

EVALUACIJA ANTIOKSIDATIVNOG POTENCIJALA GLJIVE *CORDYCEPS SINENSIS* IN VITRO

Lada Živković¹, Sunčica Borozan², Vladan Bajić³, Stefana Đorđević¹, Aleksandar Hristov¹, Biljana Spremo-Potparević¹

¹Centar za biološka istraživanja, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd

²Katedra za hemiju, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Beograd

³Laboratorija za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Institut za nuklearna istraživanja „Vinča“, Univerzitet u Beogradu, Beograd

EVALUATION OF ANTIOXIDANT POTENTIAL OF *CORDYCEPS SINENSIS* IN VITRO

Lada Živković¹, Suncica Borozan², Vladan Bajić³, Stefana Djordjević¹, Aleksandar Hristov¹, Biljana Spremo-Potparević¹

¹Centre for Biological Research, Faculty of Pharmacy University of Belgrade, Belgrade, Serbia

²Department of Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

³Laboratory for Radiobiology and Molecular Genetics, Institute for Nuclear Research “Vinca”, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

SAŽETAK

Cilj. Prooksidansi i antioksidansi utiču na oksidativnu ravnotežu na intracelularnom nivou. Oksidativni stres je posledica prekomerne produkcije prooksidanasa i nastaje usled poremećaja u ravnoteži oksido-redukcionih procesa. Neenzimski antioksidansi male molekulske mase mogu se uneti u organizam preko hrane. *Cordyceps sinensis* (*C. sinensis*) lekovita je gljiva koja se koristi u tradicionalnoj kineskoj medicini, ima bogat sadržaj vitamina, raznih polisaharida, kao i mnogih nukleozida. Cilj istraživanja ove studije bila je evaluacija antioksidativnog kapaciteta dijetetskog suplementa *C. sinensis*.

Metode. Mereni su kapacitet „skevindžer“ aktivnosti hidroksil radikala, ukupna antioksidativna aktivnost primenom FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) metode i DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) – skevindžer aktivnost.

Rezultati. *C. sinensis* je u ispitivanim koncentracijama 0,0078–2,00 mg/mL imao izraženu sposobnost uklanjanja hidroksil radikala, čija je IC₅₀ iznosila 0,5 mg/mL, dok je u koncentracijama 0,0078–10,00 mg/mL pokazao umerenu redukciju sposobnost. *C. sinensis* nije pokazao sposobnost uklanjanja DPPH radikala.

Zaključak. *C. sinensis* efikasno neutrališe hidroksilne radikale, za koje organizam nema adekvatnu antioksidativnu zaštitu pa ga možemo uvrstiti u grupu potencijalnih protektora od slobodnih radikala.

Ključne reči: gljive; *Cordyceps*; antioksidansi

UVOD

Pozitivni uticaj konzumiranja prirodnih proizvoda na zdravlje ljudi odavno je poznat. Rasprostranjeno je mišljenje da ishrana ima značajnu ulogu u održavanju dobrog zdravlja, ali da takođe može da doprinese razvoju mnogih hroničnih bolesti (1). Gljive se od davnina cene zbog specifičnog ukusa i arome, ali i zbog farmakoloških svojstava (2, 3). *Cordyceps sinensis* (*C. sinensis*) dobro je poznata kineska lekovita gljiva, čije je prirodno stanište na Tibetanskoj visoravni, na visinama iznad 3.600 m. *C.*

ABSTRACT

Objective. Prooxidants and antioxidants affect the oxidative balance at the intracellular level. Oxidative stress is a consequence of the overproduction of prooxidants and is caused by disturbances in the balance of oxidative reduction processes. Non-enzymatic low molecular weight antioxidants can be introduced into the body through food. *Cordyceps sinensis* (*C. sinensis*) is a medicinal fungus used in traditional Chinese medicine, with rich content of vitamins, various polysaccharides, and many nucleosides. The aim of this study is to evaluate the antioxidant capacity of the dietary supplement *C. sinensis*.

Methods. The capacity of the hydroxyl radical scavenger activity, the total antioxidant activity of FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) and the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) scavenger activity were measured.

Results. *C. sinensis* at the tested concentrations of 0.0078–2.00 mg/mL had a pronounced ability to remove hydroxyl radicals with IC₅₀ of 0.5 mg/mL, while at concentrations (0.0078–10.00 mg / mL) it showed a moderate reducing ability. *C. sinensis* showed no ability to remove DPPH radicals.

Conclusion. *C. sinensis* effectively removes hydroxyl radicals, for which the body does not have adequate antioxidant protection, so we can include it in the group of free radical scavengers.

Key words: fungi; *Cordyceps*; antioxidants

sinensis je parazitska gljiva koja raste na larvama leptira reda lepidoptera, potpuno uništavajući domaćina, pretvarajući ga u plodonošno telo same gljive (4, 5).

U tradicionalnoj kineskoj medicini, *C. sinensis* se koristi kao deo medicinskog tretmana za otklanjanje slabog apetita, tuberkuloze, hroničnog bronhitisa i muške impotencije (6). Takođe, dugi niz godina *C. sinensis* se primenjuje za pojačavanje vitalnosti i usporavanje procesa starenja, lečenje bolesti respiratornog trakta i bubrežne disfunkcije; lečenje zdravstvenih stanja koja se odnose na kardiovaskularni, imunski, endokrini i nervni sistem (7).

C. sinensis i ostale gljive iz roda *Cordiceps*, iako se obično ne smatraju hranom (uglavnom zbog malih dimenzija, endemskog karaktera i žilave strukture), sadrže širok spektar hranljivih jedinjenja. Ova jedinjenja uključuju esencijalne aminokiseline, vitamine E i K, kao i vitamine B1, B2 i B12. Osim toga, sadrže veliku koncentraciju ugljenih hidrata, uključujući monosaharide, disaharide i oligosaharide i mnogo složenih polisaharida, proteine, sterole, nukleozide i elemente u tragovima (8). Čen i sar. (9) identifikovali su u ekstraktu *C. sinensis* kordicepin i ciklosporin i dodatne komponente kao što su uridin, adenzin, guanozin, deoksiguanozin. Treba istaći da ciklosporin (9) i kordicepinske kiseline (10, 11) imaju značajno imunosupresivno dejstvo. Istraživanja su pokazala da su polisaharidi efikasni u regulisanju nivoa šećera u krvi, pre svega CSP1 (12), a imaju i antimetastatsko i antitumorsko svojstvo (13).

Ranija istraživanja su pokazala imunomodulatorno, antikancerogeno, antioksidativno i antiinflamatorno delovanje *C. sinensis* (14–16). Naša prethodna studija ukazala je na antigenotoksičan potencijal *C. sinensis* u odnosu na DNK oštećenja izazvana vodonik-peroksidom *in vitro* (17).

Cilj istraživanja ove studije bila je evaluacija antioksidativnog kapaciteta *C. sinensis* primenom sledećih merenja: kapaciteta skevindžer aktivnosti hidroksil radikala, ukupne antioksidativne aktivnosti primenom FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) metode i DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) testom – skevindžer aktivnosti.

MATERIJAL I METODE

U ovoj studiji korišćen je komercijalni proizvod *C. sinensis* u obliku praha u kapsulama (Pure Cordiceps Super, Aloha Medicinals, Inc, Carson City, NV, SAD / Santa Cruz, CA, SAD). *C. sinensis* prah je rastvoren u fiziološkom rastvoru sa fosfatnim puferom (PBS) i mešan tokom 30 min na 37°C.

Određivanje aktivnosti uklanjanja hidroksilnih radikala

Određivanje neutralisanja hidroksil radikala testirano je korišćenjem metode oksidacije 2-deoksiriboze koju su opisali Čung i sar. (18). Oksidacija 2-deoksiriboze hidroksilnim radikalom koji nastaje Fentonovom reakcijom i razgradnjom do malondialdehida. Reakciona smeša sadrži 0,45 mL 0,2 M natrijum-fosfatnog pufera (pH 7,6), 0,15 mL 10 mM 2-deoksiriboze, 0,15 mL 10 mM FeSO₄-EDTA, 0,15 mL 10 mM vodonik-peroksida, 0,525 mL destilovane vode, i 0,075 mL *C. sinensis* rastvora u opsegu koncentracija (0,0078–2,00 mg/mL). Reakcija je započeta dodavanjem vodonik-peroksida. Posle inkubacije na 37°C tokom 1 h, reakcija je zaustavljena dodavanjem 0,75 mL 2,8% (m/v) trihlorsirćetne kiseline i

0,75 mL 1,0% (m/v) tiobarbiturne kiseline. Smeša je ključala 10 min, potom je ohlađena na ledu, a zatim merena na spektrofotometru na talasnoj dužini od 535 nm. Kao kontrola korišćena je reakciona smeša koja ne sadrži test uzorak. Troloks (0,0078–2,00 mg/mL), poznati sintetički antioksidans, korišćen je kao standard. Aktivnost skevindžera hidroksilnih radikala izražena je na sledeći način:

$$\text{Sposobnost skevindžera (\%)} = [(A535 \text{ kontrole} - A535 \text{ uzorka}) / A535 \text{ kontrole}] \times 100$$

IC vrednost (mg/mL) – efektivna koncentraciji kojom se 50% 2-deoksiriboze razgrađuje. IC je dobijena interpolacijom linearnom regresionom analizom.

FRAP metoda (određivanje Fe³⁺/Fe²⁺redoks kapaciteta)

Moć redukcije jona gvožđa (Fe³⁺) određena je metodom po Oyaizu (19). Svaka koncentracija *C. sinensis* (0,0078–10,00 mg/mL) pomešana je sa 2,5 mL 200 mM pufera natrijum-fosfata (pH 6,6) i 2,5 mL 10 mg/mL kalijum-heksacijanoferata (III), nakon čega je smeša inkubirana na 50°C tokom 20 min. Nakon toga je 2,5 mL 100 mg/mL trihlorsirćetne kiseline dodato u smešu i zatim centrifugirano na 2.000 g tokom 10 min. Gornji sloj je pomešan sa 5 mL dejonizovane vode i 1 mL (1 mg/mL) gvožđe(III)-hlorida; apsorbcija je zatim merena na 700 nm. Veća vrednost apsorbanace ukazuje na veću redukcionu sposobnost. Butilovani hidroksitoluen (BHT), poznati sintetički antioksidans, korišćen je kao standard. Koncentracije *C. sinensis* i BHT korišćene za analizu bile su u rasponu 0,0078–10,00 mg/mL.

Određivanje sposobnosti uklanjanja DPPH radikala

Sposobnost uklanjanja 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala određena je po metodi Šimade i sar. (20). Svaka koncentracija *C. sinensis* (0,001–10,00 mg/mL) pomešana je sa 1 mL metanolnog rastvora, koji sadrži DPPH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) radikale, što rezultira konačnom koncentracijom od 0,2 mM DPPH. Smeša je snažno promešana i ostavljena 30 min u mraku. Apsoorbancija je zatim merena na spektrofotometru na talasnoj dužini od 517 nm. Sposobnost skevindžera izračunata je na sledeći način:

$$\text{Sposobnost skevindžera (\%)} = [(A517 \text{ kontrole} - A517 \text{ uzorka}) / A517 \text{ kontrole}] \times 100$$

IC₅₀ vrednost (mg/mL) pokazuje efektivnu koncentraciju kod koje je inhibirano 50% radikala DPPH i dobijena je interpolacijom linearnom regresionom analizom. Za upoređivanje je korišćen troloks (2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina) kao standard. Koncentracije troloksa korišćenog za analizu bile su u rasponu 0,0078–2,00 mg/mL.

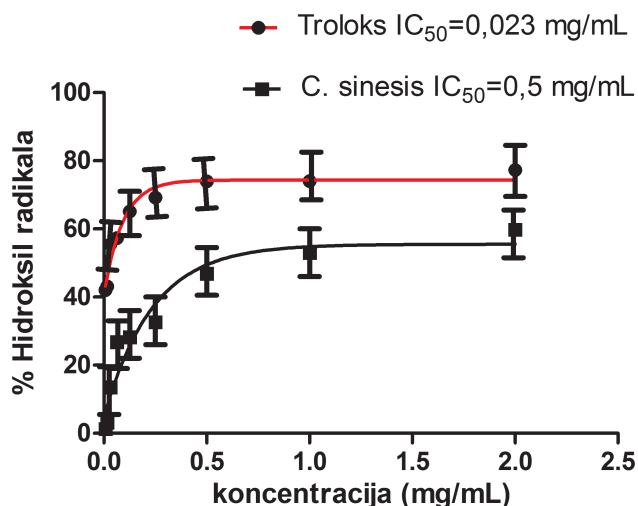
STATISTIČKA ANALIZA

Za utvrđivanje statistički značajnih razlika u koncentracijama *C. sinensis* i odgovarajućih standarda korišćena je jednofaktorijska analiza varijanse (*one way ANOVA*) primenom *Tukey* posthoc testa. Signifikantnost razlika utvrđena je na nivou značajnosti $p < 0,05$. Statistička analiza dobijenih rezultata izvršena je korišćenjem statističkog programa GraphPad Prism 7,00 (San Diego, CA, USA).

REZULTATI

Određivanje aktivnosti uklanjanja hidrosilnih radikala

Rezultati analize određivanja neutralisanja hidrosilnih radikala prikazani su na slici 1. Dobijeni rezultati pokazali su da je *C. sinensis* u ispitivanim koncentracijama 0,0078–2,00 mg/mL imao izraženu

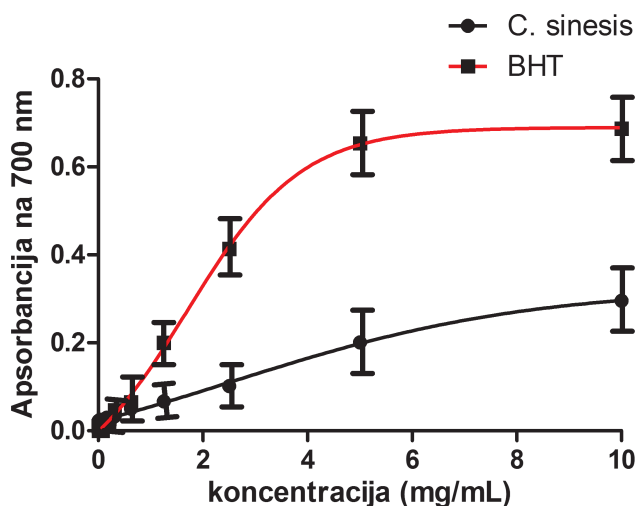


Slika 1. Sposobnost *C. sinensis* da ukloni hidrosil radikal u odnosu na poznati sintetički antioksidans troloks

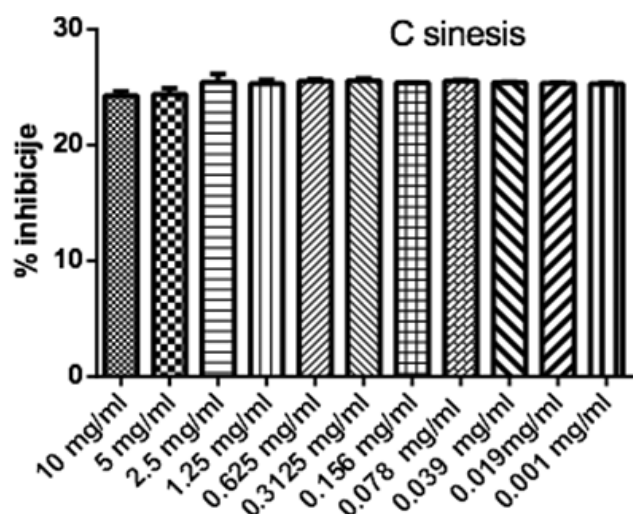
sposobnost neutralisanja hidrosil radikala, čija je IC_{50} iznosila 0,50 mg/mL. Pri ovoj koncentraciji i troloks je pokazao maksimalnu vrednost za uklanjanje hidrosil radikala. Međusobnim poređenjem svih ispitivanih koncentracija *C. sinensis* ustanovljena je statistički značajna razlika između njih ($p < 0,001$) u sposobnosti uklanjanja hidrosil radikala. Između ispitivanih koncentracija troloksa 0,0078–0,50 mg/mL utvrđena je statistički značajna razlika na nivou $p < 0,001$, dok između ispitivanih koncentracija 0,50–2,00 mg/mL nije utvrđena statistički značajna razlika u stepenu uklanjanja hidrosil radikala. Međusobnim poređenjem svih ispitivanih koncentracija troloksa i *C. sinensis* utvrđena je statistički značajna razlika na nivou značajnosti $p < 0,001$.

Određivanje redukcionog potencijala FRAP metodom

Rezultati FRAP analize prikazani su na slici 2. Rezultati analize ukazuju na to da je *C. sinensis* u



Slika 2. FRAP *C. sinensis* u poređenju sa butilovanim hidrositoluenom (BHT), poznatim sintetičkim antioksidansom



Slika 3. DPPH skevindžer aktivnost *C. sinensis* u poređenju sa troloksom, poznatim sintetičkim antioksidansom

ispitivanim koncentracijama 0,0078–10,00 mg/mL imao umerenu redukcionu sposobnost u poređenju sa BHT kao standardom. S povećanjem koncentracije *C. sinensis*, redukciona sposobnost je rasla linearno do koncentracije od 5,00 mg/mL i iznosila je 0,18 absorbance na 700 nm. Između koncentracija *C. sinensis* 0,3125–10,00 mg/mL utvrđena je razlika u redukcionom potencijalu na nivou $p < 0,01$. Kod ispitivanih koncentracija manjih od 0,3125 mg/mL nije dokazana značajna razlika u redukcionoj moći. Sintetički standard BHT pokazao je izrazitu redukcionu moć u koncentracijama 0,3125–5,00 mg/mL na nivou statističke značajnosti $p < 0,001$. Između nižih ispitivanih koncentracija, kao i koncentracija od 5,00 i 10,00 mg/mL nije utvrđena statistički značajna razlika. Međusobnim poređenjem *C. sinensis* i BHT u svim ispitivanim koncentracijama utvrđena je statistički značajna razlika na nivou od $p < 0,001$ u intervalu koncentracija 0,3125–10,00 mg/mL.

Određivanje sposobnosti uklanjanja DPPH radikala

Rezultati analize uklanjanja DPPH prikazani su na slici 3. *C. sinensis* nije pokazao sposobnost redukcije DPPH radikala u ispitivanim koncentracijama za razliku od troloksa koji svoju vrednost IC_{50} dostiže pri koncentraciji od 0,150 mg/mL.

DISKUSIJA

Savremeni dijetetski suplement *C. sinensis*, koji smo koristili u ovoj studiji, proizvodi se od uzgajanog ekstrakta micelije i služi kao zamena za divlji kordiceps koji preovlađuje u tradicionalnoj istočnjačkoj medicini. Eksperimentalne analize dokazale su prisustvo biološki aktivnih jedinjenja u *C. sinensisu*, kao što su (1) nukleozidi – kordicepin i adenozin; (2) polisaharidi – CPS1, CPS2 i APC; (3) peptidi – ciklodipeptidi i kordin; i (4) steroli – ergosterol i sitosterol. Ova jedinjenja imaju pozitivne efekte na zdravlje ljudi (21–28).

Prooksidansi i antioksidansi utiču na oksidativnu ravnotežu na intracelularnom nivou. Ukoliko se poremeti ravnoteža, što vodi oksidativnom disbalansu i povećanju produkcije prooksidanasa, dolazi do oksidativnih oštećenja ćelijskih biomolekula. U organizmu postoji antioksidativni zaštitni sistem za sprečavanje nastanka i uklanjanje slobodnih radikala (29). Antioksidativnu zaštitu na ćelijskom nivou čine antioksidativni enzimi, proteini koji vezuju metale (jone gvožđa i jone bakra), kao i neenzimski antioksidansi male molekulske mase koji se sintetišu u organizmu ili se unose preko hrane (30).

Prethodna istraživanja su pokazala da *C. sinensis* ima koristan efekat na zdravlje čoveka, čime je dokazana njegova farmakološka aktivnost (31, 32). *C. sinensis* ima snažna antioksidativna svojstva i omogućava zaštitu od slobodnih radikala (33–35), te deluje kao sredstvo koje usporava proces starenja (36). Istraživanja Lija i saradnika

(34) pokazala su da polisaharidi izolovani iz micela *C. sinensis* smanjuju aktivnost ksantin-oksidadze, stepena hemolize i lipidne peroksidacije. Rezultati ove studije tokom koje je izvršena evaluacija uklanjanja hidroksil radikala *C. sinensis* ($IC_{50} = 0,5$ mg/mL), idu u prilog njegovoj snažnoj antioksidativnoj sposobnosti. S druge strane, treba pomenuti da su naša prethodna istraživanja pokazala da *Agaricus blazei*TM (37) i *Immune assist*TM (dijetetski proizvod sastavljen od šest vrsta različitih medicinskih gljiva među kojima je i *C. sinensis*) (38) imaju sličnu aktivnost uklanjanja hidroksil radikala ($IC_{50} = 0,2$ mg/mL). Takođe, redukciona sposobnost *C. sinensis* umerena je u odnosu na BHT kao standard, ali u istom opsegu kao kod *Immune assist*TM, dok je *Agaricus blazei*TM imao dva puta veću redukcionu sposobnost. DPPH aktivnost *C. sinensis* je izostala, slično kao i kod *Immune assist*TM i *Agaricus blazei*TM (37, 38). S obzirom na to da je kod *C. sinensis* izostala antioksidativna sposobnost uklanjanja DPPH radikala, treba izvršiti dalju analizu primene ove analitičke metode zbog sternih smetnji i veličine samog radikala, što predstavlja jednu od negativnih strana primene pomenutog testa. Mehanizme koji leže u osnovi ispitivanih svojstava trebalo bi dalje proceniti u *in vivo* sistemima.

Zaključujemo, ova preliminarna studija pokazala je antioksidativne efekte *C. sinensis*. S obzirom na to da *C. sinensis* efikasno uklanja hidroksilne radikale, za koje organizam nema adekvatnu antioksidativnu zaštitu, treba je uvrstiti u grupu potencijalnih protektora od slobodnih radikala.

ZAHVALNOST

Ovo istraživanje podržalo je Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Projekat OI 173034).

SKRAĆENICE

C. sinensis – *Cordyceps sinensis*

FRAP – redukciona sposobnost jona gvožđa (Fe^{3+})

DPPH-2,2 – difenil-1-pikrilhidrazil radikal

PBS – fosfatni pufer

troloks – 2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina

BHT – butilovani hidroksitoluen

LITERATURA

- Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ, Spencer JP. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients* 2010; 2: 1106-31.

2. Barros L, Cruz T, Baptista P, Estevinho LM, Ferreira IC. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 2742-7.
3. Ferreira IC, Barros L, Abreu RM. Antioxidants in wild mushrooms. *Curr Med Chem* 2009; 16: 1543-60.
4. Zhou X, Gona Z, Su Y, Lin J, Tang K. Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61: 279-91.
5. Wang XL, Yao YJ. Host insect species of *Ophiocordyceps sinensis*: a review. *Zookeys* 2011; 127: 43-59.
6. Chen PX, Wang S, Nie S, Marcone M. Properties of *Cordyceps sinensis*: a review. *J Funct Foods* 2013; 5: 550-69.
7. Zhu JS, Halpern GM, Jones K. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis* Part I. *J Altern Complement Med* 1998; 4: 289-303.
8. Yue K, Ye M, Zhou Z, Sun W, Lin X. The genus *Cordyceps*: a chemical and pharmacological review. *J Pharm Pharmacol* 2013; 65: 474-93.
9. Chen SZ, Chu JZ. 1996: NMR and IR studies on the characterization of cordycepin and deoxyadenosine. *Zhongguo Kangshengsu Zaxhi* 1996; 21: 9-12.
10. Ukai S, Kiho T, Hara C, Morita M, Goto A, Imaizumi N, Hasegawa Y. Polysaccharides in fungi XIII. Antitumor activity of various polysaccharides isolated from *Dictyophora indusiata*, *Ganoderma japonicum*, *Cordyceps cicadae*, *Auricularia uricula-judae* and *Auricularia* sp. *Chem Pharma Bull* 1983; 31: 741-44.
11. Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 60: 258-74.
12. Kiho T, Hui J, Yamane A, Ukai S. Hypoglycemic activity and chemical properties of a polysaccharide from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Biol Pharm Bull* 1993; 16:1291-3.
13. Nakamura K, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M. Activation of in vivo Kupffer cell function by oral administration of *Cordyceps sinensis* in rats. *Jpn J Pharmacol* 1999; 79: 505-8.
14. Tuli HS, Sandhu SS, Sharma AK. Pharmacological and therapeutic potential of *Cordyceps* with special reference to Cordycepin. *3 Biotech* 2014; 4: 1-12.
15. Shashidhar MG, Giridhar P, Sankar KU, Manohar B. Bioactive principles from *Cordyceps sinensis*: a potent food supplement – a review. *J Funct Foods* 2013; 5: 1013-30.
16. Nie S, Cui SW, Xie MY, Phillips AO, Phillips GO. Bioactive polysaccharides from *Cordyceps sinensis*: Isolation, structure features and bioactivities. *Bioact Carbohydr Dietary Fibre* 2013; 1: 38-52.
17. Vasiljevic J, Zivkovic LP, Cabarkapa A, Bajic VP, Djelic NJ, Spremo-Potparevic BM. *Cordyceps sinensis*: genotoxic potential in human peripheral blood cells and antigenotoxic properties against hydrogen peroxide by comet assay. *Altern Ther Health Med* 2016; 22: 24-31.
18. Chung S-K, Osawa T, Kawakishi S. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci Biotechnol Biochem* 1997; 61: 118-23.
19. Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of product of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr Diet* 1986; 44: 307-15.
20. Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 945-8.
21. Zhou X, Luo L, Dressel W, et al. Cordycepin is an immunoregulatory active ingredient of *Cordyceps sinensis*. *Am J Chin Med* 2008; 36: 967-80.
22. Wang Y, Wang M, Ling Y, Fan W, Wang Y, Yin H. Structural determination and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis*. *Am J Chin Med* 2009; 37: 977-89.
23. Wang Y, Yin H, Lv X, Wang Y, Gao H, Wang M. Protection of chronic renal failure by a polysaccharide from *Cordyceps sinensis*. *Fitoterapia* 2010; 81: 397-402.
24. Shen W, Song D, Wu J, Zhang W. Protective effect of a polysaccharide isolated from a cultivated *Cordyceps* mycelia on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells. *Phytother Res* 2011; 25: 675-80.
25. Jia JM, Ma XC, Wu CF, Wu LJ, Hu GS. Cordycedipeptide A, a new cyclodipeptide from the culture liquid of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2005; 53: 582-3.
26. Wang J, Liu YM, Cao W, Yao KW, Liu ZQ, Guo JY. Anti-inflammation and antioxidant effect of Cordymin, a peptide purified from the medicinal mushroom *Cordyceps sinensis*, in middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia in rats. *Metab Brain Dis* 2012; 27: 159-65.
27. Yuan JP, Wang JH, Liu X, Kuang HC, Zhao SY. Simultaneous determination of free ergosterol and ergosteryl esters in *Cordyceps sinensis* by HPLC. *Food Chem* 2007; 105: 1755-9.

28. Lo HC, Hsieh C, Lin FY, Hsu TH. A systematic review of the mysterious caterpillar fungus (*Dōng Chóng Xià Cao*) and related bioactive ingredients. *J Tradit Complement Med* 2013; 3: 16-32.
29. Finaud J, Lac G, Filaire L. Oxidative stress – relationship with exercise and training. *Sports Med* 2006; 36: 327-58.
30. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006; 52: 601-23.
31. Ng TB, Wang HX. Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine. *J Pharm Pharmacol* 2005; 57: 1509-19.
32. Lin B, Li S. *Cordyceps* as an Herbal Drug. In: Benzie IF, Wachtel-Galor S, eds. *Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects*. Boca Raton: CRC Press, 2011.
33. Yamaguchi Y, Kagota S, Nakamura K, Shinozuka K, Kunitomo M. Antioxidant activity of the extracts from fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis*. *Phytother Res* 2000; 14: 647-9.
34. Li SP, Li P, Dong TT, Tsim KWK. Determination of nucleosides in natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps mycelia* by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2001; 22: 144-50.
35. Liu Y, Wang J, Wang W, Zhang H, Zhang X, Han C. The chemical constituents and pharmacological actions of *Cordyceps sinensis*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015; 2015: 575063 (doi: 10.1155/2015/575063).
36. Li SP. A polysaccharide isolated from *Cordyceps sinensis*, a traditional Chinese medicine, protects PC12 cells against hydrogen peroxide induced injury. *Life Sci* 2003; 73: 2503-13.
37. Živkovic L, Borozan S, Cabarkapa A, et al. Antigenotoxic properties of *agaricus blazei* against hydrogen peroxide in human peripheral blood cells. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 8759764 (10.1155/2017/8759764).
38. Živković L, Bajić V, Bruić, M, et al. Antigenotoxic and antioxidant potential of medicinal mushrooms (*Immune Assist*) against DNA damage induced by free radicals-an in vitro study. *Mutat Res* 2019; 845: 403078 (10.1016/j.mrgentox.2019.06.008).