekstrakcija bioaktivnih tvari

U istraživanjima se koriste različita otapala u svrhu izolacije bioaktivnih tvari iz micelija ili čitave gljive *O. sinensis*, pri čemu korišteno otapalo ovisi o frakciji koja se želi izolirati. Najčešće korištena otapala su etil acetat, etanol, metanol i voda, a često se u procesu ekstrakcije koristi više otapala i serija ekstrakcija (Slika 2.) (Chen i sur. 2013; Shashidhar i sur. 2013). Različiti ekstrakti imaju različit bioaktivni učinak na organizam. Ekstrakti se nekada liofiliziraju i po potrebi ponovno otapaju (Chen i sur. 2013).



Slika 2. Shematski prikaz ekstrakcije bioaktivnih tvari iz *O. sinensis* (preuzeto i prilagođeno: Shashidhar i sur. 2013).

#### **4.1. Vodeni ekstrakti**

Voda je polarno otapalo u kojim se mogu ekstrahirati polarne molekule poput polisaharida, nukleotida i sličnih komponenti. Pri vodenoj ekstrakciji temperatura ekstrakcije važniji je parametar od vremena ekstrakcije, prema analiziranim metodama korištene temperature (70 – 120 °C) i vremena ekstrakcije (5 minuta – 3 sata) iz većeg broja istraživanja (Chen i sur. 2013). Vrući vodeni ekstrakti imaju prinos 25 – 30% i pokazuju antioksidativna, antibakterijska, regenerativna i imunostimulatorna svojstva (Yamaguchi i sur. 2000; Ji i sur. 2009; Chen i sur. 2013; Rakhee i sur. 2021).

#### **4.2. Alkoholni ekstrakti**

Alkoholna ekstrakcija kao otapala koristi metanol, etanol te vodene otopine metanola i etanola. Upotrebom alkoholne ekstrakcije iz *O. sinensis* mogu se izolirati polisaharidi, nukleozidi, proteini i steroli (Shashidhar i sur. 2013; Rakhee i sur. 2021). Etanolni ekstrakti pokazuju antioksidativno i antihiperglikemijsko svojstvo (Yamaguchi i sur. 2000; Zhang i sur. 2006), dok metanolni ekstrakti pokazuju protuupalno, imunomodulatorno i antitumorsko svojstvo (Jia i sur. 2009; Rakhee i sur. 2021).

#### **4.3. Etil acetatni ekstrakti**

Etil acetat ima manju polarnost od prije spomenutih otapala. Iako izolacija etil acetatom ima mali prinos, sastav spojeva razlikuje se od vodenih i alkoholnih ekstrakata, a sadrži ugljikohidrate, adenzin, ergosterol i kordicepin (Shashidhar i sur. 2013). Prije nego se provede ekstrakcija s etil acetatom, napravi se ekstrakcija s petrol eterom, koja je pokazala antioksidativna i imunomodulatorna svojstva (Wu i sur. 2007; Chen i sur. 2013; Shashidhar i sur. 2013). Etil acetatni ekstrakt pokazao je antitumorsko djelovanje indukcijom apoptoze u ljudskim premijelocitnim leukemijskim stanicama HL60 i inhibicijom proliferacije tumorskih stanica (Zhang i sur. 2004; Wu i sur. 2007).

## 5. Bioaktivne tvari

Lo i sur. (2013) su naveli preko 20 bioaktivnih sastojaka izoliranih iz micelija, plodišta ili supernatanta *in vitro* kulture *O. sinensis* (Tablica 2). Osim navedenih otkrivene su još neke bioaktivne tvari poput spoja H1-A i CSDNaze (Liu i sur. 2015). U ovom poglavlju ukratko će se analizirati bioaktivni sastojci izolirani iz *O. sinensis*, a za neke će se navesti i njihova farmakološka aktivnost.

Tablica 2. Bioaktivni sastojci s pripadnom bioaktivnošću te izvor materijala *O. sinensis*\*

Broj	Bioaktivni sastojci	Bioaktivnost	Izvor matrijala
1	Izvanstanični polisaharidi i egzopolisaharidi	Imunomodulacijska i antitumorska Imunomodulacijska	Supernatant kulture
2	Unutarstanični polisaharidi	Antioksidant	Supernatant kulture
		Imunomodulacijska i antitumorska	Micelij
		Imunomodulacijska i antioksidant	Micelij
		Imunomodulacijska	Micelij
		Hipoglikemijska	Micelij
		Hipoglikemijska i antioksidant	Micelij
		Antioksidant i antitumorska	Micelij
		Antioksidant	Micelij
		Antioksidant	Plodište
		Zaštita od kroničnog propadanja bubrega	Micelij
3	Kordicepin	Inhibitorna aktivnost kolesterol esteraze	Micelij
		Niži trigliceridi i kolesterol u plazmi	Micelij
		Steroidogeneza	Supernatant kulture
		Antimetastazna aktivnost	Supernatant kulture
		Antitumorska	Supernatant kulture
		Imunomodulacijska	Supernatant kulture
		Imunomodulacijska	Micelij
		Imunomodulacijska	Micelij
		Antioksidant; Protuupalna	-
		Hipoglikemijska	Micelij
4	Adenozin	Neurotransmiter	Micelij
5	Gvanozin	Citotoksičnost	Micelij
6	Kordimin	Citotoksičnost	Micelij
7	Lovastatin	Citotoksičnost	Micelij
8	$\gamma$ -aminobutirat (GABA)	Antitumorska	Micelij
9	Sitosterol	Antitumorska	Micelij
10	Ergosterol	Inhibitor imunosti	-
11	Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one(ergone)	Fibrinolitička	Supernatant kulture
12	5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioksi-22E-ergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol	Antioksidant	Micelij
13	5 $\alpha$ , 8 $\alpha$ -epidioksi-22E-ergosta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol	Protuupalna	Micelij
14	5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoksi-5 $\alpha$ -ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol	Protuupalna	Micelij
15	5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioksi-24(R)-metilkolesta-6,22-dien-3 $\beta$ -D-glucopiranozid	Protuupalna	Micelij
16	5,6-epoksi-24(R)-metilkolesta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol	Protuupalna	Micelij
17	Miriocin	Citotoksičnost	Supernatant kulture
18	Serinske proteaze	Inhibitor imunosti	-
19	Melanin	Fibrinolitička	Supernatant kulture
20	Kordisinin A	Antioksidant	Micelij
21	Kordisinin B	Protuupalna	Micelij
22	Kordisinin C	Protuupalna	Micelij
23	Kordisinin D	Protuupalna	Micelij
24	Kordisinin E	Protuupalna	Micelij
25	Kordiceamid A	Citotoksičnost	Supernatant kulture
26	Kordiceamid B	Citotoksičnost	Supernatant kulture

\*(preuzeto i prilagođeno od: Lo i sur. 2013).

## 5.1. Polisaharidi

Polisaharidi su najzastupljeniji ugljikohidrati u hrani, a u *O. sinensis* zauzimaju 3 – 8% ukupne mase (Li i sur. 2001). Polisaharidi iz *O. sinensis* mogu se podijeliti na izvanstanične polisaharide (engl. *extracellular polysaccharides*, EPS) i unutarstanične polisaharide (engl. *intracellular polysaccharides*, IPS) i imaju brojna bioaktivna svojstva (Tablica 2.) poput antitumorske aktivnosti, imunomodulatorne aktivnosti, hipoglikemijskog djelovanja, antioksidativne uloge i zaštite jetre (Zhong i sur. 2009; Lo i sur. 2013; Liu i sur. 2015).

### 5.1.1. Izvanstanični polisaharidi

Izvanstanični polisaharidi mogu se izolirati iz supernatanta kulture micelija *O. sinensis* precipitacijom polisaharida etanolom iz vodene otopine (Chen i sur. 2010b). Izolirani polisaharidi imaju molekularnu masu između 5 i 200 kDa (Lo i sur. 2013). Najvažnije farmakološke aktivnosti izvanstaničnih polisaharida su imunomodulatorna i protutumorska aktivnost (Sheng i sur. 2011). Ipak, polisaharid CSP-2 molekularne mase 43,9 kDa pokazao je aktivnost u sprječavanju zatajenja bubrega (Lo i sur. 2013; Wang i sur. 2014).

Kiseli polisaharidi (engl. *acid polysaccharide*, APS) izolirani su kromatografijom na ionskim izmjenjivačima propuštanjem otopine etanolnog precipitata izvanstaničnih polisaharida kroz celuloznu kolonu DEAE-32 (engl. *diethylaminoethyl cellulose*, DEAE-C) koja je eluirana gradijentom natrijeva klorida (Chen i sur. 2010). Shen i sur. (2011) uočili su da APS može smanjiti smrtnost stanica uzrokovanu vodikovim peroksidom ( $H_2O_2$ ). Njihovi rezultati pokazali su kako predtretman stanica APS-om smanjuje razinu laktat dehidrogenaze i reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) stimulirajući antioksidativne enzime poput katalaze (engl. *catalase*, CAT) i superoksid dismutaze (engl. *superoxide dismutase*, SOD) koji su inače inhibirani vodikovim peroksidom. Osim antioksidativne aktivnosti, frakcija kiselih polisaharida može potaknuti promjenu fenotipa makrofaga iz  $M_2$  u  $M_1$  (Chen i sur. 2010b). Tretman frakcijom kiselih polisaharida pokazao je povećanje fagocitozne aktivnosti i razine nitrita u supernatantu stanične kulture, a zabilježena je i povećana ekspresija inducibilne sintaze dušikovog oksida (engl. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS). Povećanje razine NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF- $\kappa$ B) u jezgri potiče na zaključak da je promjena fenotipa makrofaga posljedica aktivacije NF- $\kappa$ B signalnog puta (Chen i sur. 2010b).

### **5.1.2. Unutarstanični polisaharidi**

Unutarstanični polisaharidi izolirani iz *O. sinensis* imaju masu od 7,7 do 1180 kDa (Lo i sur. 2013). Polisaharidi sa značajnim farmakološkim svojstvima su CPS-1, CME-1 i CS-F10. Polisaharid CPS-1 molekularne mase 8,1 kDa pokazao je antioksidativna svojstva i potencijal u tretiranju dijabetesa i zatajenja bubrega (Lo i sur. 2013; Liu i sur. 2015). CME-1 također ima antioksidativnu, antitumorsku i antikoagulacijsku aktivnost, a CS-F10, izoliran ekstrakcijom vrućom vodom, ima hipoglikemijsku aktivnost (Wang i sur. 2011a; Lu i sur. 2014; Liu i sur. 2015). Antioksidativna aktivnost CME-1 temelji se na sposobnosti polisaharida da veže hidroksilne radikale i inhibira neutralne i kisele sfingomijelaze, enzime koje hidrolitičkim cijepanjem proizvode ceramide, lipidne medijatore stresa (Wang i sur. 2011a). Smanjena razina ceramida i inhibicija sfingomijelaza u makrofazima ukazuje da CME-1 ima zaštitni učinak protiv oksidativnog stresa (Wang i sur. 2011a).

## **5.2. Nukleozidi i njihovi derivati**

Nukleozidi i njihovi derivati koriste se u antivirusnim terapijama i terapijama protiv tumora te se istražuju u svrhu razvoja novih lijekova protiv zaraznih bolesti. Iz *O. sinensis* do sada su, uz kordicepin, izolirani adenin, adenozin, inozin, citidin, citozin, gvanin, uridin, timidin, uracil, hipoksantin i gvanozin (Liu i sur. 2015). Najviše pozitivnih utjecaja na organizam pokazali su adenozin i kordicepin, dok nukleobazama samostalno nije zabilježena farmakološka aktivnost (Liu i sur. 2015).

### **5.2.1. Kordicepin**

Kordicepin ili 3'-deoksiadenozin je derivat adenozina te je u divljim jedinkama *O. sinensis* zabilježen u malim koncentracijama, dok u uzgojenim jedinkama nije detektiran (Yang i sur. 2010). Zastupljeniji je u vrsti *Cordyceps militaris* (Yang i sur. 2009). Kordicepin se može izolirati otopinom metanol-kloroform (1:1, v/v) ili vodenom otopinom acetonitrila (Lo i sur. 2013; Liu i sur. 2015). Zabilježene farmakološke aktivnosti kordicepina su protuupalna aktivnost, imunostimulatorna aktivnost, antitumorska i antibakterijska aktivnost, stimulacija steroidogeneze, analgetički učinak i inhibicija agregacije trombocita (Cho i sur. 2007; Liu i sur. 2015). Kordicepin može uzrokovati preranu terminaciju transkripcije jer ga brojni enzimi koji sudjeluju u transkripciji ne mogu razlikovati od adenozina zbog strukturne sličnosti (Tuli i sur. 2013). Kordicepin se tako ugrađuje umjesto drugih nukleozida i terminira transkripciju. Wong i sur. (2010) pretpostavili su kako se mnogi učinci kordicepina mogu pripisati utjecaju na mTOR signalni put (engl. *mammalian target of rapamycin*, mTOR) preko aktivacije proteinske kinaze aktivirane AMP-om (engl. *AMP-activated protein kinase*, AMPK).

### 5.2.2. Adenozin

Udio adenozina u gljivi *O. sinensis* značajno je veća u kultiviranim jedinkama nego u prirodnim (Chen i sur. 2013). Također, u *O. sinensis* pronađeni su brojni derivati adenozina poput 2'-deoksiadenozin, 2',3'-dideoksiadenozin, kordicepin trifosfat i 3'-amino-3'-deoksiadenozin (Xiao i sur. 2013). Adenozin se iz jedinki *O. sinensis* može ekstrahirati organskim otapalom pri visokom tlaku ili vodenom ekstrakcijom pri sobnoj temperaturi ili vrelištu (Liu i sur. 2015). Adenozin je medijator brojnih signalnih puteva pri čemu može spriječiti rast stanica aktivacijom kaspaza u intrinzičnom i ekstrinzičnom putu apoptoze (Liu i sur. 2015).

### 5.3. Kordicepinska kiselina

Kordicepinska kiselina ili D-manitol je izomer kininske kiseline. Prirodni uzorci *O. sinensis* i uzroci uzgojeni u kulturi *in vitro* pokazuju isti prinos D-manitola (Singh i sur. 2009). Kordicepinska kiselina je diuretik, a pokazala se pogodnom i u tretiranju fibroze jetre (Liu i sur. 2015).

### 5.4. Steroli

Steroli su podgrupa steroida koja se javlja u biljkama, životinjama i gljivama. Imaju značajna fiziološka, ali i bioaktivna svojstva.

#### 5.4.1. Ergosterol

Ergosterol je prekursor vitamina D<sub>2</sub> (Xu i sur. 2016). Prinos ergosterola u gljivi *O. sinensis* određen je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) (Liu i sur. 2015). Ergosterol ima citotoksičnu i antimikrobnu aktivnost (Zheng i sur. 2013).

#### 5.4.2. H1-A

Spoj H1-A izoliran je iz *O. sinensis* i ima strukturu sličnu ergosterolu. Pokazao je utjecaj na proliferaciju mezangijskih stanica bubrega, kontrolu staničnog ciklusa i apoptozu što ukazuje da H1-A podešava stanične signalne puteve i mijenja ravnotežu između proliferacije i apoptoze mezangijskih stanica (Yang i sur. 2003). Yang i sur. (2003) pretpostavili su da je ovakav bioaktivni učinak posljedica inhibicije fosforilacije proteina Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*, Bcl-2) i Bcl-XL (engl. *B-cell lymphoma-extra large*, Bcl-XL) koji sudjeluju u kontroli apoptoze. Spoj H1-A ima i inhibicijski učinak na autoimunu bolest u MLR lpr/lpr miševa koji je uočen smanjenjem proizvodnje protutijela protiv dvolančane deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) (Yang i sur. 1999).

### 5.4.3. Ostali steroli

Drugi sterolni spojevi i njihovi derivati poput ergosteril-3-O- $\beta$ -D-glucopiranozid, 22,23-dihidroergosteril-3-O- $\beta$ -D-glucopiranozid, 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioksi-24(R)-metilkolesta-6,22-dien-3 $\beta$ -D-glucopiranozid i 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoksi-24(R)-metilkolesta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol izolirani su iz metanolnih ekstrakata i frakcije topljive u etil acetatu (Bok i sur. 1999; Matsuda i sur. 2009). Glikozilirani oblici spojeva pokazali su veću antitumorsku aktivnost tj. inhibiciju proliferacije stanica tumorskih staničnih linija *in vitro* (Bok i sur. 1999). Matsuda i sur. (2009) prepostavili su da je zabilježen *in vitro* učinak indukcije apoptoze u leukemijskim stanicama HL-60 posljedica aktivacije kaspaze-3/7.

## 5.5. Proteini, peptidi i aminokiseline

Iz gljive *O. sinensis* izolirani su brojni peptidi i aminokiseline koji pokazuju farmakološka svojstva. Neobrađeni proteini iz *O. sinensis* čine oko 30% ukupne mase i sastoje se od 18 aminokiselina (Hsu i sur. 2002). Proteini od interesa izolirani iz *O. sinensis* uglavnom su enzimi koji se mogu podijeliti na izvanstanične i unutarstanične enzime.

### 5.5.1 CSDNaza

Iz micelija gljive *O. sinensis*, precipitacijom s (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i serijom kromatografskih pročišćavanja, izolirana je kisela DNaza, unutarstanični enzim, koja je nazvana CSDNaza (Ye i sur. 2004). Ye i sur. (2004) odredili su masu enzima od 34 kDa i utvrđena je endonukleazna aktivnost prema dvolančanoj i jednolančanoj DNA koja rezultira stvaranjem 3'-fosfatnog kraja i 5'-OH kraja.

### 5.5.2. Serinska proteaza (OSP ili CSP)

Iako ima dvije skraćenice OSP (engl. *O. sinensis serine protease*, OSP) i CSP (engl. *C. sinensis serine protease*, CSP), riječ je o istom enzimu koji je pročišćen iz supernatanta kulture *O. sinensis*, a pokazao je fibrinolitičku aktivnost (Li i sur. 2007). Li i sur. (2007) utvrdili su da OSP ima jedan polipeptidni lanac mase 31 kDa te da je izvanstanična proteaza koja može cijepati fibrinogen, fibrin, kazein, goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumine*, BSA) i humani serumski albumin (engl. *human serum albumine*, HSA). Enzim cijepa A $\alpha$  lanac fibrinogena i  $\alpha$ -lanac fibrina, ali nije aktivator plasminogena što otvara mogućnost korištenja ove proteaze u tretiranju tromboze drugih kardiovaskularnih bolesti (Li i sur. 2007).

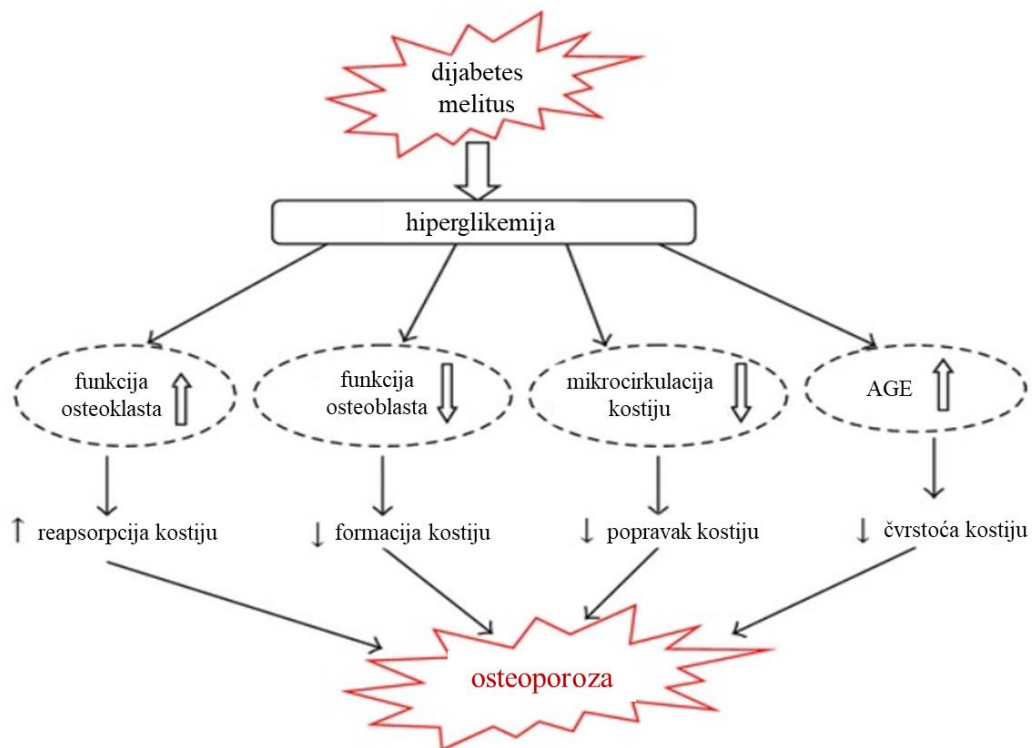


### 5.5.3. Triptofan

Triptofan, izoliran iz *O. sinensis*, je prekursor serotonina i važan je sudionik u fiziološkim procesima poput spavanja, pamćenja, socijalnog ponašanja, ali i bolestima poput depresije i nesanice (Rakhee i sur. 2021).

### 5.5.4. Kordimin

Kordimin je peptid izoliran iz gljive *O. sinensis* koji bi se potencijalno mogao koristiti u liječenju osteoporoze uzrokovane dijabetesom (Slika 3.) (Qi i sur. 2013). Istraživanje je provedeno na štakorima s dijabetesom te je pozitivan utjecaj na osteopeniju zabilježen povećanjem gustoće kostiju i mineralnog sastava kostiju. Pretpostavlja se da mehanizam djelovanja ide direktno preko slabljenja aktivnosti serumske alkalne fosfataze (engl. *serum alkaline phosphatase*, ALP) i kisele fosfataze otporne na tartarat (engl. *tartrate resistant acid phosphatase*, TRAP) te oporavkom stanica  $\beta$  gušterače i snižavanjem koncentracije glukoze u krvi što za posljedicu ima niži oksidativni stres (Qi i sur. 2013).



Slika 3. Mogući mehanizmi kojima dijabetes uzrokuje veći rizik pojave osteoporoze. Skraćenice: krajnji produkt napredne glikacije (engl. *advanced glycation end product*, AGE) (preuzeto i prilagođeno iz: Qi i sur. 2013).

### **5.5.5. Kordicedipeptid A**

Kordicedipeptid A je ciklopeptid izoliran iz tekuće kulture *O. sinensis*, a struktura mu je 3-acetamino-6-izobutil-2,5-dioksopiperazin (Liu i sur. 2015). Zabilježena je citotoksična aktivnost kordicedipeptida A na stanične linije L-929, A375 i HeLa (Jia i sur. 2005).

### **5.5.6. Kordiceamid A i B**

Kordiceamid A i B pripadaju spojevima aurantiamidima i izolirani su iz tekuće kulture *O. sinensis* (Jia i sur. 2009). Strukturne formule su N-benzoil-L-tirozinil-L-fenilalaninol acetate za kordiceamid A i N-benzoil-L-tirozinil-L-p-hidroksifenilalaninol acetat za kordiceamid B (Liu i sur. 2015). Zabilježena je citotoksična aktivnost oba spoja na stanične linije L-929, A375 i HeLa (Jia i sur. 2009).

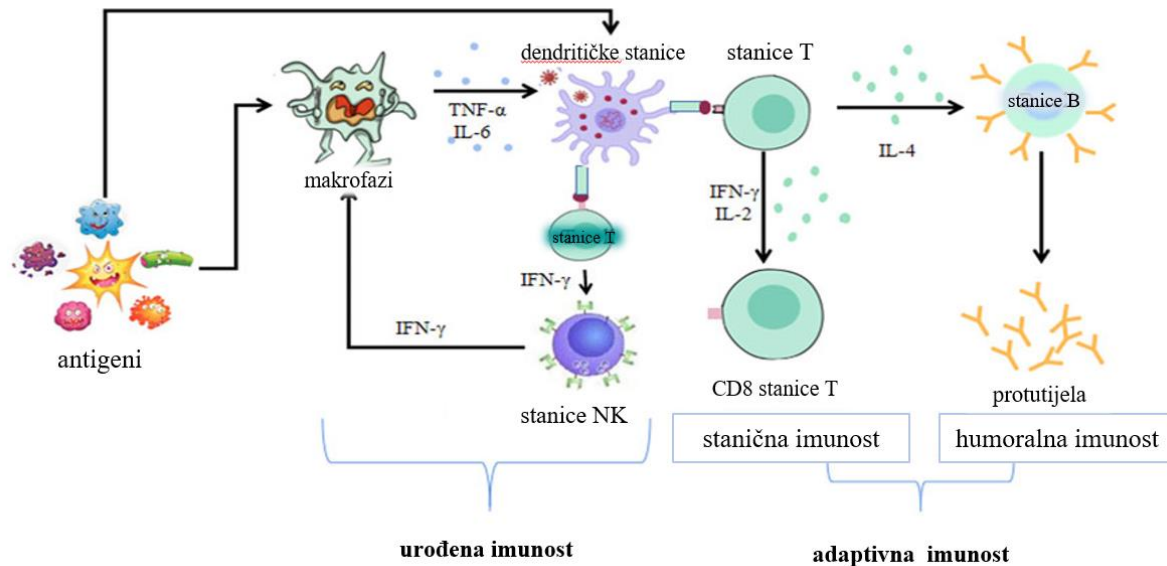
## **5.6. Kordisinini**

Kordisinini su izolirani iz micelija *O. sinensis* korištenjem serijskih alkoholnih ekstrakcija i n-heksana kao otapala (Yang i sur. 2011). Svi kordisinini (A – E) imaju protuupalno djelovanje, ali spoj 1-(5-hidroksimetil-2-furil)- $\beta$ -karbolin je pokazao najveću inhibiciju otpuštanja superoksidnih iona i elastaze iz ljudskih neutrofila u uvjetima *in vitro* (Yang i sur. 2011).

## 6. Farmakološka aktivnost *O. sinensis*

### 6.1. Imunomodulatorna aktivnost

Glavne uloge imunskog sustava su obrana od infekcije i tumora te održavanje antigenske homeostaze u organizmu. Kao i svaki drugi sustav, imunološki sustav prilagođen je svojoj ulozi te je podijeljen na urođenu i adaptivnu imunost (Slika 4.). Urođena imunost je nespecifična i čini prvu liniju obrane od potencijalne infekcije. Prva zapreka prodoru patogena su koža i epitel sluznica zajedno s izlučenim antimikrobnim tvarima. Ukoliko do infekcije ipak dođe, aktivira se druga linija obrane urođene imunosti čije su sastavnice: makrofazi/monociti, neutrofil, eozinofili, bazofili, dendritičke stanice (engl. *dendritic cell*, DC), prirodno ubilačke (engl. *natural killer*, NK) stanice te bjelančevine plazme koje uključuju sustav komplementa. Urođena imunost prepoznaje molekularne obrasce patogenih mikroorganizama (engl. *pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) i molekularne obrasce povezane s oštećenjem tkiva (engl. *damage-associated molecular pattern*, DAMP) pomoću receptora sličnih Tollu (engl. *Toll-like receptors*, TLR) na površini stanice koji posljedično potiču imunski odgovor (Akira i sur. 2006). Na površini osim receptora TLR nalaze se i lektinski receptori tipa C (engl. *C-type lectine receptor*, CLR) koji prepoznaju ugljikohidrate, a osim površinskih postoje i citosolni receptori koji prepoznaju PAMP i DAMP (Akira i sur. 2006). Urođena imunost aktivira adaptivnu imunost neposredno ili putem citokina. Citokini su proteini koji reguliraju i usklađuju odgovor stanica urođene i adaptivne imunosti. Sve stanice imunskog sustava izlučuju bar neke citokine. Adaptivna imunost može se podijeliti na staničnu imunost i humoralnu imunost. Stanična imunost posredovana je stanicama T (engl. *T cell*) koje mogu biti citotoksične (engl. *cytotoxic T cell*, T<sub>C</sub>) ili pomoćničke (engl. *helper T cell*, Th), a humoralna imunost posredovana je stanicama B (engl. *B cell*) koje proizvode protutijela. Osim unutarnjih faktora imunski odgovor mogu potaknuti ili suprimirati različiti imunomodulatori. Prilikom infekcije cilj je potaknuti imunološki sustav pojedinca u svrhu prebolijevanja bolesti, dok se kod kronične upale, autoimunih bolesti te transplantacije organa imunski odgovor suprimira kako bi se spriječilo oštećenje tkiva i organa. U brojnim istraživanjima pokazano je da *O. sinensis* može potaknuti, ali i utišati imunski odgovor regulirajući urođenu i adaptivnu imunost (Lin i Li 2011; Xu i sur. 2016; Das i sur. 2021).



Slika 4. Shematski prikaz imunskog odgovora urođene i adaptivne imunosti. Skraćenice: čimbenik tumorske nekroze  $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ), interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interleukin-6 (IL-6), interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), prirodnoćilake stanice (stanice NK) (preuzeto i prilagođeno iz: Jiang i sur. 2021).

Urođena imunost potiče adaptivnu imunost, stoga je nužno da imunostimulatori djeluju na stanice koje se prve susreću s antigenima i aktiviraju imunostni odgovor, a to su stanice urođene imunosti. Uglavnom su polisaharidi iz *O. sinensis* ti koji imaju imunomodulatorna svojstva, ali je uočena i imunomodulatorna aktivnost nukleinskih kiselina izoliranih iz *O. sinensis* (Xu i sur. 2016).

Polisaharid glukogalaktomanan UM01-S4 izoliran iz kulture *O. sinensis* potiče proliferaciju i fagocitoznu aktivnost makrofaga RAW 264.7 u uvjetima *in vitro* te potiče proizvodnju proupalnih citokina, interleukina (IL)-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10 i čimbenika tumorske nekroze  $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ) (Cheong i sur. 2016). Uočeno je i povećanje otpuštanja dušikova oksida (NO) te ekspresija inducibilne sintaze dušikovog oksida (Cheong i sur. 2016). Smatra se da je stimulatorna aktivnost UM01-S4 povezana s poticanjem MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) i NF- $\kappa$ B signalnog puta (Cheong i sur. 2016). Drugi tip polisaharida izoliran iz *O. sinensis* potaknuo je ekspresiju TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i proteina NF- $\kappa$ B te otpuštanje NO u makrofazima RAW 264.7 stimulacijom I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B (engl. *inhibitor of nuclear factor kappa B*, I $\kappa$ B) signalnog puta (He i sur. 2013). Transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B uključen je u transkripciju gena uključenih u upalni odgovor (Slika 5.) pri čemu sudjeluje u regulaciji imunskog odgovora (Gilmore 1999). Hu i sur. (2014) pokazali su da kordisinan, polisaharid izoliran iz *O. sinensis*, potiče ekspresiju proupalnih, ali i protuupalnih citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-

10 i TNF- $\alpha$ ) i kemokina uz povećanje proizvodnje NO. Frakcija kiselih polisaharida potaknula je ekspresiju TNF- $\alpha$ , IL-12 i iNOS te je smanjila ekspresiju IL-10 u Ana-1 makrofazima (Chen i sur. 2012). Također je zabilježena smanjena ekspresija manoznih receptora (engl. *mannose receptor*, MR) i receptora čistača (engl. *scavenger receptor*, SR) što upućuje na polarizaciju makrofaga iz M2 u M1 fenotip (Chen i sur. 2012). Chen i sur. (2012) smatraju da je promjena fenotipa makrofaga posljedica aktivacije NF- $\kappa$ B signalnog puta. Osim polisaharida, i nukleotidi (adenozin i gvanozin) izolirani iz *O. sinensis* imaju modulatoreni učinak na makrofage potičući otpuštanje IL-1 $\alpha$  i TNF- $\alpha$ , ali smanjujući otpuštanje NO (Yu i sur. 2007). Mehanizam iza ovakvog učinka ostaje nepoznat.

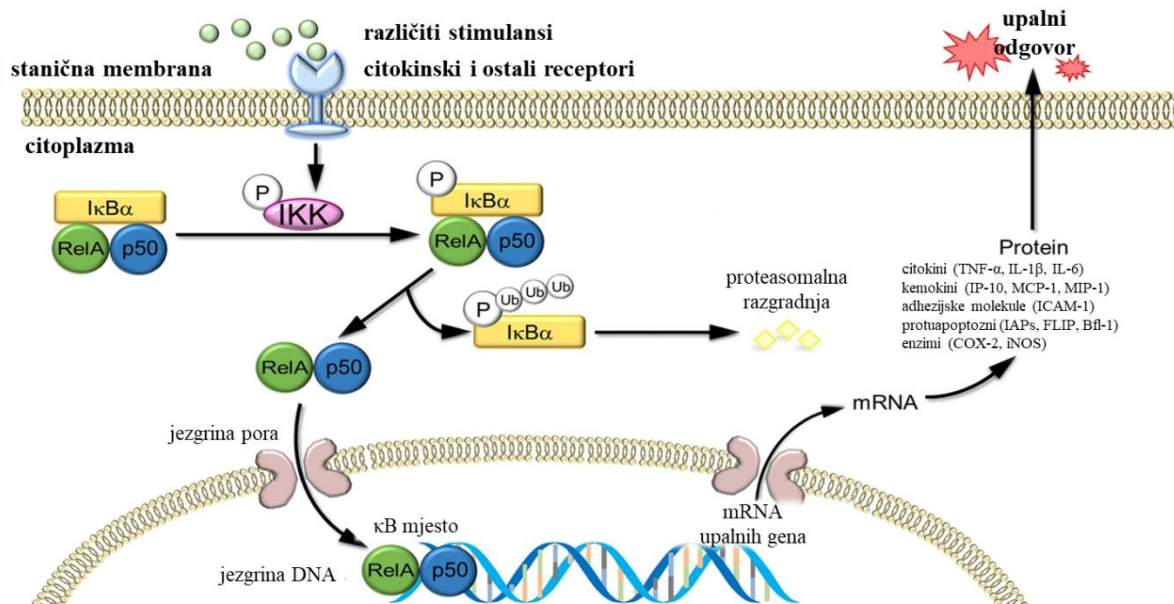
Osim stimulacije makrofaga RAW 264.7, njihovo izlaganje polisaharidu UM01 PS iz vrste *O. sinensis* uzrokuje diferencijaciju makrofaga u stanice slične dendritičkim stanicama te dovodi do ekspresije površinskih biljega (CD80, CD86, CD11c) na makrofazima specifičnih za antigen-predočne stanice (engl. *antigen-presenting cell*, APC) (Meng i sur. 2014). Meng i sur. (2014) također su ustanovili da izolirani UM01 PS potiče sazrijevanje dendritičkih stanica povećanjem ekspresije površinskih biljega CD80, CD86 i MHC II (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) te povećanom sposobnošću aktivacije proliferacije naivnih limfocita T iz slezene. Osim polisaharidima, stanice DC mogu se stimulirati molekulama DNA izoliranim iz *O. sinensis* (Xiao i sur. 2010). Xiao i sur. (2010) uočili su da DNA iz *O. sinensis* stimulira ekspresiju IL-12p40, TNF- $\alpha$  i CD40 u stanicama DC aktivirajući TLR-9 signalni put. Nadalje, uočeno je da utjecaj vodenog ekstrakta *O. sinensis* ovisi o fiziološkom stanju u kojem se nalaze dendritičke stanice (Li i sur. 2009). Naivne stanice DC tretirane ekstraktom *O. sinensis* pokazale su povećanu ekspresiju membranskih biljega (CD11c, CD205, CD40, CD80, CD83, CD86 i MHC-II) i proupalnih citokina IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6. Također, naivne DC stanice tretirane vodenim ekstraktom poticale su proliferaciju stanica T te su pritom promovirale Th1 fenotip. S druge strane, stanice DC aktivirane lipopolisaharidima i tretirane s *O. sinensis* pokazale su sniženje ekspresije biljega CD11c, CD205, CD40, CD80, CD83, CD86, MHC-II te proupalnih citokina (IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6). Tretman lipopolisaharidima (engl. *lipopolysaccharide*, LPS) aktiviranih stanica DC vodenim ekstraktom *O. sinensis* smanjio je mogućnost poticanja proliferacije stanica T i indukcije Th1 fenotipa, već je potaknuta indukcija Th2 fenotipa sniženjem ekspresije INF- $\gamma$  i povećanjem ekspresije IL-4. Mehanizam iza utjecaja *O. sinensis* na naivne i LPS-aktivirane stanice DC nije poznat, ali se pretpostavlja da uključuje signalizaciju preko receptora TLR i NF- $\kappa$ B signalnog puta (Li i sur. 2009).

Osim na urođenu imunost, ekstrakti iz vrste *O. sinensis* pokazuju učinak i na stanice adaptivne imunosti. Kordisinokan, polisaharid izoliran iz *O. sinensis*, potaknuo je proliferaciju stanica T i stimulirao je *in vitro* proizvodnju proupalnih interleukina IL-2, IL-6 i IL-8 (Cheung i sur. 2009). Sheng i sur. (2011) također su potaknuli proliferaciju stanica T egzopolisaharidima iz *O. sinensis*, a tretman je potaknuto i izlučivanje proupalnih citokina IL-2, INF- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ . Ekstrakti iz *O. sinensis* stimulirali su proliferaciju splenocita u ICR miševima imuniziranim s ovalbuminom (Wu i sur. 2006). Zabilježen je i porast razine ovalbumin specifičnih protutijela imunoglobulina IgG, IgG1 i IgG2b (engl. *immunoglobulin*, Ig) u serumu što ukazuje na poticanje humoralne imunosti (Wu i sur. 2006). Sistemsko farmakološko skeniranje u svrhu pronalaska adjuvansa iz gljive *O. sinensis* rezultiralo je razmatranjem kordicepina kao potencijalnog kandidata (Wang i sur. 2017). Kordicepin je u cjepivu protiv hepatitisa B poboljšao proizvodnju protutijela IgM i IgG, potaknuo je proliferaciju limfocita i proizvodnju citokina karakterističnih za stanice Th1 i Th2, diferencijaciju limfocita slezene u stanice Th i T<sub>C</sub> te je povećao ekspresiju površinskih biljega CD80 i CD86 na stanicama B što upućuje na češću aktivaciju stanica (Wang i sur. 2017).

*O. sinensis* pokazao je stimulatorni utjecaj na različite dijelove imunskog sustava, od urođene do adaptivne imunosti. Iz navedenih rezultata istraživanja jasno je da *O. sinensis* utječe na imunski sustav modulacijom NF- $\kappa$ B signalnog puta. Iako je većina istraživanja usredotočena na stimulaciju urođene imunosti, posebno makrofaga, ni utjecaj na adaptivnu imunost nije zanemariv. Smatra se da je urođena imunost stimulirana izoliranim polisaharidima posljedica aktivacije TLR i CLR receptora (Das i sur. 2021). Izolirani imunostimulatori imaju velik potencijal u liječenju imunodeficijencija i tumora te poticanje imunskog odgovora na svim razinama.

## **6.2. Protuupalna aktivnost**

Upala je nespecifičan sistemski odgovor imunskog sustava na patogene, oštećene stanice i toksične komponente, čija je svrha uklanjanje ozljede i indukcije procesa zacjeljivanja (Chen i sur. 2017). Upala je obrambeni mehanizam ljudskog tijela. Karakterizira ju crvenilo, oticanje i toplina te aktivacija upalnih medijatora koji u prevelikoj količini mogu izazvati poremećaje i upalne bolesti (Chen i sur. 2017). Mehanizam indukcije upale NF- $\kappa$ B signalnim putem prikazan je na Slici 5.



Slika 5. Shematski prikaz indukcije NF- $\kappa$ B signalnog puta uslijed upale. Skraćenice: inhibitor jezgrinog čimbenika kappa B (I $\kappa$ B), jezgrin čimbenik- $\kappa$ B p65 (engl. *nuclear factor- $\kappa$ B p65*, RelA), I $\kappa$ B kinaza  $\beta$  (engl. *I $\kappa$ B kinase  $\beta$* , IKK), ubikvitin (engl. *ubiquitin*, Ub), čimbenik tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), gama interferonom inducirani protein 10 (engl. *interferon gamma-induced protein 10*, IP-10), kemotaksijski protein monocita 1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1), upalni protein makrofaga 1 (engl. *macrophage inflammatory protein*, MIP-1), proteini inhibitori apoptoze (engl. *inhibitor of apoptosis*, IAP), FLICE inhibitorni protein (engl. *FLICE-inhibitory protein*, FLIP), Bcl-2 srodni protein A1 (engl. *Bcl-2-related protein A1*, Bfl-1), unutarstanična adhezijska molekula 1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1), ciklooksigenaza 2 (engl. *cyclooxygenase-2*, COX-2), inducibilna sintaza dušikovog oksida (iNOS) (prilagođeno i preuzeto iz: Liu i sur. 2017).

Ekstrakt micelija *O. sinensis* pokazao je protuupalno djelovanje sniženjem proizvodnje IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , iNOS, unutarstanične adhezijske molekule 1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1) i ciklooksigenaze 2 (engl. *cyclooxygenase-2*, COX-2), molekula koje sudjeluju u upalnim procesima (Liu i sur. 2011). Metanolni ekstrakt *O. sinensis* smanjio je otpuštanje upalnih medijatora dušikovog monoksida (NO), sniženjem ekspresije iNOS, TNF- $\alpha$  i IL-12 u makrofazima stimuliranima lipopolisaharidima i interferonom- $\gamma$  (engl. *interferon- $\gamma$* , IFN- $\gamma$ ) (Rao i sur. 2007). Mehanizmi koji dovode do supresije otpuštanja proupalnih citokina još uvijek su slabo poznati, ali se pretpostavlja je uzrok protuupalnog učinka inhibicija NF- $\kappa$ B signalnog puta važnog u upalnom odgovoru (Liu i sur. 2011, Chiou i Lin 2012).

Spojevi izolirani iz gljive *O. sinensis* kojima je utvrđeno protuupalno djelovanje su kordicepin, koridimin i kordisinini (Kim i sur. 2006; Jeong i sur. 2010; Yang i sur. 2011; Qian i sur. 2012). Kordicepin je pokazao protuupalno djelovanje sniženjem stvaranja dušikovog monoksida (NO) u makrofazima stimuliranim lipopolisaharidima (Kim i sur. 2006). Kim i sur. (2006) uočili su sniženje ekspresije iNOS, COX-2 i TNF- $\alpha$  što je pripisano supresiji aktivacije NF- $\kappa$ B signalnog puta (supresija fosforilacije I $\kappa$ B $\alpha$  i translokacije NF- $\kappa$ B) i inhibiciji fosforilacije kinaze Akt (engl. *protein kinase B*, PKB ili Akt) i kinaze p38. Jeong i sur. (2010) su na LPS-stimuliranim mikrogilja stanicama zamijetili slične rezultate tj. inhibiciju povećanog stvaranja NO, prostaglandina E<sub>2</sub> i prouplanih citokina nakon tretmana kordicepinom što je posljedica inaktivacije NF- $\kappa$ B signalnog puta degradacijom I $\kappa$ B $\alpha$ . Qian i sur. (2012) opazili su da tretman peptidom kordiminom smanjuje otpuštanje IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , citokina važnih u indukciji upale. Protuupalni učinak kordisinina objašnjen je u poglavlju 5.6. Kordisinini.

*O. sinensis*, osim stimulatornog učinka na imunosti sustav, ima i protuupalni učinak koji je najvjerojatnije posredovan modulacijom NF- $\kappa$ B signalnog puta. Protuupalni učinak *O. sinensis* otvara vrata mogućnosti upotrebe izoliranih bioaktivnih tvari u liječenju kroničnih upalnih bolesti. Nastavak istraživanja u području protuupalnih aktivnosti *O. sinensis* svakako je poželjan.

### **6.3. Antioksidativna aktivnost**

Oksidativni stres uzrokovan je reaktivnim kisikovim vrstama (ROS), preciznije peroksidom (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) te hidroksilnim i superoksidnim radikalima koji su izuzetno reaktivni te oštećuju nukleinske kiseline, proteine i lipidne membrane. Oksidativni stres uzrokuje ili pojačava učinak mnogih bolesti poput raka, dijabetesa, metaboličkih poremećaja, ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti (Pizzino i sur. 2017). U svrhu zaštite od ROS-ova stanice su razvile antioksidativne enzime katalazu (CAT), superoksid dismutazu (SOD) i glutation peroksidazu (engl. *glutathione peroxidase*, GPx) (Pizzino i sur. 2017). Antioksidativne tvari izolirane iz *O. sinensis* najvećim dijelom su polisaharidi, ali zabilježena je i antioksidativna aktivnost peptida i adenzina (Xu i sur. 2016).

Zou i sur. (2015) zabilježili su produženje životnog vijeka vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) nakon oralne administracije tekućeg ekstrakta *O. sinensis*. Ekstrakt *O. sinensis* povećao je aktivnost bakar-cink ovisne superoksid dismutaze (SOD1) i katalaze, ali nije doveo do povećanja ekspresije ovih enzima. Također, ekstrakt je inhibirao akumulaciju lipofuscina,



pigmenta povezanog sa starenjem, u vinskim mušicama. Korišteni ekstrakt *O. sinensis* može usporiti starenje poticanjem antioksidativne aktivnosti enzima SOD1 i CAT.

Polisaharid, molekularne mase 210 kDa, izoliran iz uzgojenog micelija *O. sinensis* kromatografijom na ionskim izmjenjivačima pokazao je antioksidativna svojstva u stanicama tretiranim vodikovim peroksidom (Li i sur. 2003). Predtretman stanica PC12 izoliranim polisaharidom smanjio je proizvodnju malondialdehida (engl. *malondialdehyde*, MDA), biljega oksidativnog stresa, i oslabio je inhibicijski učinak vodikovog peroksida na enzime SOD i GPx (Li i sur. 2003). Ostali antioksidativni učinci polisaharida mogu se pronaći u poglavlju 5.1.1. Izvanstanični polisaharidi.

Osim zaštite od oštećenja stanica i tkiva ROS-ovima, bioaktivne tvari iz *O. sinensis* pokazuju i svojstva koja usporavaju starenje što stvara velik potencijal za daljnja istraživanja.

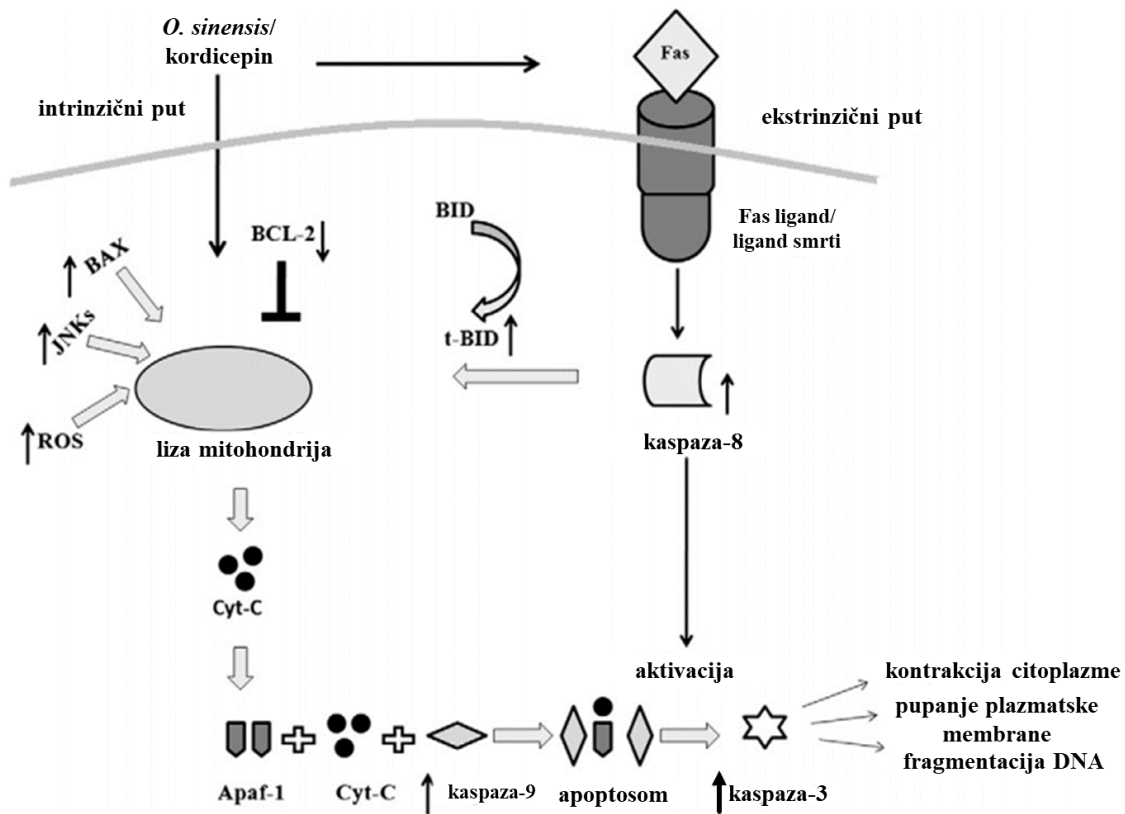
#### **6.4. Utjecaj na apoptozu**

Apoptoza ili programirana stanična smrt prirodan je proces koji održava homeostazu uklanjanjem oštećenih stanica ili nepotrebnih stanica prilikom razvoja. Apoptoza se može potaknuti intrinzičnim ili mitohondrijskim putem i ekstrinzičnim putem. Bioaktivne tvari iz *O. sinensis* mogu potaknuti, ali i inhibirati apoptozu (Shahed i sur. 2001; Tuli i sur. 2013).

Dokaza o inhibicijskom učinku *O. sinensis* na indukciju apoptoze ima malo. Shahed i sur. (2001) primijetili su da tretman vodenim ekstraktom *O. sinensis* dovodi do smanjenja ekspresije mRNA molekula (engl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) Fas receptora i FasL (engl. *Fas ligand*, FasL) liganda koji sudjeluju u Fas/FasL signalnom putu indukcije apoptoze. Budući da ROS-ovi mogu uzrokovati apoptozu aktivirajući mitohondrijski put indukcije apoptoze, antioksidativni spojevi izolirani iz *O. sinensis* (polisaharidi, peptidi, adenzin) mogli bi spriječiti apoptozu stanica uzrokovanu oksidativnim oštećenjima (Xu i sur 2016).

Kordicepin pokazuje značajan utjecaj na indukciju apoptoze u tumorskim staničnim linijama (Slika 6.) (Tuli i sur. 2013). Kordicepin može potaknuti apoptozu povećavajući ekspresiju c-Jun N-terminalne kinaze (engl. *c-Jun N-terminal kinases*, JNK), kinaze p38, pro-apoptoskih molekula B-stanični limfom 2 (engl. *B-cell lymphoma 2*, Bcl-2) te translokacijom Bcl-2 povezanog X proteina (engl. *Bcl-2-associated X protein*, Bax) i poticanjem otpuštanja citokroma c što posljedično aktivira kaspazu-9 i kaspazu-3 (Tuli i sur. 2013). Chen i sur. (2014) primijetili su da kordicepin može inducirati apoptozu u stanicama glioma povećanjem ekspresije i fosforilacije p53 što posljedično aktivira kaspazu-7 i potiče cijepanje poli-ADP-riboza polimeraze (engl. *poly(ADP-ribose) polymerase*, PARP), pri čemu je proces ovisan o

adenozinskom receptoru A2AR (engl. *adenosine 2A receptor*, A2AR). Enzim PARP sudjeluje u popravku DNA, transkripciji i modeliranju kromatina te je njegovo cijepanje korišteno kao biljeg apoptoze (Gobeil i sur. 2001).



Slika 6. Shematski prikaz indukcije intrinzičnog i ekstrinzičnog apoptotskog puta kordicepinom u tumorskim stanicama. Skraćenice: c-Jun N-terminalna kinaza (JNK), B-stanični limfom 2 (BCL-2), Bcl-2 povezani X protein (Bax), reaktivne vrste kisika (ROS), agonist BH3-reagirajuće domene (engl. *BH3-interacting-domain death agonist*, BID), krnji BID protein (engl. *truncated-BID*, t-BID), citokrom c (engl. *cytochrome c*), apoptozni proteazni aktivirajući čimbenik 1 (engl. *apoptotic protease activating factor 1*, Apaf-1) (preuzeto i prilagođeno iz: Tuli i sur. 2013)

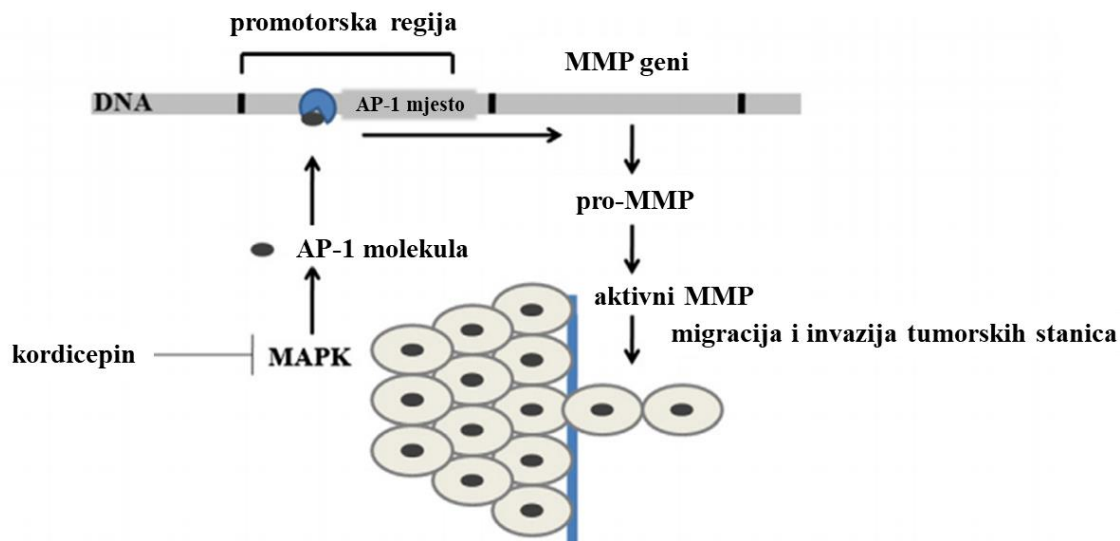
## 6.5. Antitumorska i antimetastazna aktivnost

Tumori nastaju poremećajem u kontroli staničnog ciklusa pri čemu dolazi do nekontrolirane diobe stanica. Mogu biti zloćudni ili dobroćudi. Zloćudni tumori mogu metastazirati tako što se dio tumorskih stanica odvoji te se krvlju ili limfom prenesu do drugih organa gdje se nastave dijeliti.

Ekstrakti izolirani iz *O. sinensis* pokazali su antitumorsku aktivnost inhibicijom proliferacije tumorskih stanica i sprječavanjem metastaziranja tumorskih stanica (Slika 7.) (Tuli i sur. 2013; Nakamura i sur. 2015). Glavni putevi kojima *O. sinensis* sprječava proliferaciju i migraciju tumorskih stanica je imunomodulacijom imunosnog odgovora, antioksidativnom aktivnošću i indukcijom apoptoze (Xu i sur. 2016). Tumori mogu uzrokovati pogreške u procesu sazrijevanju stanica DC što dovodi do imunosupresije i širenja tumora (Idoyaga i sur. 2007). Egzopolisaharid izoliran iz anamorfa *O. sinensis* stimulirao je sazrijevanje i aktivaciju stanica DC što je povezano s inhibicijom fosforilacije proteina STAT-3 (engl. *signal transducers and activators of transcription 3*, STAT3) (Song i sur. 2011). Egzopolisaharid je uzrokovao povećanje ekspresije citokina IL-12p40 i TNF- $\alpha$  te je povećao ekspresiju iNOS što za posljedicu ima aktivaciju stanica DC (Song i sur. 2011). Osim polisaharida iz *O. sinensis*, kordicepin je pokazao značajnu antitumorsku i antimetastaznu aktivnost (Tuli i sur. 2013; Nakamura i sur. 2015). Kordicepin inhibira proliferaciju tumorskih stanica stimulacijom adenozienskog receptora A3 koji aktivira signalni put Wnt (engl. *wingless/integrated*, Wnt) što uključuje aktivaciju kinaze glikogen sintaze-3 $\beta$  (engl. *glycogen synthase kinase-3 $\beta$* , GSK-3 $\beta$ ) i supresiju ciklina D<sub>1</sub> (Nakamura i sur. 2015).

Metaloproteinaze (engl. *metalloproteinase*, MMP) su cink i kalcij ovisne endopeptidaze koje razgrađuju izvanstanični matriks i omogućavaju migraciju/metastaziranje tumorskim stanicama (Tuli i sur. 2013). Kordicepin inhibira ekspresiju MMP-ova deaktivacijom aktivacijskog proteina-1 (engl. *activator protein-1*, AP-1) i inhibicijom signalnog puta MAPK (Slika 5.) (Noh i sur. 2010). Nakamura i sur. (2015) otkrili su da kordicepin može inhibirati aktivnost metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9 te ubrzati lučenje tkivnih inhibitora metaloproteinaza TIMP-1 i TIMP-2 (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinase*, TIMP) iz tumorskih stanica.

Antitumorska aktivnost *O. sinensis* rezultat je sinergističkog učinka imunomodulacije, antioksidativne aktivnosti i indukcije apoptoze. Postojanje više mehanizama koji sudjeluju u inhibiciji rasta i širenja tumora ostavlja veću mogućnost razvoju i preciznijoj regulaciji različitih tretmana kojima se liječe tumori.



Slika 7. Inhibitorni učinak kordicepina na migraciju tumora mehanizmom inhibicije MAPK signalnog puta koji preko AP-1 molekule kontrolira ekspresiju metaloproteinaza. Skraćenice: mitogenom-aktivirana proteinska kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK), aktivatorski protein 1 (engl. *activator protein 1*, AP-1), metaloproteinaza (MMP), deoksiribonukleinska kiselina (DNA) (preuzeto i prilagođeno: Tuli i sur. 2013).

## 6.6. Aktivnost protiv dijabetesa

Dijabetes je postao velik zdravstveni problem zemalja sa zapadnom prehranom i među deset je najčešćih uzroka smrti prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organisation*, WHO). Bolest se dijeli na dva tipa: tip I kada gušterača ne proizvodi inzulin i tip II kada je učinak proizvedenog inzulina smanjen.

Polisaharidi CS-F30 i CPS-1 izolirani iz *O. sinensis* imaju hipoglikemijski učinak (Kiho i sur. 1996; Li i sur. 2006). Nakon intraperitonealnog injektiranja polisaharida CS-F30 zabilježeno je sniženje razine glukoze, triglicerida i kolesterola u plazmi miševa s dijabetesom (Kiho i sur. 1996). Administracija CS-F30 prouzrokovala je povećanje aktivnosti jetrene glukokinaze, heksokinaze i glukoza-6-fosfat dehidrogenaze što kao posljedicu ima ubrzanje metabolizma glukoze i uzrok je antidiabetske aktivnosti (Kiho i sur. 1996). Polisaharid CPS-1 također je uzrokovao sniženje glukoze i povišenje inzulina u krvi aloksan-dijabetičnih miševa i streptozotocin-dijabetičnih štakora (Li i sur. 2006). Povišenje inzulina u krvi možda je posljedica stimulacije gušterače na sekreciju inzulina ili sniženje metabolizma inzulina što je prouzrokovano djelovanjem polisaharida CSP-1 (Li i sur. 2006). Osim hipoglikemijske aktivnosti, zabilježena je imunomodulacijska aktivnost praha *O. sinensis* koja suprimira

nastanak dijabetesa tipa I (Shi i sur. 2009). U NOD miševa (engl. *non-obese diabetic*, NOD) dijabetes tipa I prouzrokovan je disbalansom CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) (engl. *forkhead box P3*, FoxP3) regulatornih stanica T (Treg) i stanica Th17 koje proizvode IL-17 (Shi i sur. 2009). Shi i sur. (2009) uočili su da oralna primjena *O. sinensis* uzrokuje povećanje omjera Treg i Th17 stanica u slezeni i limfnim čvorovima gušterače što dovodi do uspostave balansa između regulatornih i efektorskih stanica T, doprinoseći time inhibiciji dijabetesa.

Učinak *O. sinensis* protiv dijabetesa posljedica je utjecaja na proizvodnju i metabolizam inzulina te na regulaciju imunskog sustava.

### **6.7. Zaštita kardiovaskularnog sustava**

Kardiovaskularne bolesti uzrokuju velik broj smrti i postaju ozbiljan zdravstveni problem u razvijenim zemljama. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji kardiovaskularne bolesti (ishemijska bolest srca, moždani udar) najčešći su uzrok smrti.

Aktivacija trombocita može dovesti do tromboze arterija kod kardiovaskularnih bolesnika. Polisaharid CME-1 izoliran iz *O. sinensis* pokazao je inhibiciju aktivacije trombocita preko aktivacije adenilil-ciklaze i sinteze cAMP-a (engl. *3',5'-cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) koji posljedično inaktiviraju unutarstanične signale, poput signalnog puta MAPK, koji dovode do aktivacije trombocita (Lu i sur. 2014). Drugi polisaharid CSP-1 izoliran iz vodenog ekstrakta *O. sinensis* pokazao je antihipertenzijsko svojstvo stimulacijom sekrecije vazodilatacijskog spoja dušikovog monoksida (NO) i smanjenjem razine endotelina-1, epinefrina, noradrenalina i angiotenzina II (Xiang i sur. 2016). Također zabilježena je i inhibicija povećanja razine TGF- $\beta$ 1 koji uzrokuje proliferaciju mišićnih stanica krvnih žila što dovodi do hipertenzije (Xiang i sur. 2016). Xiang i sur. (2016) zabilježili su i smanjenje razine protuupalnog medijatora C-reaktivnog proteina (engl. *C-reactive protein*, CRP). Ishijemijski moždani udar za posljedicu ima oštećenje tkiva uslijed nedostatka kisika i glukoze. Ekstrakt *O. sinensis* pokazao je zaštitni učinak *in vitro* na stanice podvrgnute hipoksiji i nedostatku glukoze, inhibirajući pritom mitohondrijski put indukcije apoptoze (Zou i sur. 2016).

### **6.8. Zaštita bubrega**

Bubrezi su parni organi koji filtriraju krv i eliminiraju štetne tvari proizvodnjom urina. Kronične bolesti bubrega su također u prvih deset vodećih uzroka smrti u svijetu prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji.

*O. sinensis* ima sposobnost supresije diferencijacije epitelnih u mezenhimske stanice sniženjem ekspresije i antagonističkim djelovanjem protiv profibrotičkog citokina TGF- $\beta$ 1 koji potiče TGF- $\beta$ 1/Smad signalni put što u konačnici dovodi do slabljenja cistične fibroze bubrega (Zhang i sur. 2012; Pan i sur. 2013; Yao i sur. 2014). Također, polisaharid CPS-2 izoliran iz *O. sinensis* poboljšava PDGF-BB-induciranu (engl. *platelet-derived growth factor BB*, PDGF-BB) proliferaciju stanica putem PDGF/ERK (engl. *extracellular-signal-regulated kinase*, ERK) i TGF- $\beta$ 1/Smad signalnih puteva što daje uvid u terapijsku aktivnost CPS-2 protiv kroničnog zatajenja bubrega (Wang i sur. 2014).

Transplantacija bubrega za posljedicu može imati odbacivanje organa ukoliko se ne primjenjuju imunosupresivi poput ciklosporina A (CS A), ali CS A pokazuje citotoksično djelovanje pri visokoj dozi (Ding i sur. 2009; Li i sur. 2009b). Upotreba *O. sinensis* omogućava primjenu niže doze CS A pri kojoj je zabilježen manji prodor mononuklearnih stanica u transplantat, niža razina CD4<sup>+</sup> stanica T, IL-2 i IFN- $\gamma$  u krvi i serumu što potvrđuje sinergistički učinak CS A i ekstrakta *O. sinensis* u zaštiti bubrega od štetnog djelovanja imunskog sustava (Ding i sur. 2009).

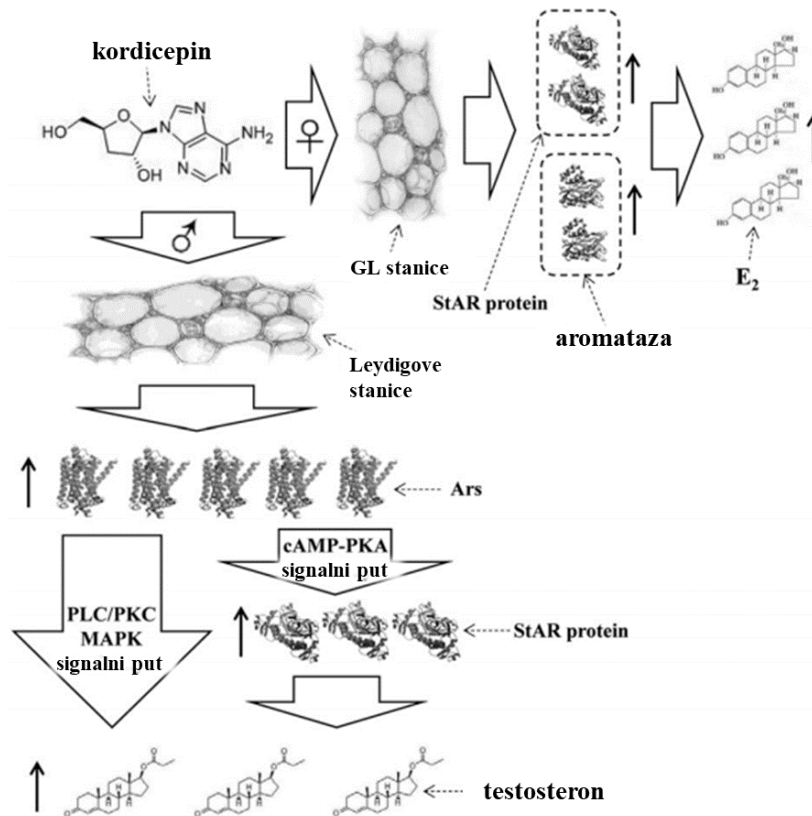
Vidljivo je da se farmakološka aktivnost zaštite bubrega djelovanjem *O. sinensis* očitava u slabljenju napredovanja cistične fibroze bubrega te inhibiciji odbacivanja transplantanata bubrega.

## 6.9. Utjecaj na reproduktivni sustava

Mnogi radovi analiziraju stimulacijski učinak *O. sinensis* na seksualnu funkciju i njegova svojstva kao afrodisijaka (Shashidhar i sur. 2013; Belwal i sur. 2019; Das i sur. 2021). Istraživanja su pokazala kako *O. sinensis* može potaknuti Leydigove stanice i granulosa-luteinske stanice na proizvodnju spolnih hormona putem nekoliko mehanizama (Slika 8.) (Huang i sur. 2004; Chen i sur. 2005; Leu i sur. 2011).

Chen i sur. (2005) uočili su da micelij gljive *O. sinensis* potiče steroidogenezu u Leydigovim tumorskim stanicama aktivirajući cAMP-PKA (engl. *protein kinase*, PKA) i PKC (engl. *protein kinase C*, PKC) signalni put što uzrokuje povećanje ekspresije steroidogenog akutnog regulatornog proteina (engl. *steroidogenic acute regulatory protein*, StAR). Kordicepin može stimulirati steroidogenezu unutarstaničnm PLC/PKC (engl. *phospholipase C*, PLC) i MAPK signalnim putem ili preko adenozijskih receptora koji aktiviraju cAMP-PKA-StAR signalni put (Leu i sur. 2011; Pao i sur. 2012). Osim na muški spolni sustav zabilježen je i utjecaj na steroidogenezu u ženskim granulosa-luteinskim stanicama (Huang i sur. 2004). Tretman

granuloza-luteinskih stanica micelijem *O. sinensis* uzrokovalo je povećanje  $17\beta$ -estradiola ( $E_2$ ) koji direktno utječe na kvalitetu sazrijevanja oocita putem povećanja ekspresije proteina StAR i aromataze (Huang i sur. 2004).



Slika 8. Shematski prikaz utjecaja kordicepina na reproduktivni sustav. Skraćenice: adenozijski receptori (Ars),  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), granuloza-luteinske stanice (GL stanice), mitogenom-aktivirana proteinska kinaza (MAPK), protein kinaza A (PKA), protein kinaza C (PKC), fosfolipaza C (PLC), steroidni akutni regulatorni protein (StAR), ciklički AMP (cAMP), povećanje sinteze pripadnih supstanci ( $\uparrow$ ) (preuzeto i prilagođeno iz: Xu i sur. 2016).

Poticanje sinteze i povišenje razine spolnih hormona uzrokovanih djelovanjem *O. sinensis* otvara mogućnost liječenja neplodnosti i drugih poremećaja reproduktivnog sustava.

## 6.10. Prevencija osteoporoze

Osteoporoza je bolest koštanog tkiva koju karakterizira smanjenje koštane mase i poremećena mikroarhitektura kostiju, što dovodi do smanjene čvrstoće kostiju i veće podložnosti prijelomima. Najčešći oblik osteoporoze je postmenopauzalna osteoporoza koja nastaje zbog nedostatka hormona estrogena (Klapač 2017).

Budući da *O. sinensis* može potaknuti stereidogenezu u jajnicima, otvara se mogućnost njegovog korištenja u prevenciji osteoporoze (Huang i sur. 2004). Qi i sur. (2011) dokazali su da tretman ovarijektomiziranih štakora kombinacijom *O. sinensis* i stroncija dovodi do smanjenja reapsorpcije kostiju, povećanja formiranja kostiju i proizvodnje 17 $\beta$ -estradiola, što za posljedicu ima prevenciju osteoporoze uzrokovane deficijencijom estrogena. Tretman ovarijektomiziranih štakora fitoestrogenima izoliranim iz *O. sinensis* uzrokovao je sniženje aktivnosti serumske alkaline fosfataze (engl. *serum alkaline phosphatase*, ALP), enzima TRAP i razine CTX (engl. *C-terminal crosslinked telopeptides of collagen type I*, CTX) i INF- $\gamma$  što upućuje na inhibiciju osteoporoze (Zhang i sur. 2014). Također, kordimin (opisano u poglavlju 5.5.4. Kordimin) izoliran iz *O. sinensis* može se koristiti u liječenju osteopenije uzrokovane dijabetesom direktnim utjecajem ili sniženjem hiperglikemije (Qi i sur. 2013).

### **6.11. Ostale farmakološke aktivnosti**

Osim dosad navedenih farmakoloških aktivnosti *O. sinensis* pokazao je adaptogensku i antimikrobnu aktivnost, potencijalnu zaštitu pluća i jetre, povećanje tolerancije hipoksije, povećanje izdržljivosti i seksualne funkcije (Shashidhar i sur. 2013; Xu i sur. 2016; Das i sur. 2021; Rakhee i sur. 2021). *O. sinensis* ima izuzetno širok spektar farmakoloških aktivnosti koje svakako zaslužuju daljnja istraživanja i interes znanstvenika.



## 7. Korištenje pripravaka gljive *O. sinensis* i zabilježene nuspojave

Najčešći pripravci *O. sinensis* su kapsule, tablete, granule te prah micelija ili čitave gljive. Na internetskoj stranici *Kala Health* opisan je postupak proizvodnje kapsula od gljive *O. sinensis*. Nakon uzgoja u uvjetima *in vitro*, micelij s plodištem se sakupi, liofilizira, samelje u prah te se sprema u kapsule. U Kini se mogu kupiti *Corbrin* kapsule od fermentiranog praha micelija gljive *O. sinensis* (Cs-C-Q80) koje na tržište stavlja *East China Pharmaceutical Group Limited Co., Ltd*, a odobrila ih je kineska administracija za hranu i lijekove (engl. *China Food and Drug Administration*, CFDA) (Dong i sur. 2015; Wu i sur. 2020b). Na tržištu se pod imenom Cordyceps tvrtke Swanson® zapravo prodaje ekstrakt micelija *P. hepiali* koji se svrstava u gljive izolirane iz divljih jedinki *O. sinensis*, a koje potencijalno imaju slična farmakološka svojstva (Jung i sur. 2019).

Korištenjem neprovjerenih pripravaka *O. sinensis* postoji opasnost trovanja živom (Wu i sur. 1996). Toksičnost same gljive *O. sinensis* još nije utvrđena niti o njoj, za sada, ima saznanja. Prema nekim radovima nuspojave nisu zabilježene (Chen i sur. 2013). Ipak primijećena je nemogućnost zgrušavanja krvi koja se pripisuje kordicepinu izoliranom iz *O. sinensis* (Cho i sur. 2007; Hatton i sur. 2018). Kordicepin inhibira povećanje koncentracije  $Ca^{2+}$  iona i sintezu tromboksana  $A_2$  u aktiviranim trombocitima sprječavajući njihovu agregaciju (Cho i sur. 2007). Također uzrokuje povećanje koncentracije negativnih endogenih regulatora agregacije trombocita cAMP/cGMP (engl. *3',5'-cyclic adenosine monophosphate*, cAMP; *3',5'-cyclic guanosine monophosphate*, cGMP) (Cho i sur. 2007). Nužan je nastavak istraživanja mehanizama postojećih nuspojava uzrokovanih pripravcima *O. sinensis* te otkrivanje novih nuspojava u svrhu sigurnije primjene *O. sinensis*.

## 8. Problematika istraživanja gljive *O. sinensis*

Sung i sur. (2007) su nakon filogenetičkih istraživanja preimenovali *Cordyceps sinensis* u *Ophiocordyceps sinensis*, što je danas službeno prihvaćeno ime (Lo i sur. 2013). Unatoč ovoj promjeni, *Cordyceps sinensis* se još uvijek koristi u literaturi (Meng i sur. 2014; Cheong i sur. 2016; Hatton i sur. 2018; Ma i sur. 2018; Jung i sur. 2019). Lo i sur. (2013) su u svojem radu naveli kako se od 1. siječnja 2013. godine dogovorno ukida klasifikacijski sistem koji koristi različita latinska imena za anamorf (nespolna reproduktivna faza) i telomorf (spolna reproduktivna faza) *O. sinensis*. Ime za anamorf, *H. sinensis*, tako je ukinuto i zamijenjeno s *O. sinensis*, ali niti ova promjena se ne poštuje (Dong i sur. 2015; Liu i sur. 2015; Das i sur. 2021).

Osim nepoštivanja klasifikacijskog sustava, Dong i Yao (2011) su zbog kontradiktornih rezultata istraživanja koja su uključivala *O. sinensis*, odlučili provjeriti vjerodostojnost korištenih materijala u periodu od 1998. do 2010. analizom uvjeta rasta *O. sinensis* u kulturi. Njihovo istraživanje na 152 analizirana rada pokazalo je da su 41 radu nedostajale detaljne informacije o korištenom materijalu, dok je u 64 rada fermentirani materijal bio nepouzdan (Dong i Yao 2011). Cheung i sur. (2005) upozorili su na nedostatak biljega za provjeru autentičnosti korištenih pripravaka i problematiku utvrđivanja korištenih vrsta roda *Cordyceps*.

Uz sve to gljive izolirane iz divljih jedinki *O. sinensis* (*Paecilomyces hepiali*, *Mortierella hepiali*, *Cephalosporium sinensis* i *Clonostachys rosea*) uvode dodatne probleme u već neorganiziranu klasifikaciju. Iako su spomenuti sojevi izolirani iz jedinki *O. sinensis* pronađenih u prirodi, na njih se ne treba gledati kao na istu vrstu niti ih se treba poistovjetiti s *O. sinensis*. Nakon niza istraživanja, samo se *H. sinensis* smatra anamorfom (nespolna reproduktivna faza) *O. sinensis*, dakle istom vrstom (Chen i sur. 2001; Liu i sur. 2001). Otkriće ovih sojeva gljiva dodatno je zakompliciralo već neorganiziranu sistematiku i upotrebu korištenih sojeva i vrsta u istraživanjima. Primjerice, Park i sur. (2015) u svojem sažetku navode kako su koristili *P. hepiali*, soj koji pripada rodu *Cordyceps* što je netočno jer pripada rodu *Paecilomyces*, ali je izoliran iz jedinki koje pripadaju rodu *Ophiocordyceps*.

Nepoštivanje klasifikacije i nomenklature od strane znanstvene zajednice dovodi do brojnih problema i nesporazuma. Nužno je uspostaviti bolje metode utvrđivanja sojeva korištenih u istraživanjima te istraživanja provoditi samo na provjerenim sojevima. Ovo su samo neki od problema s kojima se susreću znanstvenici pri istraživanju gljive *O. sinensis*.

## 9. Zaključak

*O. sinensis* je odavno našao primjenu u tradicionalnoj kineskoj medicini zbog brojnih pozitivnih učinaka koje ima na organizam, a danas se istražuje u svrhu otkrivanja novih farmakoloških aktivnosti i bioaktivnih tvari poput polisaharida, nukleotida, sterola i peptida, ali i širenja znanja o već otkrivenim bioaktivnim svojstvima *O. sinensis*. Zbog nedovoljnih prirodnih izvora i prevelike potražnje za gljivom *O. sinensis*, pribjeglo se uzgoju na gusjenicama, ali i u *in vitro* uvjetima koji su nakon niza istraživanja rezultirali uspješnim uzgojem čitave gljive. Današnja proizvodnja još uvijek ne zadovoljava potrebe tržišta na kojem se može naći niz kapsula, tableta, ali i drugih oblika pogodnih za konzumaciju zbog čega se treba okrenuti korištenju gljiva izoliranih iz divljih jedinki *O. sinensis* koje imaju slična farmakološka svojstva. Iako se ne zna puno o mogućoj toksičnosti ove gljive, ustanovljeno je da dugotrajno korištenje može dovesti do problema u zgrušavanju krvi.

U istraživanjima se koriste ekstrakti izolirani različitim otapalima poput etil acetata, etanola, metanola i vode koji pokazuju različit učinak na organizam. Brojni ekstrakti pokazali su imunomodulacijska, protuupalna, antitumorska, antioksidativna, ali i mnoga druga svojstva. Daljnja istraživanja potrebna su kako bi se ustanovili daljnji mehanizmi djelovanja bioaktivnih tvari, što bi omogućilo sustavnu kliničku primjenu ove gljive u tretiranju različitih bolesti.

Brojni problemi koji proizlaze u istraživanju bioaktivnosti gljive *O. sinensis* posljedica su korištenja neprovjerenih materijala i nepoštivanja standardizirane nomenklature što uzrokuje dodatnu konfuziju. Također, otkriće niza drugih vrsta gljiva sa sličnim farmakološkim svojstvima u divljim jedinkama *O. sinensis* nimalo ne olakšava već ionako neorganiziran način navođenja vrsta korištenih u znanstvenim radovima.

## 10. Literatura

- Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801.
- Belwal T., Bhatt I.D., Kashyap D., Sak K., Tuli H.S., Pathak R., Rawal R.S., Ghatnur S.M. (2019): *Ophiocordyceps sinensis*. U: Nabavi S.M., Silva A.S. (ur.) Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements, Academic Press, 527-537.
- Bok J.W., Lermer L., Chilton J., Klingeman H.G., Towers G.H. (1999): Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry* 51(7): 891-898.
- Buenz E.J., Bauer B.A., Osmundson T.W., Motley T.J. (2005): The traditional Chinese medicine *Cordyceps sinensis* and its effects on apoptotic homeostasis. *J Ethnopharmacol* 96(1-2): 19-29.
- Cao L., Ye Y., Han R. (2015): Fruiting Body Production of the Medicinal Chinese Caterpillar Mushroom, *Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes), in Artificial Medium. *Int J Med Mushrooms* 17(11): 1107-1112.
- Chen L., Deng H., Cui H., Fang J., Zuo Z., Deng J., Li Y., Wang X., Zhao L. (2017): Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9(6): 7204-7218.
- Chen Y.C., Huang Y.L., Huang B.M. (2005): *Cordyceps sinensis* mycelium activates PKA and PKC signal pathways to stimulate steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Int J Biochem Cell Biol* 37(1): 214-223.
- Chen J., Lee S., Cao Y., Peng Y., Winkler D., Yang D. (2010a): Ethnomycological use of medicinal chinese caterpillar fungus, *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) G. H. Sung et al. (ascomycetes) in Northern Yunnan Province, SW China. *Int J Med Mushrooms* 12: 427-434.
- Chen P.X., Wang S., Nie S., Marccone M. (2013): Properties of *Cordyceps sinensis*: A review. *J Funct Foods* 5(2): 550-569.
- Chen Y.Q., Wang N., Qu L.H., Li T.H., Zhang W.M. (2001): Determination of the anamorph of *Cordyceps sinensis* inferred from the analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacers and 5.8S rDNA. *Biochem Syst Ecol* 29: 597-607.

- Chen Y., Yang S.H., Hueng D.Y., Syu J.P., Liao C.C., Wu Y.C. (2014): Cordycepin induces apoptosis of C6 glioma cells through the adenosine 2A receptor-p53-caspase-7-PARP pathway. *Chem Biol Interact* 216: 17-25.
- Chen W., Yuan F., Wang K., Song D., Zhang W. (2012): Modulatory effects of the acid polysaccharide fraction from one of anamorph of *Cordyceps sinensis* on Ana-1 cells. *J Ethnopharmacol* 142(3): 739-745.
- Chen W., Zhang W., Shen W., Wang K. (2010b): Effects of the acid polysaccharide fraction isolated from a cultivated *Cordyceps sinensis* on macrophage *in vitro*. *Journal of Cellular Immunology* 262: 69-74.
- Cheong K.L., Meng L.Z., Chen X.Q., Wang L.Y., Wu D.T., Zhao J., Li S.P. (2016): Structural elucidation, chain conformation and immuno-modulatory activity of glucogalactomannan from cultured *Cordyceps sinensis* fungus UM01. *J Funct Foods* 25: 174-185.
- Cheung J. K. H., Li J., Cheung A.W.H., Zhu Y., Zheng K.Y.Z., Bi C.W.C., Duan R., Choi R.C.Y., Lau D.T.W., Dong T.T.X., Lau B., Tsim K.W.K. (2009): Cordysinocan, a polysaccharide isolated from cultured *Cordyceps*, activates immune responses in cultured T-lymphocytes and macrophages: Signaling cascade and induction of cytokines. *J Ethnopharmacol* 124: 61-68.
- Cheung J. K. H, Li S. P., Tsim K. W. K. (2005): Authentication and quality control of *Cordyceps sinensis*, a traditional Chinese medicine known as winter-worm summer-grass. *Orient Pharm Exp Med* 5(4): 262-271.
- Chiou Y.L., Lin C.Y. (2012): The extract of *Cordyceps sinensis* inhibited airway inflammation by blocking NF- $\kappa$ B activity. *Inflammation* 35(3): 985-993.
- Cho H.J., Cho J.Y., Rhee M.H., Park H.J. (2007): Cordycepin (3'-deoxyadenosine) inhibits human platelet aggregation in a cyclic AMP- and cyclic GMP-dependent manner. *Eur J Pharmacol* 558(1-3): 43-51.
- Das G., Shin H.S., Leyva-Gómez G., Prado-Audelo M.L.D., Cortes H., Singh Y.D., Panda M.K., Mishra A.P., Nigam M., Saklani S., Chaturi P.K., Martorell M., Cruz-Martins N., Sharma V., Garg N., Sharma R., Patra J.K. (2021): *Cordyceps* spp.: A Review on Its Immune-Stimulatory and Other Biological Potentials. *Front Pharmacol* 11: 602364.

- Ding C., Tian P., Jia L., Li Y., Ding X., Xiang H., Xue W., Zhao Y. (2009): The synergistic effects of *C. Sinensis* with CsA in preventing allograft rejection. *Front Biosci* 14: 3864-3871.
- Dong C., Guo S., Wang W., Liu X. (2015): Cordyceps industry in China, *Mycology* 6(2): 121-129.
- Dong C.H., Yao Y.J. (2005): Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture. *J Appl Microbiol* 99(3): 438-492.
- Dong C.H., Yao Y.J. (2011): On the reliability of fungal materials used in studies on *Ophiocordyceps sinensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38(8): 1027-1035.
- Gilmore T. (2019): The Rel/NF- $\kappa$ B signal transduction pathway: Introduction. *Oncogene* 18: 6842-6844.
- Gobeil S., Boucher C.C., Nadeau D., Poirier G.G. (2001): Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death Differ* 8(6): 588-594.
- Hatton M.N., Desai K., Le D., Vu A. (2018): Excessive postextraction bleeding associated with *Cordyceps sinensis*: a case report and review of select traditional medicines used by Vietnamese people living in the United States. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 126(6): 494-500.
- Hsu T.H., Shiao L.H., Hsieh C., Chang D.M. (2002): A comparison of the chemical composition and bioactive ingredients of the Chinese medicinal mushroom DongChongXiaCao, its counterfeit and mimic, and fermented mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Food Chem* 78(4): 463-469.
- Huang B.M., Hsiao K.Y., Chuang P.C., Wu M.H., Pan H.A., Tsai S.J. (2004): Upregulation of steroidogenic enzymes and ovarian 17 $\beta$ -estradiol in human granulosa-lutein cells by *Cordyceps sinensis* mycelium. *Biol Reprod* 70(5): 1358-1364.
- Idoyaga J., Moreno J., Bonifaz L. (2007): Tumor cells prevent mouse dendritic cell maturation induced by TLR ligands. *Cancer Immunol Immunother* 56: 1237-1250.
- Jeong J.W., Jin C.Y., Kim G.Y., Lee J.D., Park C., Kim G.D., Kim W.J., Jung W.K., Seo S.K., Choi I.W., Choi Y.H. (2010): Anti-inflammatory effects of cordycepin via suppression of inflammatory mediators in BV2 microglial cells. *Int Immunopharmacol* 10(12): 1580-1586.

Ji D.B., Ye J., Li C.L., Wang Y.H., Zhao J., Cai S.Q. (2009): Antiaging effect of *Cordyceps sinensis* extract. *Phytother Res* 23: 116–122.

Jia J.M., Ma X.C., Wu C.F., Wu L.J., Hu G.S. (2005): Cordycedipeptide A, a new cyclodipeptide from the culture liquid of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. *Chem Pharm Bull* 53(5): 582-583.

Jia J., Tao H., Feng B. (2009): Cordyceamides A and B from the Culture Liquid of *Cordyceps sinensis* (BERK.) SACC. *Chem Pharm Bull* 57: 99-101.

Jiang L., Zhang G., Li Y., Shi G., Li M. (2021): Potential Application of Plant-Based Functional Foods in the Development of Immune Boosters. *Front Pharmacol* 12: 637782.

Jung S.J., Jung E.S., Choi E.K., Sin H.S., Ha K.C., Chae S.W. (2019): Immunomodulatory effects of a mycelium extract of (*Paecilomyces hepiali*; CBG-CS-2): a randomized and double-blind clinical trial. *BMC Complement Altern Med* 19: 77.

Kiho T., Yamane A., Hui J., Usui S., Ukai S. (1996): Polysaccharides in fungi. XXXVI. Hypoglycemic activity of a polysaccharide (CS-F30) from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis* and its effect on glucose metabolism in mouse liver. *Biol Pharm Bull* 19(2): 294-296.

Kim H.G., Shrestha B., Lim S.Y., Yoon D.H., Chang W.C., Shin D.J., Han S.K., Park S.M., Park J.H., Park H.I., Sung J.M., Jang Y., Chung N., Hwang K.C., Kim T.W. (2006): Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF-kappaB through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur J Pharmacol* 545(2-3): 192-199.

Kinjo N., Zang M. (2001): Morphological and phylogenetic studies on *Cordyceps sinensis* distributed in southwestern China. *Mycoscience* 42: 567-574.

Klapač N. P. (2017): Osteoporoza - rizici, simptomi i liječenje. <https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/29335/Osteoporoza-rizici-simptomi-i-lijecenje.html>

Leu S.F., Poon S.L., Pao H.Y., Huang B.M. (2011): The *in vivo* and *in vitro* stimulatory effects of cordycepin on mouse leydig cell steroidogenesis. *Biosci Biotechnol Biochem* 75(4):723-731.

Li H.P., Hu Z., Yuan J.L., Fan H.D., Chen W., Wang S.J., Zheng S.S., Zheng Z.L., Zou G.L. (2007): A novel extracellular protease with fibrinolytic activity from the culture supernatant of *Cordyceps sinensis*: purification and characterization. *Phytother Res* 21(12): 1234-1241.

- Li S. P., Li P., Dong T. T., Tsim K. W. (2001): Anti-oxidation activity of different types of natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps mycelia*. *Phytomedicine* 8: 207–212.
- Li R., Jiang X., Guan H. (2009a): Optimization of mycelium biomass and exopolysaccharides production by *Hirsutella sp.* In submerged fermentation and evaluation of exopolysaccharides antibacterial activity. *Afr J Biotechnol* 9: 195-202.
- Li Y., Xue W.J., Tian P.X., Ding X.M., Yan H., Pan X.M., Feng X.S. (2009b): Clinical application of *Cordyceps sinensis* on immunosuppressive therapy in renal transplantation. *Transplant Proc* 41(5): 1565-1569.
- Li S.P., Zhang G.H., Zeng Q., Huang Z.G., Wang Y.T., Dong T.T., Tsim K.W. (2006): Hypoglycemic activity of polysaccharide, with antioxidation, isolated from cultured *Cordyceps mycelia*. *Phytomedicine* 13(6): 428-433.
- Li S.P., Zhao K.J., Ji Z.N., Song Z.H., Dong T.T., Lo C.K., Cheung J.K., Zhu S.Q., Tsim K.W. (2003): A polysaccharide isolated from *Cordyceps sinensis*, a traditional Chinese medicine, protects PC12 cells against hydrogen peroxide-induced injury. *Life Sci* 73(19): 2503-2513.
- Lin B., Li S.P. (2011): *Cordyceps* as an Herbal Drug. U: Benzie I.F.F., Wachtel-Galor S. (ur.) *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd edition. Boca Raton, CRC Press, 73-106.
- Liu X.J., Guo Y.L., Yu Y.X., Zeng W. (1989): Isolation and identification of the anamorphic state of *Cordyceps sinensis* (Berk.). *Sacc. Acta Mycol Sin* 8: 35-40.
- Liu Z., Li P., Zhao D., Tang H., Guo J. (2011): Anti-inflammation effects of *Cordyceps sinensis* mycelium in focal cerebral ischemic injury rats. *Inflammation* 34(6): 639-644.
- Liu Y., Wang J., Wang W., Zhang H., Zhang X., Han C. (2015): The Chemical Constituents and Pharmacological Actions of *Cordyceps sinensis*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015: 575063.
- Liu Z.Y., Yao Y.J., Liang Z.Q., Liu A.Y., Pegler D.N., Chase M.W. (2001): Molecular evidence for the anamorph–teleomorph connection in *Cordyceps sinensis*. *Mycol Res* 105: 827-832.
- Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.C. (2017): NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2: 17023.



- Lo H.C., Hsieh C., Lin F.Y., Hsu T.H. (2013): A Systematic Review of the Mysterious Caterpillar Fungus *Ophiocordyceps sinensis* in Dong-ChongXiaCao (Dōng Chóng Xià Cǎo) and Related Bioactive Ingredients. *J Tradit Complement Med* 3(1): 16-32.
- Lu W.J., Chang N.C., Jayakumar T., Liao J.C., Lin M.J., Wang S.H., Chou D.S., Thomas P.A., Sheu J.R. (2014): Ex vivo and in vivo studies of CME-1, a novel polysaccharide purified from the mycelia of *Cordyceps sinensis* that inhibits human platelet activation by activating adenylate cyclase/cyclic AMP. *Thromb Res* 134(6): 1301-1310.
- Ma M.W., Gao X.S., Yu H.L., Qi X., Sun S.Q., Wang D. (2018): *Cordyceps sinensis* Promotes the Growth of Prostate Cancer Cells. *Nutr Cancer* 70(7): 1166-1172.
- Meng L.Z., Feng K., Wang L.Y., Cheong K.L., Nie H., Zhao J., Li S.P. (2014): Activation of mouse macrophages and dendritic cells induced by polysaccharides from a novel *Cordyceps sinensis* fungus UM01. *J Funct Foods* 9: 242-253.
- Noh E.M., Youn H.J., Jung S.H., Han J.H., Jeong Y.J., Chung E.Y., Jung J.Y., Kim B.S., Lee S.H., Lee Y.R., Kim J.S. (2010): Cordycepin inhibits TPA-induced matrix metalloproteinase-9 expression by suppressing the MAPK/AP-1 pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Mol Med* 25(2): 255-260.
- Pan M.M., Zhang M.H., Ni H.F., Chen J.F., Xu M., Phillips A.O., Liu B.C. (2013): Inhibition of TGF- $\beta$ 1/Smad signal pathway is involved in the effect of *Cordyceps sinensis* against renal fibrosis in 5/6 nephrectomy rats. *Food Chem Toxicol* 58: 487-494.
- Pao H.Y., Pan B.S., Leu S.F., Huang B.M. (2012): Cordycepin stimulated steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells through the protein kinase C Pathway. *J Agric Food Chem* 60(19): 4905-4913.
- Park S.Y., Jung S.J., Ha K.C., Sin H.S., Jang S.H., Chae H.J., Chae S.W. (2015): Anti-inflammatory effects of *Cordyceps* mycelium (*Paecilomyces hepiali*, CBG-CS-2) in Raw264.7 murine macrophages. *Orient Pharm Exp Med* 15(1): 7-12.
- Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto A. (2017): Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 8416763.
- Qi W., Yan Y.B., Wang P.J., Lei W. (2011): The co-effect of *Cordyceps sinensis* and strontium on osteoporosis in ovariectomized osteopenic rats. *Biol Trace Elem Res* 141(1-3): 216-223.

- Qi W., Zhang Y., Yan Y.B., Lei W., Wu Z.X., Liu N., Liu S., Shi L., Fan Y. (2013): The Protective Effect of Cordymin, a Peptide Purified from the Medicinal Mushroom *Cordyceps sinensis*, on Diabetic Osteopenia in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 985636.
- Qian G., Pan G.F., Guo J.Y. (2012): Anti-inflammatory and antinociceptive effects of cordymin, a peptide purified from the medicinal mushroom *Cordyceps sinensis*. *Natural Product Research* 26(24): 2358–2362.
- Rakhee, Mishra J., Yadav R.B., Meena D.K., Arora R., Sharma R.K., Misra K. (2021): Novel formulation development from *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) for management of high-altitude maladies. *3 Biotech* 11(1): 9.
- Rao Y.K., Fang S.H., Tzeng Y.M. (2007): Evaluation of the anti-inflammatory and anti-proliferation tumoral cells activities of *Antrodia camporata*, *Cordyceps sinensis*, and *Cinnamomum osmophloeum* bark extracts. *J Ethnopharmacol* 114: 78-85.
- Shashidhar M.G., Giridhar P., Udaya Sankar K., Manohar B. (2013): Bioactive principles from *Cordyceps sinensis*: A potent food supplement - A review. *J Funct Foods* 5(3): 1013-1030.
- Sheng L., Chen J., Li J., Zhang W. (2011): An exopolysaccharide from cultivated *Cordyceps sinensis* and its effects on cytokine expressions of immunocytes. *Appl Biochem Biotechnol* 163(5): 669-678.
- Singh R., Negi P.S., Ahmed Z. (2009): Genetic variability assessment in medicinal caterpillar fungi *Cordyceps* spp. (Ascomycetes) in central himalayas, India. *Int J Med Mushrooms* 11: 185-189.
- Steinkraus D.C., Whitfield J.B. (1994): Chinese caterpillar fungus and world record runners. *Am Entomol* 40(4): 235-239.
- Sheng L., Chen J., Li J., Zhang W. (2011): An exopolysaccharide from cultivated *Cordyceps sinensis* and its effects on cytokine expressions of immunocytes. *Appl Biochem Biotechnol* 163(5): 669-678.
- Sung G.H., Hywel-Jones N.L., Sung J.M., Luangsa-Ard J.J., Shrestha B., Spatafora J.W. (2007): Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol* 57: 5-59.

- Tuli H.S., Sharma A.K., Sandhu S.S., Kashyap D. (2013): Cordycepin: A Bioactive Metabolite with Therapeutic Potential. *Life Sci* 93, 863-869.
- Wang J., Liu R., Liu B., Yang Y., Xie J., Zhu N. (2017): Systems Pharmacology-based strategy to screen new adjuvant for hepatitis B vaccine from Traditional Chinese Medicine *Ophiocordyceps sinensis*. *Sci Rep* 7: 44788.
- Wang Y., Liu D., Zhao H., Jiang H., Luo C., Wang M., Yin H. (2014): *Cordyceps sinensis* polysaccharide CPS-2 protects human mesangial cells from PDGF-BB-induced proliferation through the PDGF/ERK and TGF- $\beta$ 1/Smad pathways. *Mol Cell Endocrinol* 382(2): 979-988.
- Wang S.H., Yang W.B., Liu Y.C., Chiu Y.H., Chen C.T., Kao P.F., Lin C.M. (2011a): A potent sphingomyelinase inhibitor from *Cordyceps* mycelia contributes its cytoprotective effect against oxidative stress in macrophages. *J Lipid Res* 52(3): 471-479.
- Wang X.L. i Yao Y.J. (2011b): Host insect species of *Ophiocordyceps sinensis*: a review. *ZooKeys* 127: 43-59.
- Winkler D. (2008): Yartsa Gunbu (*Cordyceps sinensis*) and the Fungal Commodification of Tibet's Rural Economy. *Econ Bot* 62: 291-305.
- Wong Y.Y., Moon A., Duffin R., Barthet-Barateig A., Meijer H.A., Clemens M.J., de Moor C.H. (2010): Cordycepin inhibits protein synthesis and cell adhesion through effects on signal transduction. *J Biol Chem* 285(4): 2610-2621.
- Wu D.T., Meng L.Z., Wang L.Y., Lv G.P., Cheong K.L., Hu D.J., Guan J., Zhao J., Li S.P. (2014): Chain conformation and immunomodulatory activity of a hyperbranched polysaccharide from *Cordyceps sinensis*. *Carbohydr Polym* 110: 405-414.
- Wu H., Rao Z.C., Cao L., De Clercq P., Han R.C. (2020a): Infection of *Ophiocordyceps sinensis* Fungus Causes Dramatic Changes in the Microbiota of Its Thitarodes Host. *Front Microbiol* 11: 577268.
- Wu Y., Sun H., Qin F., Pan Y., Sun C. (2006): Effect of various extracts and a polysaccharide from the edible mycelia of *Cordyceps sinensis* on cellular and humoral immune response against ovalbumin in mice. *Phytother Res* 20(8): 646-652.
- Wu J., Yan W., Wu X., Hong D., Lu X., Rao Y. (2020b): Protective effects of Corbrin Capsule against permanent cerebral ischemia in mice. *Biomed Pharmacother* 121: 109646.

- Wu T. N., Yang K. C., Wang C. M., Lai J. S., Ko K. N., Chang P. Y., Liou S. H. (1996): Lead poisoning caused by contaminated *Cordyceps*, a Chinese herbal medicine: two case reports. *Sci Total Environ* 182: 193-195.
- Wu J., Zhang Q., Leung P. (2007): Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Cordyceps sinensis* mycelium on various cancer cells in culture and B16 melanoma in C57BL/6 mice. *Phytomedicine* 14: 43-49.
- Xiang F., Lin L., Hu M., Qi X. (2016): Therapeutic efficacy of a polysaccharide isolated from *Cordyceps sinensis* on hypertensive rats. *Int J Biol Macromol* 82: 308-314.
- Xiao G., Miyazato A., Abe Y., Zhang T., Nakamura K., Inden K., Tanaka M., Tanno D., Miyasaka T., Ishii K., Takeda K., Akira S., Saijo S., Iwakura Y., Adachi Y., Ohno N., Yamamoto N., Kunishima H., Hirakata Y., Kaku M., Kawakami K. (2010): Activation of myeloid dendritic cells by deoxynucleic acids from *Cordyceps sinensis* via a Toll-like receptor 9-dependent pathway. *Cell Immunol* 263(2): 241-250.
- Xiao J.H., Qi Y., Xiong Q. (2013): Nucleosides, a valuable chemical marker for quality control in traditional Chinese medicine *Cordyceps*. *Recent Pat Biotechnol* 7(2): 153-166.
- Xing X.K., Guo S.X. (2008): The structure and histochemistry of sclerotia of *Ophiocordyceps sinensis*, *Mycologia* 100(4): 616-625.
- Xu J., Huang Y., Chen X.X., Zheng S.C., Chen P., Mo M.H. (2016): The Mechanisms of Pharmacological Activities of *Ophiocordyceps sinensis* Fungi. *Phytother Res* 30(10): 1572-1583.
- Yamaguchi Y., Kagota S., Nakamura K., Shinozuka K., Kunitomo M. (2000): Antioxidant activity of the extracts from fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis*. *Phytother Res* 14: 647-649.
- Yan J.K., Wang W.Q., Wu J.Y. (2014): Recent advances in *Cordyceps sinensis* polysaccharides: Mycelial fermentation, isolation, structure, and bioactivities: A review. *J Funct Foods* 6: 33-47.
- Yang L.Y., Chen A., Kuo Y.C., Lin C.Y. (1999): Efficacy of a pure compound H1-A extracted from *Cordyceps sinensis* on autoimmune disease of MRL lpr/lpr mice. *J Lab Clin Med* 134(5): 492-500.

- Yang F.Q., Ge L., Yong J.W., Tan S.N., Li S.P. (2009): Determination of nucleosides and nucleobases in different species of *Cordyceps* by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 50: 307-314.
- Yang M.L., Kuo P.C., Hwang T.L., Wu T.S. (2011): Anti-inflammatory Principles from *Cordyceps sinensis*. *J Nat Prod* 74(9): 1996–2000.
- Yang F.Q., Li D.Q., Feng K., Hu D.J., Li S.P. (2010): Determination of nucleotides, nucleosides and their transformation products in *Cordyceps* by ion-pairing reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1217(34): 5501-5510.
- Yao X., Meran S., Fang Y., Martin J., Midgley A., Pan M.-M., Liu B.C., Cui S.W., Phillips G.O., Phillips, A. O. (2014): *Cordyceps sinensis*: In vitro anti-fibrotic bioactivity of natural and cultured preparations. *Food Hydrocoll* 35: 444-452.
- Yu L., Zhao J., Zhu Q., Li S.P. (2007): Macrophage biospecific extraction and high performance liquid chromatography for hypothesis of immunological active components in *Cordyceps sinensis*. *J Pharm Biomed Anal* 44(2): 439-43.
- Yue K., Ye M., Lin X., Zhou Z. (2013): The artificial cultivation of medicinal Caterpillar Fungus, *Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes): a review. *Int J Med Mushrooms* 15(5): 425-434.
- Zhang X.L., Bi-Cheng L., Al-Assaf S., Phillips G. O., Phillips A. O. (2012): *Cordyceps sinensis* decreases TGF- $\beta$ 1 dependent epithelial to mesenchymal transdifferentiation and attenuates renal fibrosis. *Food Hydrocoll* 28(1): 200–212.
- Zhang G., Huang Y., Bian Y., Wong J.H., Ng T.B., Wang H. (2006): Hypo-glycemic activity of the fungi *Cordyceps militaris*, *Cordyceps sinensis*, *Tricholoma mongolicum*, and *Omphalia lapidescens* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Appl Micro Biotech* 72(6): 1152-1156.
- Zhang Y., Li E., Wang C., Li Y., Liu X. (2012): *Ophiocordyceps sinensis*, the flagship fungus of China: terminology, life strategy and ecology. *Mycology* 3(1): 2-10.
- Zhang D.W., Wang Z.L., Qi W., Zhao G.Y. (2014): The effects of *Cordyceps sinensis* phytoestrogen on estrogen deficiency-induced osteoporosis in ovariectomized rats. *BMC Complement Altern Med* 14: 484.

Zheng J., Wang Y., Wang J., Liu P., Li J., Zhu W. (2013): Antimicrobial ergosteroids and pyrrole derivatives from halotolerant *Aspergillus flocculosus* PT05-1 cultured in a hypersaline medium. *Extremophiles* 17(6): 963-971.

Zhang Q., Wu J., Hu Z., Li D. (2004): Induction of HL-60 apoptosis by ethyl acetate extract of *Cordyceps sinensis* fungal mycelium. *Life Sci* 75: 2911–2919.

Zhong S., Pan H., Fan L., Lv G., Wu Y., Parmeswaran B., Pandey A., Soccol C.R. (2009): Advances in research of polysaccharides in *Cordyceps species*. *Food Technol Biotechnol* 47: 304-312.

Zou Y., Liu Y., Ruan M., Feng X., Wang J., Chu Z., Zhang Z. (2015): *Cordyceps sinensis* oral liquid prolongs the lifespan of the fruit fly, *Drosophila melanogaster*, by inhibiting oxidative stress. *Int J Mol Med* 36(4): 939-946.

Zou Y.X., Liu Y.X., Ruan M.H., Zhou Y., Wang J.C., Chu Z.Y. (2016): *Cordyceps sinensis* Oral Liquid Inhibits Damage Induced by Oxygen and Glucose Deprivation in SH-SY5Y Cells. *Altern Ther Health Med* 22(2): 37-42.

[https://www.kalahealth.eu/en\\_US/cordyceps-90-capsules](https://www.kalahealth.eu/en_US/cordyceps-90-capsules) (pristupljeno 29. 6. 2021.)

<https://www.swansonvitamins.com/swanson-premium-cordyceps-600-mg-120-caps>  
(pristupljeno 29. 6. 2021.)

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (pristupljeno 11.7.2021.)

<https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/29335/Osteoporoza-rizici-simptomi-i-lijecenje.html> (pristupljeno 12.7.2021.)

## 11. Sažetak

*Ophiocordyceps sinensis* je entomopatogena gljiva s dugom poviješću primjene u tradicionalnoj kineskoj medicini, ali je i danas dostupan sve veći broj pripravaka ove gljive. Brojni uočeni pozitivni učinci na ljudski organizam povećali su interes za primjenom i istraživanjem bioaktivnih tvari prisutnih u ovoj vrsti. Zbog velike potražnje došlo je do razvoja umjetnog uzgoja i kultivacije *in vitro*. Napredak istraživanja doveo je do korištenja brojnih ekstrakata koji su pokazali imunomodulacijska, protutumorska, protuupalna, antioksidativna, ali i mnoga druga svojstva. Značajnu pažnju privukao je imunomodulacijski potencijal izoliranih bioaktivnih tvari. Brojni problemi i nesporazumi u istraživanjima rezultat su korištenja neprovjerenih materijala i nepoštivanja nomenklature. Usprkos problemima u istraživanju, *O. sinensis* ima velik potencijal primjene u tretiranju pacijenata s poremećajima funkcioniranja imunskog sustava, ali i drugih bolesti.

## 12. Summary

*Ophiocordyceps sinensis* is an entomoparasitic fungus with a long history of use in traditional Chinese medicine, but an increasing number of remedies from this fungus are available today. Numerous observed positive effects on the human organism have increased interest in the application and research of bioactive substances present in this species. Due to high demand, artificial and *in vitro* cultivation have been developed. Advances in research have led to the use of various extracts that have shown immunomodulatory, antitumor, anti-inflammatory, antioxidant and many other properties. Significant attention has been drawn to the immunomodulatory potential of isolated bioactive substances. Numerous problems and misunderstandings in the research are the result of the use of unverified materials and lack of compliance with the nomenclature. Despite the problems in research, *O. sinensis* has great potential for application in the treatment of patients with immune system dysfunction and other diseases.



## 13. Životopis

### Obrazovanje

2006. – 2014. Osnovna škola Većeslava Holjevca, Zagreb
2014. – 2018. V. gimnazija, Zagreb
2018. – 2021. Preddiplomski sveučilišni studij molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

### Nagrade, priznanja i stipendije

2018. – 2021. STEM stipendija Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske
2018. *A certificate of Merit at the 29th International Biology Olympiad Shahid Beheshti University*
- Priznanje Ministarstvo znanosti i obrazovanja za izniman uspjeh postignut na Državnoj maturi u školskoj godini 2017./2018.
- Pohvalnica Ministarstvo znanosti i obrazovanja za sudjelovanje u znanju na državnom Natjecanju iz biologije 2017.

### Projekti i ljetne škole

- voditelj radionice u sklopu događaja Noć biologije (Dan i noć na PMF-u)
- *Rhizome foundations summer course*; Split, 15.7.2019 – 28.7.2019