



HORIZONTY ANATÓMIE

**Eliška Kubíková
Peter Weismann
Jana Jakimová**



**Anatomický ústav LF UK v Bratislave
Slovenská anatomická spoločnosť
Dekan LF UK v Bratislave**

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
LEKÁRSKA FAKULTA**

Eliška Kubíková
Peter Weismann
Jana Jakimová

HORIZONTY ANATÓMIE

**2018
UNIVERZITA KOMENSKÉHO BRATISLAVA**

© Vydavateľstvo PROPRINT s.r.o., Bratislava, 2018

Editori: doc. MUDr. Eliška Kubíková, PhD.
 doc. RNDr. Peter Weismann, PhD.
 MUDr. Bc. Jana Jakimová

Recenzenti: doc. MUDr. Luděk Vrtík, CSc.
 doc. MUDr. Augustín Prochotský, CSc.

ISBN: 978-80-89747-10-8
EAN: 9788089747108

VPLYV ETANOLOVÝCH HUBOVÝCH EXTRAKTOV *G. LUCIDUM* A *H. ERINACEUM* NA RAST MLADÝCH A STARÝCH BUNIEK

(Effect of *G. lucidum* and *H. erinaceum* ethanol mushroom extract on the growth of young and aging cells)

Mária Janubová, Ingrid Žitňanová

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta Univerzity
Komenského v Bratislave maria.janubova@fmed.uniba.sk

Súhrn

V procese starnutia významnú úlohu zohráva starnutie buniek, tzv. bunková senescencia. Hľadanie efektívneho spôsobu na odstránenie senescentných buniek z organizmu a/alebo spomalenie ich tvorby je preto dôležitým smerom výskumu. *Ganoderma (G.) lucidum* a *Hericiium (H.) erinaceum* patria medzi medicínsky významné huby. Obe sú už dlho používané v tradičnej medicíne v Číne a iných ázijských krajinách. V našej práci sme sa zamerali na sledovanie vplyvu etanolových extraktov z *G. lucidum* a *H. erinaceum* na rast mladých buniek a buniek starých, ktoré vykazujú známky senescencie. Zistili sme, že po 72 a 96 hodinovej inkubácii starých buniek s etanolovým extraktom *H. erinaceum* dochádzalo k výraznému poklesu viability starých buniek.

Kľúčové slová

Ganoderma lucidum, *Hericiium erinaceus*, MRC-5 bunková línia, starnutie, senescencia

Summary

Cellular senescence is considered to play a substantial role during aging. Thus searching for an effective method how to eliminate senescent cells and/or decelerate their formation is an important part of current research. *Ganoderma (G.) lucidum* a *Hericiium (H.) erinaceum* belong to medicinal mushrooms. Both have been used in traditional medicine in China and other countries in Asia since ancient times. We focused on the effect of ethanol extract of *G. lucidum* and *H. erinaceum* on growth of young and aging cells which exhibit hallmarks of senescence. We found out that incubation of aging cells with the ethanol extract of *H. erinaceum* for 72 and 96 hours lead to a significant decrease in cell viability.

Keywords

Ganoderma lucidum, *Hericiium erinaceus*, MRC-5 cell line, aging, senescence

Úvod

V procese starnutia významnú úlohu zohráva starnutie buniek, tzv. bunková senescencia. Senescencia je ireverzibilné zastavenie bunkového cyklu sprevádzané zmenami v bunkovej morfológii a fyziológii (1). Rozlišujeme dva typy senescencie. Prvým typom je replikatívna senescencia, ktorá vzniká v dôsledku skracovania telomér (2, 3). Druhým typom je stresom indukovaná senescencia, čo je odpoveď bunky na rôzne formy stresu ako je oxidačný stres,

poškodenie DNA, dysfunkcia mitochondrií, nadexpresia onkogénov, nukleolárny stres spôsobený inhibítormi RNA polymerázy I a porušenie epigenetickej regulácie (4-9).

Senescentné bunky sa akumulujú v rôznych tkanivách a orgánoch so zvyšujúcim sa vekom jedince a tiež sa nachádzajú v tkanivách a orgánoch postihnutých chorobami spojenými so starnutím ako je ateroskleróza, artritída a Alzheimerova choroba (10).

Experimenty na myšiach, ktoré sledovali vplyv eliminácie senescentných buniek (buniek, ktoré exprimovali gén p16/INK4a) z organizmu viedli k potlačeniu poklesu fyziologických funkcií a tumorigenézy, k oddialeniu nástupu chorôb spojených so starnutím alebo zlepšeniu ich progresie a k predĺženiu celkovej dĺžky života (11, 12) (Baker et al., 2011; Baker et al., 2016). Hľadanie efektívneho spôsobu na odstránenie senescentných buniek z organizmu a/alebo spomalenie ich tvorby je preto dôležitým smerom výskumu.

Ganoderma (G.) lucidum a *Hericium (H.) erinaceum* patria medzi medicínsky významné huby. *G. lucidum* známa aj pod názvom reiši je už dlho používaná ako prostriedok na udržanie zdravia a dosiahnutie dlhovekosti v Číne a iných ázijských krajinách (13). Moderné analýzy preukázali prítomnosť viacerých typov bioaktívnych látok v jej plodniciach. Medzi tieto látky patria polysacharidy podporujúce imunitný systém, triterpenoidy, ktoré pôsobia protizápalovo a antialergicky a germánium zvyšujúce príjem kyslíka krvou (14). Výskumy tiež ukázali, že triterpenoidy izolované z *G. lucidum* inhibujú rast nádorových buniek a indukujú apoptózu v týchto bunkách (15). *H. erinaceum* podobne ako *G. lucidum* je používaná už mnoho storočí v tradičnej čínskej medicíne. Extrakty z *H. erinaceum* majú antioxidačné účinky, regulujú hladinu tukov v krvi a znižujú hladinu cukru v krvi (14). Z bioaktívnych látok, ktoré huba obsahuje sú najvýznamnejšie fenoly – hericenóny (A, B, C, D, E, F, G a H) a polysacharidy. Hericenóny C, D a E stimulujú tvorbu nervového rastového faktora (16), hericenóny A a B a polysacharidy vykazujú antitumorovú aktivitu (17, 18).

V našej práci sme sa zamerali na sledovanie vplyvu etanolových extraktov z *G. lucidum* a *H. erinaceum* na rast mladých buniek a buniek starých, ktoré vykazujú známky senescencie ako je zvýšená aktivita β -galaktozidázy asociovanej so senescenciou, zvýšená hladina proteínu p21 a p16 a zväčšený tvar buniek.

Materiál a metódy

Príprava 2,5% extraktu G. lucidum v 40 % etanole: Extrakt z *G. lucidum* sme pripravili zmiešaním 3 g rozdrvenej huby so 120 ml 40% etanolu a zmes sme nechali macerovať v tme 20 dní. Po ich uplynutí sme zmes centrifugovali pri 5200 g 10 minút, supernatant sme odliali do novej skúmavky, prefiltrovali v sterilnom boxe cez 0,2 μ m filter do sterilnej skúmavky a uskladnili pri 4°C.

Príprava 2,5% extraktu H. erinaceum v 40 % etanole: Pri príprave extraktu z *H. erinaceum* sme postupovali rovnako ako pri príprave extraktu z *G. lucidum*.

Kultivácia bunkovej línie MRC-5: Bunkovú líniu MRC-5 (ľudské pľúcne fetálne fibroblasty) sme kultivovali v MEM médiu, ktoré obsahovalo L-glutamín, neesenciálne aminokyseliny a 10% fetálne telľacie sérum. Bunky sme pasážovali 1x týždenne pomocou 0,25% trypsín-EDTA roztoku.

Sledovanie vplyvu etanolových hubových extraktov na viabilitu MRC-5 bunkovej línie: Vplyv hubových extraktov na viabilitu MRC-5 bunkovej línie sme sledovali pomocou metyltiazol tetrazoliového (MTT) testu. Bunky sme kultivovali v 96-jamkových platničkách, pričom sme vysievali 1600 buniek na jamku v objeme 100 μ l MEM média. Po 24 hodinovej kultivácii pri 37°C a 6% CO₂ sme k bunkám pridali etanolový extrakt z *G. lucidum* alebo etanolový extrakt z *H. erinaceum* v rôznych riedeniach (20 – 2000x) v 100 μ l MEM média na jamku a bunky sme kultivovali 3 dni pri 37°C a 6% CO₂. Po uplynutí 3 dní sme k bunkám pridali 20 μ l MTT roztoku (5 mg/ml v 1 x PBS) do každej jamky a inkubovali sme 4 hodiny pri 37°C a 6% CO. Po skončení inkubácie sme odsali médium a do každej jamky sme pridali 200 μ l

DMSO a platničku sme na 5 minút umiestnili na trepačku. Absorbanciu sme merali pomocou mikropatničkového spektrofotometra (firma, štát) pri 490 nm.

Sledovanie vplyvu etanolových hubových extraktov na rast mladých a starých buniek: Vplyv hubových extraktov na proliferáciu mladých a starých buniek sme sledovali pomocou metyltiazol tetrazoliového (MTT) testu. Modelom pre mladé bunky boli bunky v 9. pasáži a modelom pre staré bunky boli bunky v 22. pasáži. Bunky v 22. pasáži vykazujú známky senescencie ako je zvýšená aktivita β -galaktozidázy asociovanej so senescenciou, zvýšená hladina proteínu p21 a p16 a zväčšený tvar buniek. Bunky sme kultivovali v 96-jamkových platničkách, pričom v prípade pasáže 9 sme vysievali 1600 buniek na jamku v objeme 100 μ l MEM média a v prípade pasáže 22 sme vysievali 3200 buniek na jamku v objeme 100 μ l MEM média. K bunkám sme hneď pridali etanolový extrakt z *G. lucidum* alebo z *H. erinaceum* vo vybranom riedení v 100 μ l MEM média na jamku a bunky sme kultivovali 1, 2, 3 alebo 4 dni pri 37°C a 6% CO₂. Po uplynutí 1, 2, 3 alebo 4 dní sme k bunkám pridali 20 μ l MTT roztoku (5 mg/ml v 1 x PBS) do každej jamky a inkubovali sme 4 hodiny pri 37°C a 6% CO₂. Po skončení inkubácie sme odsali médium a do každej jamky sme pridali 200 μ l DMSO a platničku sme na 5 minút umiestnili na trepačku. Absorbanciu sme merali pomocou mikropatničkového spektrofotometra pri 490 nm.

Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Štatistická analýza bola uskutočnená pomocou nepárového, dvojstranného *Student t-testu*. Hodnota $p < 0,05$ bola považovaná za štatisticky významnú.

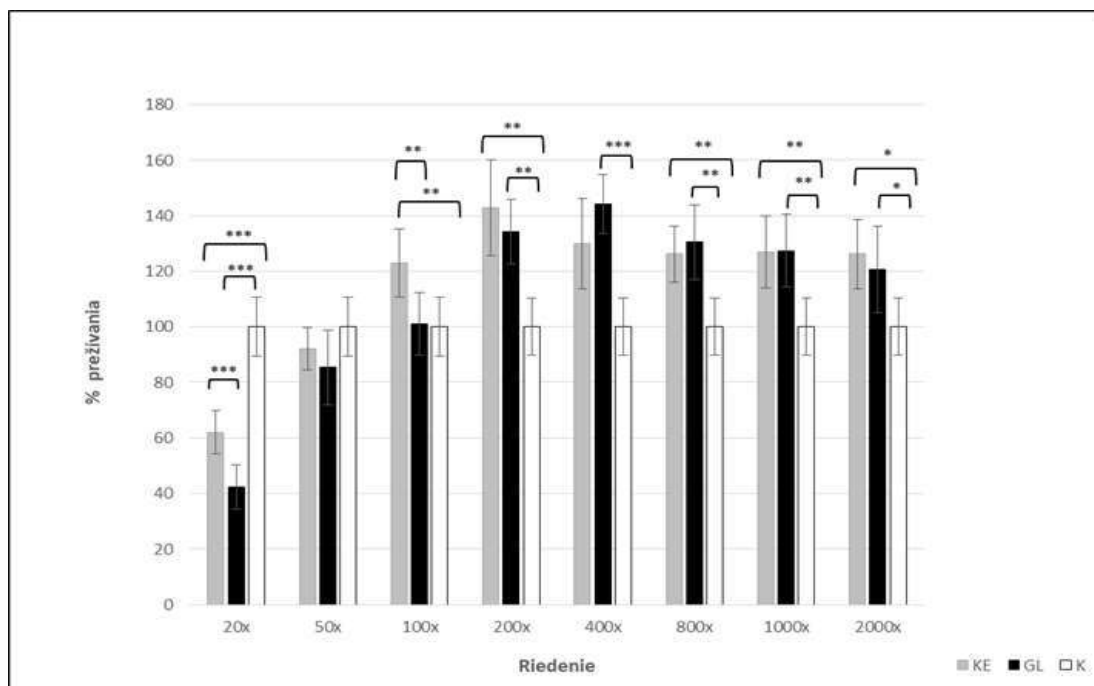
Výsledky

Sledovanie vplyvu etanolových hubových extraktov na viabilitu MRC-5 bunkovej línie

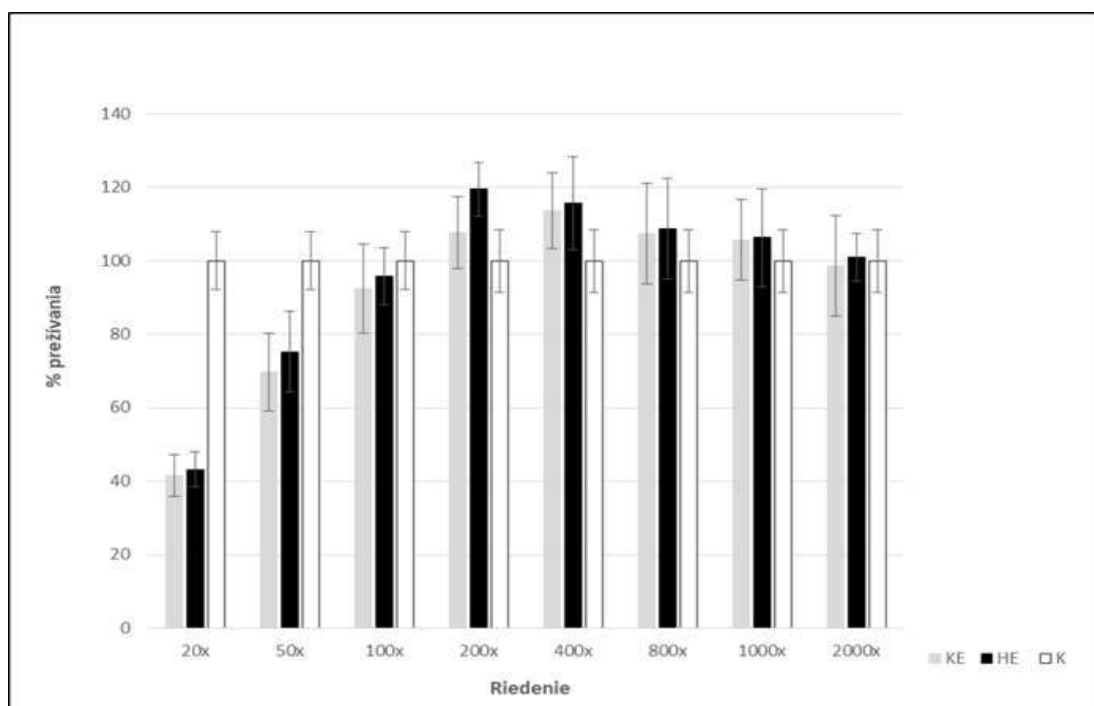
Vplyv etanolových hubových extraktov na viabilitu MRC-5 bunkovej línie sme sledovali pomocou MTT testu. V experimente sme bunky inkubovali s etanolovými hubovými extraktmi, ktoré boli riedené 20, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 alebo 2000-krát v kultivačnom médiu.

V prípade inkubácie buniek s etanolovým extraktom *G. lucidum* sme zistili, že k poklesu viability buniek oproti neovplyvnenej kontrole nedochádza pri riedení extraktu 200-krát a viac, nakoľko výsledky získané pri ovplyvnení buniek nižšími riedeniami (50-krát a 100-krát) extraktu neboli štatisticky významné a výsledky získané pri riedení extraktu 20-krát nám odhalili významný pokles viability buniek až o 58% (Obr. 1). Pridanie etanolového extraktu *G. lucidum* do kultivačného média riedeného 200-krát až 2000-krát navyše vedie k zvýšeniu celkovej viability buniek oproti neovplyvnenej kontrole. Zvýšenie viability buniek oproti neovplyvnenej kontrole bolo najvýznamnejšie pri 400-násobnom riedení etanolového extraktu *G. lucidum* (až o 44%), na základe čoho sme sa rozhodli toto riedenie použiť v ďalších experimentoch.

V prípade inkubácie buniek s etanolovým extraktom *H. erinaceum* sme zistili, že k poklesu viability buniek oproti neovplyvnenej kontrole nedochádza iba pri riedení extraktu 200-krát. Navyše pridanie etanolového extraktu *H. erinaceum* riedeného 200-krát k bunkám vedie k zvýšeniu viability buniek o 20% oproti neovplyvnenej kontrole. Výsledky získané pri ovplyvnení buniek väčšími riedeniami etanolového extraktu *H. erinaceum* (400- 800- 1000- alebo 2000-krát) neboli štatisticky významné (Obr. 2). Bunky ovplyvnené nižšími riedeniami etanolového extraktu *H. erinaceum* (20- 50- alebo 100-krát) mali zníženú viabilitu oproti neovplyvnenej kontrole. Viabilita buniek bola tým nižšia, čím menšie bolo riedenie etanolového extraktu *H. erinaceum*. Na základe získaných výsledkov sme sa rozhodli v ďalších experimentoch pracovať s 200-násobne riedeným etanolovým extraktom *H. erinaceum*.



Obr. 1 Vplyv 2,5% extraktu *G. lucidum* v 40% etanole na viabilitu MRC-5 bunkovej línie. Bunky boli inkubované 3 dni s etanolovým extraktom *G. lucidum*, ktorý bol riedený 20, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 alebo 2000-krát v kultivačnom médiu. Výsledky sú priemer 2 experimentov $\pm$ SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. K – kontrola bez pridania etanolu alebo etanolového extraktu *G. lucidum*, KE – kontrola ovplyvnená 40% etanolom v uvedených riedeniach, GL – bunky ovplyvnené extraktom *G. lucidum* v uvedených riedeniach.



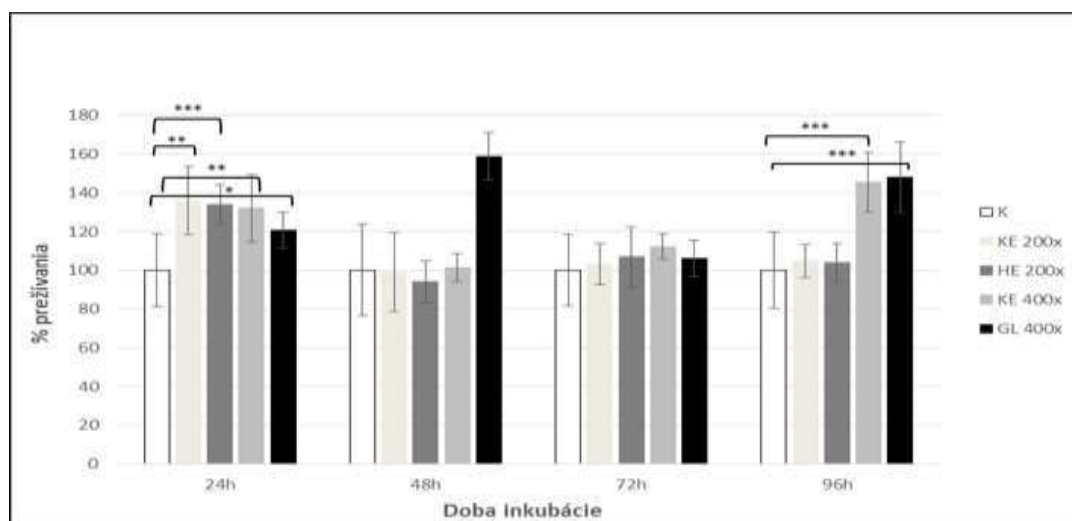
Obr. 2 Vplyv 2,5% extraktu *H. erinaceum* v 40% etanole na viabilitu MRC-5 bunkovej línie. Bunky boli inkubované 3 dni s etanolovým extraktom *H. erinaceum*, ktorý bol riedený 20, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 alebo 2000-krát v kultivačnom médiu. Výsledky sú priemer 2 experimentov $\pm$ SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. K – kontrola bez pridania etanolu alebo etanolového extraktu *H. erinaceum*, KE – kontrola ovplyvnená 40% etanolom v uvedených riedeniach, HE – bunky ovplyvnené extraktom *H. erinaceum* v uvedených riedeniach.

Sledovanie vplyvu etanolových hubových extraktov na rast mladých a starých buniek

Vplyv etanolových hubových extraktov na rast mladých a starých buniek sme sledovali pomocou MTT testu. Modelom pre mladé bunky boli bunky v 9. pasáži a modelom pre staré bunky boli bunky v 22. pasáži, ktoré vykazujú známky senescencie ako je zvýšená aktivita SA β -galaktozidázy asociovanej so senescenciou, zvýšená hladina proteínu p21 a p16 a zväčšený tvar buniek. V experimente sme bunky inkubovali so 400-krát riedeným etanolovým extraktom *G. lucidum* v kultivačnom médiu alebo 200-krát riedeným extraktom *H. erinaceum* v kultivačnom médiu po dobu 24, 48, 72 alebo 96 hodín.

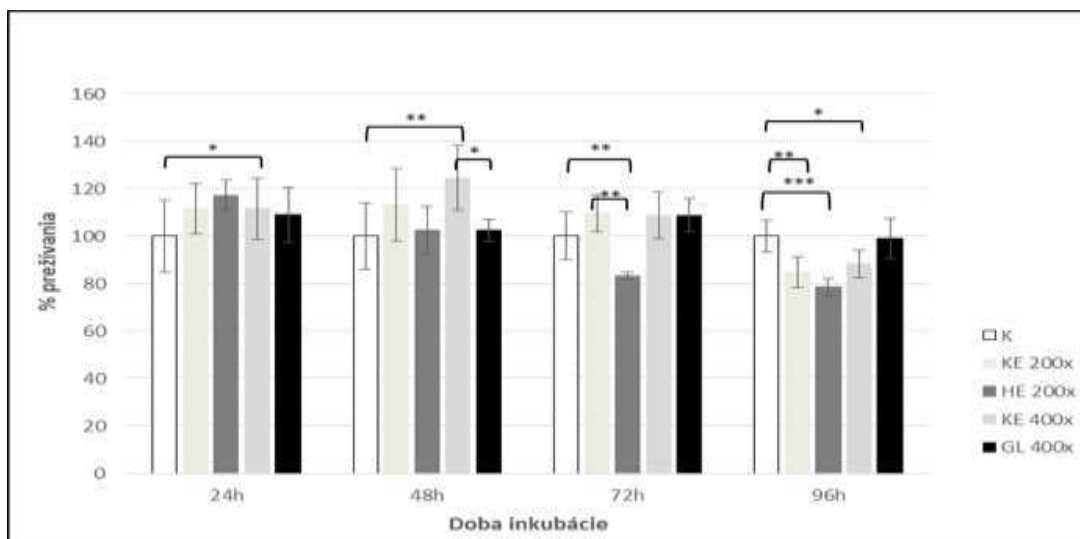
V prípade mladých buniek inkubovaných s etanolovým extraktom *G. lucidum* alebo *H. erinaceum* sme po 24 hodinách zaznamenali mierny nárast viability oproti neovplyvnenej kontrole (Obr. 3). Výsledky získané po 48 a 72 hodinovej inkubácii mladých buniek s etanolovým extraktom *G. lucidum* neboli signifikantné. Rovnako ani výsledky získané po 48 a 72 hodinovej inkubácii mladých buniek s etanolovým extraktom *H. erinaceum* neboli signifikantné. Po 96 hodinovej inkubácii buniek s etanolovým extraktom *G. lucidum* sme pozorovali výrazný nárast viability až o 48% oproti neovplyvnenej kontrole. Výsledky získané po 96 hodinovej inkubácii mladých buniek s etanolovým extraktom *H. erinaceum* neboli štatisticky významné.

V prípade starých buniek sme signifikantné výsledky po 24 hodinovej inkubácii s etanolovým extraktom *G. lucidum* alebo *H. erinaceum* získali len pri inkubácii starých buniek s etanolovým extraktom *H. erinaceum*, kde sme pozorovali mierny nárast viability oproti neovplyvnenej kontrole. Výsledky získané po 48 hodinovej inkubácii starých buniek s etanolovým extraktom *H. erinaceum* neboli štatisticky významné, zatiaľ čo po 72 a 96 hodinovej inkubácii starých buniek s etanolovým extraktom *H. erinaceum* dochádzalo k poklesu viability starých buniek o 17% a 22% oproti neovplyvnenej kontrole. Výsledky získané po 48, 72 a aj 96 hodinovej inkubácii starých buniek s etanolovým extraktom *G. lucidum* neboli signifikantné.



Obr. 3 Vplyv 2,5% extraktu *H. erinaceum* v 40% etanole a 2,5% extraktu *G. lucidum* v 40% etanole na rast mladých buniek (pasáž 9).

Bunky boli inkubované 1, 2, 3 alebo 4 dni s etanolovým extraktom *G. lucidum* riedeným 400-krát v kultivačnom médiu alebo s etanolovým extraktom *H. erinaceum* riedeným 200-krát v kultivačnom médiu. Výsledky sú priemer 2 experimentov $\pm$ SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. K – kontrola bez pridania etanolu alebo etanolového extraktu *G. lucidum* alebo *H. erinaceum*, KE 200x – kontrola ovplyvnená 40% etanolom riedeným 200-krát v kultivačnom médiu, HE 200x – bunky ovplyvnené extraktom *H. erinaceum* riedenom 200-krát v kultivačnom médiu, KE 400x – kontrola ovplyvnená 40% etanolom riedeným 400-krát v kultivačnom médiu, GL 400x – bunky ovplyvnené extraktom *G. lucidum* riedenom 400-krát v kultivačnom médiu



Obbr. 4 Vplyv 2,5% extraktu *H.erinaceum* v 40% etanole a 2,5% extraktu *G.lucidum* v 40% etanole na rast starých buniek (pasáž 22).

Bunky boli inkubované 1, 2, 3 alebo 4 dni s etanolovým extraktom *G. lucidum* riedeným 400-krát v kultivačnom médiu alebo s etanolovým extraktom *H. erinaceum* riedeným 200- krát v kultivačnom médiu. Výsledky sú priemer 2 experimentov $\pm$ SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. K – kontrola bez pridania etanolu alebo etanolového extraktu *G. lucidum* alebo *H. erinaceum*, KE 200x – kontrola ovplyvnená 40% etanolom riedeným 200-krát v kultivačnom médiu, HE 200x – bunky ovplyvnené extraktom *H. erinaceum* riedenom 200-krát v kultivačnom médiu, KE 400x - kontrola ovplyvnená 40% etanolom riedeným 400-krát v kultivačnom médiu, GL 400x – bunky ovplyvnené extraktom *G. lucidum* riedenom 400-krát v kultivačnom médiu

Záver

Bunkové starnutie tzv. senescencia hrá významnú úlohu pri starnutí organizmu (1). Dôležité je preto hľadanie efektívneho spôsobu na odstránenie senescentných buniek z organizmu a/alebo spomalenie ich tvorby. V našej práci sme sa zamerali na sledovanie vplyvu etanolových extraktov z *G. lucidum* a *H. erinaceum* na rast mladých buniek a buniek starých, ktoré vykazujú známky senescencie ako je zvýšená aktivita SA β -galaktozidázy asociovanej so senescenciou, zvýšená hladina proteínu p21 a p16 a zväčšený tvar buniek. *G. lucidum* a aj *H. erinaceum* sú zaradené medzi medicínsky významné huby. Obe sú už dlho používané ako prostriedok na udržanie zdravia a dosiahnutie dlhovekosti v Číne a iných ázijských krajinách (13).

Z našich experimentov vyplýva, že nami použitý etanolový extrakt z *G. lucidum* by nemal negatívne ovplyvňovať rast mladých buniek v závislosti od dĺžky pôsobenia. V prípade etanolového extraktu z *H. erinaceum* vieme povedať len, že po 24 hodinovej inkubácii mladých buniek s týmto extraktom dochádza k miernemu zvýšeniu rastu buniek. V prípade starých buniek sme získali signifikantné výsledky len v prípade ovplyvnenia buniek etanolovým extraktom z *H. erinaceum*. Dôležitým zistením je, že inkubácia starých buniek extraktom z *H. erinaceum* vedie po 72 hodinách k výraznému poklesu rastu buniek, ktorý sa ešte prehĺbi po 96 hodinovej inkubácii starých buniek s extraktom. Pozorovaný pokles rastu môže byť spôsobený tým, že staršie bunky v dôsledku svojej opotrebovanosti sú citlivejšie voči pôsobeniu látok obsiahnutých v etanolovom extrakte z *H.erinaceum*, čo spôsobuje poškodenie buniek a ich smrť. Na druhej strane je možné, že látky obsiahnuté v etanolovom extrakte z *H.erinaceum* selektívne zabíjajú bunky, ktoré sú už v senescentnom stave a tým spôsobujú zdanlivý pokles rastu buniek. Na zistenie skutočnej príčiny poklesu rastu starých buniek vplyvom inkubácie s etanolovým extraktom z *H.erinaceum* je však potrebné uskutočniť ďalšie experimenty. Podľa dostupných informácií podobný experiment, ktorý by

sledoval vplyv pôsobenia etanolových extraktov z húb na rast starých buniek nebol uskutočnený. Známy je len experiment, v ktorom bol pozorovaný vplyv jednotlivých vyizolovaných zložiek – hericenónov na aktivitu SA- β -galaktozidázy v ľudských umbilikálnych endotelových bunkách, v ktorých bola indukovaná senescencia pôsobením adriamycínu. Hericenóny boli pridané k bunkám pred ovplyvnením buniek adriamycínom a niektoré z nich boli schopné znížiť hladinu SA- β -galaktozidázy v bunkách (19).

PodĎakovanie

Práca je podporená z grantu EU, z programu CBC, Interreg V-A-NutriAging V-0014.

Literatúra

1. **Campisi J, d'Adda di Fagagna F.** Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8 (9): 729–740.
2. **Harley CB, Futcher AB, Greider CW.** Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts, *Nature.* 1990; 345: 458–460.
3. **Tominaga K.** The emerging role of senescent cells in tissue homeostasis and pathophysiology. *Pathobiol. Aging Age-Relat. Dis.* 2015; DOI: 10.3402/pba.v5.27743.
4. **DiLeonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM.** DNA damage triggers a prolonged p53- dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 1994; 8: 2540–2551.
5. **Chen QM, Bartholomew JC, Campisi J, Acosta M, Reagan JD, Ames BN.** Molecular analysis of H₂O₂- induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem. J.* 1998; 332: 43–50.
6. **Ziegler DV, Wiley CD, Velarde MC.** Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. *Aging Cell.* 2015; 14: 1–7.
7. **Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW.** Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p 53 and p16/ INK4a. *Cell.* 1997; 88: 593–602.
8. **Hein N, Sanij E, et al.** The Nucleolus and Ribosomal Genes in Aging and Senescence 172-208. In T. Nagata (Eds.) *Senescence*, InTech, 2012.
9. **Munro J, Barr NI, Ireland H, Morrison V, Parkinson EK.** Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-line state in human cells by a p16- dependent mechanism that is independent of a mitotic clock. *Exp. Cell Res.* 2004; 295: 525–538.
10. **Naylor RM, Baker DJ, van Deursen JM.** Senescent cells: a novel therapeutic target for aging and age-related diseases. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2013; 93: 105–116.
11. **Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM.** Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature.* 2011; 479: 232–236.
12. **Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben Cj, Zhong J, Saltness RA, Jeganathan KB, Verzosa GC, Pezeshki A, Khazaie K, Miller JD, van Deursen JM.** Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature.* 2016; 530: 184–189.
13. **Shiao MS, Lee KR et al.** Natural products and biological activities of the Chinese medical fungus, *Ganoderma lucidum*. 342-354. In: Ho CT, Osawa T, Huang MT, Rosen RT (Eds). *Food phytochemicals for cancer prevention II: Teas, spices and herbs*. Washington DC; American chemical society, 1994.
14. **Antonin V, Jablonský I, Šásek V, Vančuríková Z (Eds).** *Huby ako liek*. Praha; Ottovo nakladatelství, s.r.o., 2013

- 15. Yue QX, Song XY, Ma C, Feng LX, Guan SH, Wu WY, Yang M, Jiang BH, Liu X, Cui YJ, Guo DA.** Effects of triterpenes from *Ganoderma lucidum* on protein expression profile of HeLa cells. *Phytomedicine*. 2010; 17: 606-613.
- 16. Kawagishi H, Ando M, Sakamoto H, Yashida S.** Hericenone C, D and E stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mushroom *Herichium erinaceum*. *Tetrahedron Lett*. 1991; 32: 4561-4564.
- 17. Kawagishi H, Ando M, Mizuno T.** Hericenone A and B as cytotoxic principles from the mushroom *Herichium erinaceum*. *Tetrahedron Lett* 1990; 31: 373–376.
- 18. Mizuno T, Wasa T, Ito H, Suzuki C, Ukai N.** Antitumor-active polysaccharides isolated from the fruiting body of *Herichium erinaceum*, an edible and medicinal mushroom called yamabushitake or houtou. *Biosci Biotechnol Biochem* 1992; 6: 347–348.
- 19. Noh HJ, Yang HH, Kim GS, Lee SE, Lee DY, Choi JH, Kim SY, Lee ES, Ji SH, Kang KS, Park HJ, Kim JR, Kim KH.** Chemical constituents of *Herichium erinaceum* associated with the inhibitory activity against cellular senescence in human umbilical vascular endothelial cells. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2015; 30 (6): 934–940.