

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра екології та зоології

В.о. завідувача кафедри екології та зоології

д.б.н., проф. Лукашов Дмитро

Володимирович

Протокол №____ засідання кафедри

від “____” _____ 2025 р.

**ЗАЛЕЖНІСТЬ ОНКОСТАТИЧНОЇ ДІЇ ЕКСТРАКТИВ
КУЛЬТИВОВАНИХ ГРИБІВ ВІД ВМІСТУ ЦИТОКІНІНІВ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра

денної форми навчання

за спеціальністю: екологія

Старшинової Марії Євгенівни

Науковий керівник від кафедри

Д.б.н., проф. Гарманчук Л.В

Робота виконана на кафедрі екології та зоології під керівництвом

Гарманчук Людмили Василівни

Оцінка захисту роботи

АНОТАЦІЯ

Для вивчення безпеки та механізмів дії потенційних терапевтичних засобів природного походження, особливо фітогормонів і цитокінінів, виділених з міцелію культивованих грибів, проведено аналіз впливу цих речовин на клітини людини та тварин. Застосовуючи методи полімеразної ланцюгової реакції та методи культури клітин, досліджено їх вплив на цитотоксичну/цитостатичну активність та визначено рівень експресії TLR4, які відповідають за імуномодулюючий та протипухлинний ефект.

Дослідження показали, що цитокінінові фракції з грибів *Morchella esculenta*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus nebrodensis*, *Pleurotus osteratus*, *Sparassis crispa*, *Flammulina velutipes*, *Cyclocybe aegerita*, *Hericiium erinaceus* не мали пригнічувального впливу на клітини МТ-4, але показали високий рівень експресії TLR4. Проте, щодо клітин лінії НерG2, спостерігали виражений цитотоксичний ефект під впливом вищезазначених екстрактів, що призводив до загибелі клітин у 40-75% в порівнянні з контролем. Експресія TLR4 залишалася практично на рівні контролю.

Кваліфікаційна робота викладена на 53 сторінках, ілюстрована 16 рисунками та 3 таблицями. Список використаних джерел включає 45 робіт.

Ключові слова: цитокініни, культивовані гриби, тол-подібні рецептори, цитотоксичність, фітогормони, ПЛР в реальному часі, клітини лімфоїного (МТ-4) та гепатитарного (НерG2) походження

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

НepG2	– клітинна лінія гепатокарцинома людини
HeLa	– клітинна лінія ракової пухлини шийки матки людини
TK	– тейхоєва кислота
ІРТ	– ізопентенілтрансфераза
СКХ	– цитокінінооксидаза
ПКК	– природні кілерні клітини
TLRs	– тол-подібні рецептори
ПЛР	– полімеразна-ланцюгова реакція
PAMPs	– патоген-асоційовані молекули
<i>S. aureus</i>	– <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>P. Ostreatus</i>	– <i>Pleurotus ostreatus</i>
<i>M. Esculenta</i>	– <i>Morchella esculenta</i>
<i>T. Versicolor</i>	– <i>Trametes versicolor</i>
<i>P. Nebrodensis</i>	– <i>Pleurotus nebrodensis</i>
<i>S. Crispa</i>	– <i>Sparassis crispa</i>
<i>F. Velutipes</i>	– <i>Flammulina velutipes</i>
<i>C. Aegerita</i>	– <i>Cyclocybe aegerita</i>
<i>H. Erinaceus</i>	– <i>Hericiium erinaceus</i>
ГГТ	– гамма-глутамілтранспептидаза
ЗОГ	– зеатин-О-глюкозид
т-З	– транс-зеатин
ЗР	– зеатинрибозид
іП	– ізопентеніладенін

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	8
1.1. Характеристика потенційних лікарських біопрепаратів, отриманих із міцеліальної маси грибів	8
1.2. Біологічно-активна дія тейхоєвих кислот, отриманих із грам-позитивних мікроорганізмів	15
1.3. Тол-подібні рецептори як мішень імуномодуючої та протипухлинної дії.....	16
1.4. Визначення ефективності цитокінінових фракцій грибів за показниками цитотоксичності та рівня експресії Тол-подібних рецепторів... ..	19
1.5. Біологічне та екологічне значення γ -глутамілтранспептидази та грибних цитокінінів у регуляції стресових відповідей і біоремедіації.....	22
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи	26
2.1. Матеріали, реактиви та обладнання	26
2.2. Клітинні лінії	27
2.3. Підрахунок клітин у камері Горяєва	28
2.4. Оцінка рівня експресії ТЛР імунними та пухлинними клітинами за дії ТК та цитокінінових фракцій лікарських грибів.....	30
2.5. Статистичний аналіз	31
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та їхнє обговорення	32
3.1. Цитотоксична/ цитостатична дія біопрепаратів на імунні та пухлинні клітини.....	33
3.2. Визначення експресії TLR-4 в клітинах за дії цитокінінових фракцій.....	39
3.3. Вплив цитокінінів грибного походження на активність гамаглутамілтранспептидази в гепатоцитах.....	43
3.4 Кореляція між цитокініновим складом грибів і відповіддю клітин TLR-4.....	44
ВИСНОВКИ	38
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	39

ВСТУП

Використання природних сполук, включаючи біопрепарати, отриманих з рослин, грибів та мікроорганізмів, розповсюджене у багатьох сферах, таких як охорона навколишнього середовища, харчова промисловість та народна медицина. Останнім часом збільшується зацікавленість фармацевтичних підприємств у виробництві потенційних лікарських засобів природного походження, зокрема з грибів, які відіграють важливу роль у функціонуванні екосистем. Вони є цінними як продукти харчування та об'єкти для біотехнологічних досліджень. Однак збір сировини в природних умовах має свої недоліки: відсутність стандартизації у вирощуванні деяких видів рослин та грибів; підвищений вміст токсинів у місцях поширення певних видів через забруднення відходами виробництва та воєнних дій; можливість пошкодження природних місць зростання лікарських рослин та грибів від вибухонебезпечних речовин. Тому культивування грибів стає зручним методом для отримання великої кількості грибної біомаси з усіма важливими властивостями плодових тіл. В багатьох видів базидіоміцетів виявлено можливість виробництва цитокінінів, які є важливими фітогормонами, що беруть участь у регулюванні росту і розвитку клітин [1]. Цитокініни можуть бути потенційно корисні у медицині, зокрема у боротьбі з раковими пухлинами, оскільки зупиняють процес клітинного циклу та пригнічують ріст пухлинних клітин. Вивчення цитокінінів у міцеліальній біомасі базидіоміцетів може допомогти розкрити їх функціональну роль у грибах і використовувати їх як потенційні засоби терапії [2,3].

Тому, серед широкого спектру потенційних лікарських біопрепаратів розглядаються цитокініни, отримані із міцеліальної маси низки лікарських грибів. Проте вивчення позитивних ефектів, в тому числі і імуномодуляторної дії, потребує визначення токсичності цих біопрепаратів. Також, при використанні цитокінінів грибного походження в якості імуномодуляторів, важливим аспектом є визначення впливу на фенотипові та

функціональні характеристики клітин, опосередковано комунікаційними молекулами, включаючи специфічні рецептори, що є основними об'єктами дії біопрепаратів, таких як Тол-подібні рецептори (TLRs). Тому основним завданням даного дослідження є оцінка впливу цитокінінів на токсичність культивованих клітин та експресію TLRs. Для порівняння ефектів цитокінінів грибного походження на експресію TLRs як маркерну сполуку використовували тейхоєву кислоту - вже добре вивчений біопрепарат грам-позитивних мікроорганізмів штаму *Staphylococcus aureus*, дія якого досліджена як на імунні, так і на пухлинні клітини у системах *in vitro* та *in vivo*. [4, 5, 6]. У спільних дослідженнях з колегами Інституту Ботаніки імені М.Г.Холодного НАН України (д.б.н. Н.П.Веденічова та співавт, 6) було проаналізовано ряд культивованих екстрактів грибів, на антипроліферативні та морфофункціональні показники на клітинних лініях в системі *in vitro*. Однак, значення експресії TLRs в здатності впливу на клітини ссавців та людини не досліджувалось.

Тому, мета даної роботи полягала у дослідження активності низки культивованих грибів *Morchella esculenta*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus nebrodensis*, *Pleurotus osteratus*, *Sparassis crispa*, *Flammulina velutipes*, *Cyclocybe aegerita*, *Hericiium erinaceus* на експресію TLRs, активність глутатіонової системи в гепатоцитах та Т-лімфоцитах.

Завданнями дослідження було:

1. Визначення цитотоксичного/цитостатичного ефекту культивованих грибів *Morchella esculenta*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus nebrodensis*, *Pleurotus osteratus*, *Sparassis crispa*, *Flammulina velutipes*, *Cyclocybe aegerita*, *Hericiium erinaceus* на клітини ліній HepG2 та MT-4 залежно від вмісту в них цитокінінів.
2. В ПЛР аналізі в реальному часі визначити рівень експресії TLRs за дії цитокінінів на культивовані клітини різного гістогенезу.
3. Охарактеризувати активність ГГТ в клітинах гепатоцитів в

залежності від вмісту цитокінінів в міцеліальній масі культивованих грибів *Morchella esculenta*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus nebrodensis*, *Pleurotus osteratus*, *Sparassis crispa*, *Flammulina velutipes*, *Cyclocybe aegerita*, *Hericiium erinaceus*.

4. Проаналізувати рівень експресії TLR-4 та ГГТ-активність в залежності від вмісту сумарних цитокінінів та окремих їх класів.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Інтерес у вирощуванні та культивуванні рослин і грибів зростає серед науковців у різних галузях. Це стосується спеціалізацій, пов'язаних із збереженням різноманіття живого світу, особливо для рідкісних видів. Крім того, важливим напрямком є використання культур рослин та грибів для "зеленого" синтезу наночастинок. Зі зростанням інтересу до фармакологічних препаратів, які використовуються у супровідній терапії різних захворювань, стає актуальним вивчення безпеки та ефективності природних речовин як у фундаментальних, так і в клінічних дослідженнях. Особливу перспективу представляють біологічно активні сполуки, такі як фітогормони або цитокініни. У клітинах цитокініни формуються з аденіну, а згодом відбувається послідовне видалення фосфатної групи і рибози. Фермент аденозинфосфатизопентилтрансфераза відповідає за першу реакцію у біосинтезі ізопренових цитокінінів, використовуючи АТФ, АДФ або АМФ як субстрат. Гриби вважаються найбільш перспективним джерелом цитокінінів через їхні імуномодулюючі та протипухлинні властивості.

1.1 Характеристика потенційних лікарських біопрепаратів,отриманих із міцеліальної маси грибів

Гриби можуть бути альтернативним джерелом нових антимікробних речовин, зокрема вторинних метаболітів, які включають похідні бензойної кислоти, хінолони, стероїди, терпени, антрахінони тощо, а також деякі первинні метаболіти, наприклад, білки, щавлева кислота та пептиди. Гриби виробляють широкий спектр вторинних метаболітів, які охоплюють не лише фенольні сполуки, терпени, полікетиди та стероїди, а й інші групи через їхній метаболізм. Крім того, гриби є джерелом полісахаридів, які відзначаються імуностимулюючими та протипухлинними

властивостями.

У світі найбільш широко культивованими грибами є *Agaricus bisporus*, а також *Flammulina velutipes* і *Lentinus edodes*. Виробництво грибів постійно зростає, особливо в країнах Азії, найбільш поширеними є виробництва грибної біомаси у Китаї, який є світовим лідером. Також гриби є найбільш поширеним класом організмів, що зустрічаються від арктичних до тропічних регіонів. Деякі види грибів виявляються в основному в обмежених географічних областях, тоді як інші існують у віддалених географічних районах. Проте існують і види, які віддають перевагу конкретним типам середовища, є біоіндикаторами певних екосистем. Гриби можуть існувати в болотах або гірських лісах, на відкритих просторах, таких як пасовища, сади та галявини, а також на деревах або мертвому листі, або ж в підстилці. Під час пандемії, споживання грибів зросло, оскільки регулярне вживання природних продуктів, таких як *Grifola frondosa*, *Inonotus obliquus* і *Lentinula edodes*, з ефективними протизапальними та противірусними властивостями, зменшило дію SARs- CoV- 2, оскільки біологічно активні сполуки, що продукуються грибами є альтернативним джерелом противірусного захисту.

Деякі гриби, такі як *Trametes versicolor*, *Schizophyllum commune*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Phellinus linteus*, *Lentinus edodes*, *Cordyceps sinensis*, *Inonotus obliquus* та *Grifola frondosa*, відзначаються пригнічувальними ефектами щодо раку та імуномодулюючою дією, переважно через підвищення імунітету господаря.

До потенційних лікарських грибів, які зараз знаходяться на стадії активного дослідження є гриби роду *Morchella esculenta*, *Pleurotus osteratus*, *Pleurotus nebrodensis* а також *Flammulina velutipes*, *Cyclocybe aegerita*, *Sparassis crispa*, *Trametes versicolor* та *Hercium erinaceus*.

Morchella відноситься до сімейства *Morchellaceae*. Їх налічується близько 80 різних видів; один з них - *Morchella esculenta*, який має діаметр ворсу від 3 до 5 см і довжину від 4 до 8 см. Цей вид грибів від півкулястої до яйцевидної форми, блідо-коричнево-кремового та блідо-

коричневого до сірувато-коричневого кольору. Його поверхня вкрита нерівномірно переплетеними ямками кількох кольорів або округлими ямками. *Morchella esculenta* один із їстівних сморчкових грибів, широко відомих як зморшок. Цей гриб використовується в харчовій промисловості а також в медицині.

Morchella esculenta виявляє протизапальну та протипухлинну активність. А метанольні екстракти, отримані з її міцелію, демонструють високий вміст загальних фенолів, а також високу антиоксидантну активність[13,14].



A



B

Рис 1. А – *Morchella esculenta*, В – *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus — рід зяберних грибів і належить до родини *Pleurotaceae*. Вид *Pleurotus ostreatus* також відомий як морське вушко, деревний або устричний гриб і є їстівним грибом. Цей гриб також використовується для мікоремедіації та є ефективним проти паразитів, зокрема нематод. Цей гриб здебільшого культивують на соломі та інших середовищах. Він має гіркувато-солодкий аромат бензальдегіду, здебільшого росте на деревині полицеподібними гронами. *Pleurotus ostreatus*, має форму устриці та широку шапку від 5 до 25 см. Колір від темно-коричневого або від білого до сірого. Цей гриб має деякі біологічні ефекти завдяки наявності деяких харчових композицій, включаючи антихолестеринні, протипухлинні,

протівірусні, протидіабетичні, антиоксидантні, антибактеріальні та антиартритні та ін. [15].

Flammulina velutipes, також відомий як енокі або зимовий гриб – це їстівний гриб, що належить до родини *Physaraceae*. Він росте на стовбурах дерев, особливо листяних, і має довгі, тонкі ніжки з білими або коричневими шапками.

Flammulina velutipes має м'який, злегка солодкий смак і хрустку текстуру. Його можна вживати свіжим, сушеним або маринованим. Енокі багатий на білок, вітаміни та мінерали. Він містить сполуки, які мають антиоксидантні, протимікробні, протиракові та імуномодулюючі та інші властивості [16]. *Flammulina velutipes* використовується в традиційній китайській медицині для лікування різних захворювань, включаючи рак, інфекції та діабет. Енокі можна вирощувати в домашніх умовах на колодах або інших субстратах. Шапка має форму дзвоника або конуса з гладкою або злегка зморщеною поверхнею. Її діаметр може варіюватися від 2 до 5 см. Ніжка довга і тонка, 5-15 см завдовжки, біла або коричнева. *Flammulina velutipes* росте пучками на стовбурах дерев, особливо листяних.

Cyclocybe aegerita – це їстівний гриб, що належить до родини *Agaricaceae*, відомий як луговий опеньок. Він росте на лугах, полях і пасовищах і має білі або кремові шапки з довгими, тонкими ніжками. *Cyclocybe aegerita* має приємний смак і аромат, схожий на шампіньйон, і його можна вживати в їжу свіжим, сушеним або маринованим. Луговий опеньок багатий на білок, вітаміни та мінерали. *Cyclocybe aegerita* використовується в традиційній медицині для лікування різних захворювань, таких як інфекції та запалення різної етіології. Луговий опеньок можна вирощувати в домашніх умовах на компості або інших субстратах. Шапка має форму конуса або дзвоника з гладкою або злегка зморщеною поверхнею. Її діаметр може варіюватися від 3 до 10 см. Ніжка довга і тонка, 5-15 см завдовжки, біла або кремова. *Cyclocybe aegerita* росте пучками на лугах, полях і пасовищах.



А



В

Рис 2. А - *Flammulina velutipes*, В – *Cyclocybe aegerita*

Sparassis crispa (Кучерявий гриб, або Листочня кучерява) — їстівний гриб, що належить до родини *Sparassidaceae*, відомий як деревна цвітна капуста. Він має характерну кучеряву структуру, що нагадує цвітну капусту або локшину, з кремово-білими або світло-жовтими краплями. Зазвичай цей гриб росте на коренях або біля основи хвойних дерев у таких регіонах як: Північна Європа, Азія та Північна Америка. Листочня кучерява має приємний смак і хрустку текстуру, особливо коли він ще молодий і свіжий. Проте вживати в їжу гриб можна тільки після ретельного очищення від лісового забруднення землею, яке часто застряє в його складках. *Sparassis crispa* відомий своїми лікувальними властивостями завдяки високому вмісту β -глюканів, що забезпечують протипухлинну, імуномодулюючу, антиоксидантну та протизапальну дію [39].

Trametes versicolor або Траметес різнобарвний – лікарський гриб із родини *Polyporaceae*, широко відомий також під назвою індичий хвіст [40] через свої характерні плями різних кольорів зі сторони плодового тіла. Росте цей гриб на мертвій деревині листяних дерев, утворюючи жорсткі та віялоподібні плодові тіла, є сапрофітом. Хоча гриб не споживається безпосередньо в їжу через свою жорстку текстуру, його часто використовують для приготування чаїв, настоянок або порошоків, особливо розповсюджений у китайській традиційній медицині для лікування раку

легень [41].

Hericium erinaceus, відомий також як лев'яча грива або голова мавпи – їстівний гриб із родини *Hericiaceae*, має таку незвичайну назву через свої довгі та білі звисаючі шипи, що нагадують гриву лева. Він росте на мертвій або ослабленій деревині листяних дерев, таких як: дуб, бук або платан, а географія *Hericium erinaceus* обіймає загалом північні частини Америки та Євразії. Гриб має ї ніжну текстуру та смак, схожий на морепродукти, особливо на креветки, що робить його популярним інгредієнтом у кулінарії. *Hericium erinaceus* багатий на β -глюканові полісахариди, які сприяють протипухлинній, імуномодулюючій, антиоксидантній та нейропротекторній дії. Він також широко використовується в китайській традиційній медицині [42].

Зважаючи на різноманіття грибів в природних екосистемах, на сьогодні зростає інтерес до різних видів грибів, як важливих компонентів екосередовищ та можливих біоіндикаторів забруднення, оскільки гриби всмоктуючи різні токсиканти можуть виконувати і роль природніх деструкторів токсичних речовин.



Рис 2.1. А – *Trametes versicolor*, В – *Sparassis crispa*, С – *Hericium erinaceus*

Однак, проблема з накопиченням токсикантів в грибах не дає змоги в повній мірі їх використовувати як природню сировину для отримання продуктів широкого вжитку. Зацікавленість фармацевтичних компаній в грибах як біодеструкторах запальних процесів на сьогодні є достатньо актуальним завданням. Проте це потребує іноваційних технологій для вирощування грибної біомаси в штучно створених умовах з метою унеможливлення від накопичення в грибній масі токсикантів, які є в природньому середовищі, обтяженому антропогенним впливом різної степені.

1.2 Біологічно-активна дія тейхоєвих кислот, отриманих із грам- позитивних мікроорганізмів

До актуальних досліджень міжвидової комунікації відносять мікроорганізми, які є потенційними регуляторами імунної відповіді на їх фенотипові поверхневі молекули. В якості типової взаємодії мікроорганізмів та клітин пухлинного походження з визначення рівня експресії TLR було досліджено комунікаційну взаємодію тейхоєвої кислоти з клітинами раку легені чутливими та резистентними до хіміопрепаратів. З метою підвищення імунногеності вакцинних препаратів в протипухлинній терапії дуже часто використовують в якості ад'ювантів ліганди toll-like рецепторів. Цими лігандами найчастіше виступають компоненти бактеріальних клітин – патоген асоційованні мікробні структури (PAMS). До таких структур відносяться компоненти грампозитивних мікроорганізмів – тейхоєві кислоти (ТК). Взаємодія ТК і ЛТК зі специфічними рецепторами призводить до активації продукції цитокінів. Причому, в залежності від дози ліганду, можлива активація як прозапальних, так і протизапальних цитокінів[17].

Антиканцерогенний вплив ТК підтверджується цілою низкою досліджень. Показано, що ТК клітинної стінки багатьох бактерій є відповідальними за підсилення реакції гіперчутливості, у великих концентраціях інгібує синтез антитіл і здатні активувати клітинну цитотоксичність, стимулювати продукцію TNF α . Було виявлено, що тейхоєва кислота, зумовлює секрецію цитокінів T α 1- типу, які активують Т-лімфоцити та ПКК (природних кілерніклітини), а також здатна змінювати цитотоксичний потенціал лімфоцитів з природною кілерною активністю. Непряма токсична дія бактеріальних клітин або їх компонентів по відношенню до пухлин здійснюється шляхом рекрутування ефекторів імунної системи і перехресній презентації пухлинних антигенів З іншого боку, ТК стимулює проліферативну активність як нормальних, так і іморталізованих лімфоїдних клітин.

Екологічні аспекти сучасної біології та медичної генетики чим може спричиняти прогресію лімфопроліферативних захворювань. Було показано, що ТК залежно від терміну введення, модифікує ріст первинної пухлини та рівень метастатичного ураження перещеплюваної карциноми легень Льюїс.

Тейхоева кислота має антиканцерогенну дію, яку підтверджують різноманітні дослідження. Виявлено, що компоненти клітинної стінки багатьох бактерій, які містять ТК, відповідають за підсилення гіперчутливості, інгібування синтезу антитіл, активацію клітинної цитотоксичності та стимуляцію продукції $TNF\alpha$. ТК є потенційною поверхневою структурою, що індукує секрецію ІЛ-12 залежним від CD14 шляхом моноцитів, що призводить до активації ПКК та вироблення α -ІФН. Крім того, ТК стимулює проліферацію нормальних та іморталізованих лімфоїдних клітин, що може сприяти прогресії лімфопроліферативних захворювань

1.3 Тол-подібні рецептори як мішень імуномодулюючої та протипухлинної дії

Цитокиніни в основному впливають на процес поділу клітин, але в певних випадках також можуть регулювати їх міграцію. Вони відповідальні за контроль останнього етапу поділу, який називається цитокінезом, тобто розділенням самої клітини. Також цитокиніни сприяють виразній активації певного білка, відомого як циклін, і сприяють переходу з фази постсинтетичної стадії клітинного циклу (G2) до мітозу. Багато біологічно активних речовин активують поверхневі рецептори, відомі як тол-подібні рецептори (TLRs). Імовірно, що грибні екстракти, що містять цитокиніни, використовують механізм активації клітинної відповіді через TLRs, які є основними молекулами-мішенями.

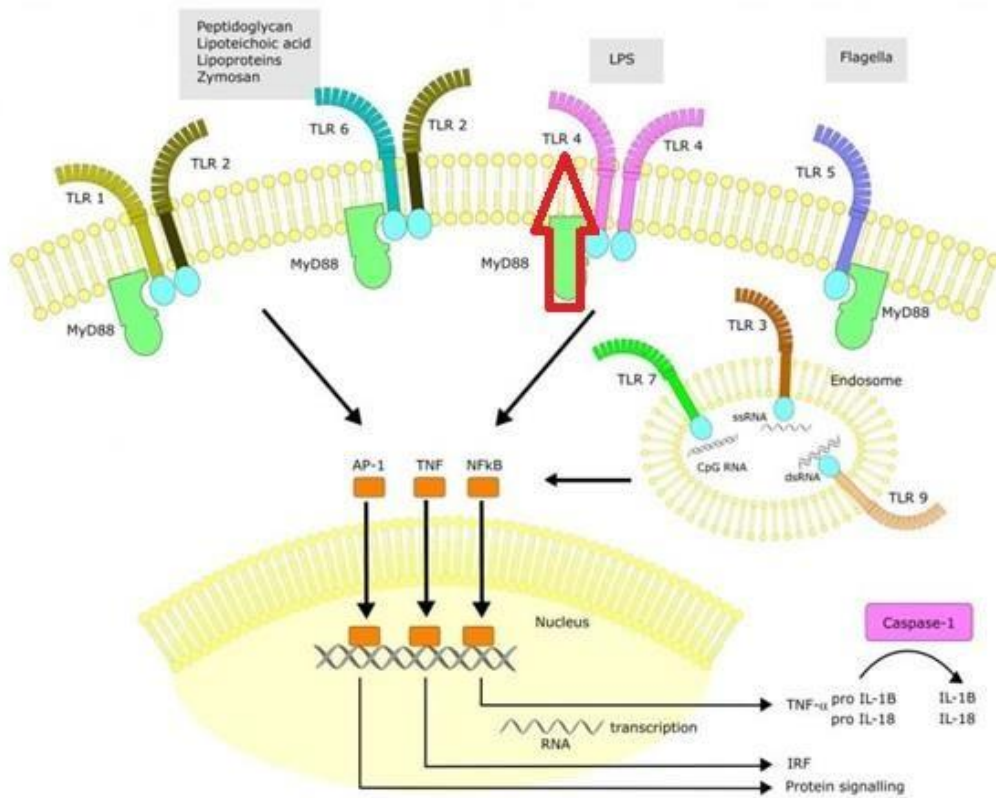


Рис. 2.2. Схема активації Толл-подібних рецепторів (стрілкою вказано TLR-4) [17]

TLRs – це клас рецепторів, які присутні на клітинних мембранах різних типів імунних клітин, таких як макрофаги, дендритні клітини і нейтрофіли. Вони грають ключову роль у виявленні патогенних мікроорганізмів, таких як бактерії, віруси та грибки, та сприяють ініціюванню імунної відповіді організму. TLRs спілкуються з патоген-асоційованими молекулами (PAMPs), що присутні на поверхні мікроорганізмів або вірусів. При зв'язуванні PAMPs з TLRs відбувається активація послідовності сигнальних подій, що призводить до запуску імунної відповіді.

Це включає вироблення протизапальних цитокінів, активацію макрофагів та стимуляцію імунної системи для боротьби зі збудниками. Одним із важливих окрім своєї ролі в імунітеті проти інфекцій, TLRs також можуть мати протипухлинну дію. Вони визначаються на клітинах імунної системи, а також на клітинах пухлинного походження. Активація TLRs на пухлинних клітинах може впливати на різні процеси, пов'язані з ростом,

прогресією та імунною втечею пухлини. Вона може сприяти виробленню протизапальних цитокінів, активації цитотоксичних клітин і імунологічного контролю над пухлинами.

Таким чином, TLRs виступають як мішені для імуномодуючої дії та протипухлинного лікування. Стимуляція TLRs може сприяти покращенню імунної відповіді організму на інфекційні агенти і контролю росту пухлин. Дослідження в галузі TLRs продовжуються з метою розробки нових імуномодуючих терапій та протипухлинних стратегій.

Важливим із родини Тол-подібних рецепторів є TLR-4, який активується специфічним антигеном – ліпополісахаридом присутнім на грам позитивних мікроорганізмах

Тол-подібні рецептори (TLRs) є класом рецепторів, які виявляються на клітинних поверхнях різних типів імунних клітин, зокрема на макрофагах, дендритних клітинах і нейтрофілах. Вони грають важливу роль у виявленні патогенних мікроорганізмів, таких як бактерії, віруси та грибки, та ініціюють імунну відповідь організму

TLRs взаємодіють з патогенними молекулами, відомими як патоген-асоційовані молекули (PAMPs), які присутні на поверхні мікроорганізмів або у вірусах. При зв'язуванні PAMPs з TLRs запускається каскад сигнальних подій, які призводять до включення імунної відповіді. Це включає вироблення протизапальних цитокінів, активацію макрофагів та стимуляцію імунної системи для боротьби зі збудниками.

Окрім своєї ролі в імунитеті проти інфекцій, TLRs також можуть мати протипухлинну дію. Вони визначаються на клітинах імунної системи, а також на клітинах пухлинного походження. Активація TLRs на пухлинних клітинах може впливати на різні процеси, пов'язані з ростом, прогресією та імунною втечею пухлини. Вона може сприяти виробленню протизапальних цитокінів, активації цитотоксичних клітин і імунологічного контролю над пухлинами.

Таким чином, TLRs виступають як мішені для імуномодуючої дії та протипухлинного лікування. Стимуляція TLRs може сприяти покращенню імунної відповіді організму на інфекційні агенти і контролю росту пухлин. Дослідження в галузі TLRs продовжуються з метою розробки нових імуномодуючих терапій та протипухлинних стратегій.

1.4 Визначення ефективності цитокінінових фракцій грибів за показниками цитотоксичності та рівня експресії Тол-подібних рецепторів

Для того щоб дослідити функціональну активність певного органу, дуже часто використовують клітинні лінії з маркерами подібності та гістогенезом досліджуваної тканини. До клітин з маркерами гепатоцитів відносять ряд клітинних культивованих ліній, в тому числі Hep-G2 - лінія клітин печінки людини, яка була отримана з печінкової тканини 15-річного хлопчика з гепатоцелюлярною карциномою. У 2013 році рак печінки був діагностований у понад 350 000 людей, і після діагнозу сталося понад 160 000 смертей. Гепатоцелюлярна карцинома є п'ятим найпоширенішим раком у всьому світі.

Клітини виділяють різні основні плазмові білки, наприклад, трансферин і плазміноген. Ці клітини успішно вирощуються в системах культивування великого масштабу. Hep-G2 це постійна лінія клітин, яка не формує пухлини у безтимусних мишей.

Основні плазмові білки, що виділяються клітинами, включають альбумін, трансферин, фібриноген, альфа-2 макроглобулін, альфа-1 антитрипсин та плазміноген [18]. Hep-G2 реагує на стимуляцію гуманним гормоном росту. Клітини є адгерентними епітеліальними клітинами, які ростуть у вигляді моношарових маленьких агрегатів, кожен з яких містить 55 пар хромосом. Hep-G2 може використовуватися як *in vitro* модельна система для вивчення поляризованих гепатоцитів людини. З відповідними умовами

культивування, клітини Hep-G2 відобразатимуть виражену морфологічну та функціональну диференціацію з контрольованим утворенням апікальних та базолатеральних поверхонь клітин, які нагадують жовчні каналікули та синусоїдальні області *in vivo*. Завдяки їх високому рівню морфологічної та функціональної диференціації *in vitro*, клітини Hep-G2 є відповідною *in vitro* моделлю для вивчення внутрішньоклітинного транспорту та динаміки білків та ліпідів мембран жовчних каналікулів та синусоїдальних мембран у гепатоцитах людини. Це важливо для дослідження хвороб печінки людини, які виникають через неправильний субклітинний розподіл білків клітинної поверхні.

Для визначення імуномодуляторної дії використовують клітини з маркерами Т-лімфоцитів, серед яких є клітинна лінія MT-4 - лінія перетворених Т-клітин, отриманих з периферичних лімфоцитів крові пацієнта з лімфомою Т-клітин. Ця лінія широко використовується як модельна система для вивчення інфекції вірусом лейкемії Т-клітин типу 1 людини (HTLV-1) та патогенезу зв'язаних з ним хвороб, зокрема лейкемії/лімфоми Т-клітин дорослих. Клітини MT-4 були одержані з периферичних лімфоцитів крові пацієнта з лімфомою Т-клітин. Трансформацію цих клітин спричиняє наявність HTLV-1, ретровірусу, пов'язаного з т-клітинною лейкемією.

Клітини MT-4 ростуть у суспензії та легко підтримуються в культурі *in vitro*. Час подвоєння клітин становить приблизно 24-48 години в залежності від умов культивування. Клітини мають круглу або овальну форму та лімфобластичний вигляд. Вони мають відносно невеликий розмір діаметром приблизно 10-15 мікрометрів. Дослідницьке застосування MT-4 широко пов'язане з використанням в дослідженнях, пов'язаних з інфекцією HTLV-1 та ATL. Клітинна лінія є важливим інструментом для вивчення патогенезу вірусу, імунних реакцій, реплікації вірусу, скринінгу противірусних препаратів та розробки потенційних терапевтичних методів для хворілих патологій.

Саме тому ці дві клітинні лінії було обрано для дослідження цитокінінових фракц. Відомо, що протягом багатьох століть, гриби використовувалися не лише як їжа, але й як засоби лікування різних хвороб, завдяки своїм лікувальним властивостям. Однак, вони також можуть бути небезпечними, спричиняючи хвороби в різних організмах. Тому, і створено ряд напрямків досліджень для отримання культивованих грибів на штучних субстратах, які можна тестувати на безпечність. Гриби різних таксономічних та трофічних груп здатні продукувати цитокініни, дослідження яких розпочалися ще 50 років тому, але досі не існує однозначної думки про функції, які вони виконують у регуляції процесів росту та розвитку цих організмів. Більшість грибів взаємодіють з рослинами, створюючи асоціації симбіозу або паразитизму. У обох випадках для зміни у свою користь метаболізму рослини-господаря, гриби використовують цитокініни [19].

До класу цитокінінів належать похідні аденіну, біологічна активність і функції яких залежать від варіацій структури бічного ланцюжка та кон'югації. Якісний склад і кількісний вміст цитокінінів значно варіюють в залежності від типу тканин, виду рослин, стадії розвитку та умов оточуючого середовища[20].

Здатність виробляти цитокініни спостерігається як у плодових тілах, так і у міцеліальній масі деяких лікарських грибів. Це дає підстави припускати, що лікувальні властивості грибів залежать від цитокінінів, які вони синтезують, а також специфічних метаболітів, характерним самим грибам. Однак, медичні випробування цитокінінів ще тільки почалися, і більш детальна інформація про їх дієвість наразі відсутня. Тому в дослідженнях, часто використовують клітини культивовані для визначення механізмів дії цитокінінів

Відомо, що у рослинних клітинах цитокініни виступають як позитивні регулятори поділу клітин [21], тоді як у клітинах тварин та людини вони мають протилежну дію. Додавання цитокінінів до культур пухлинних клітин спричиняє блокування клітинного циклу та індукцію апоптозу. Цитокініни

можуть також впливати на актиновий цитоскелет, аутофагоцитарну систему та протеїназну активність клітин. Вивчення їх функціонального значення в ракових захворюваннях показало, що рибозидні форми цитокінінів мають найбільшу протипухлинну активність. Загалом, цитокініни проявляють цитотоксичну та імуномодуючу дію, і розглядаються як перспективні біологічно активні сполуки з високим потенціалом у лікуванні. Однак велика кількість невідомих механізмів дії цитокінінів, потребує порівняльної характеристики впливу добре досліджених біокомпонентів.

1.5 Біологічне та екологічне значення γ -глутамілтранспептидази та грибних цитокінінів у регуляції стресових відповідей і біоремедіації

Gamma-глутамілтранспептидаза (γ -глутамілтранспептидаза, або скорочено ГГТ) являє собою мембранозв'язаний фермент, який має ключову роль у метаболізмі глутатіону, який є одним із найважливіших антиоксидантів у клітинах ссавців. ГГТ каталізує передачу γ -глутаміл-групи від глутатіону до акцептора, яким може бути інша амінокислота, пептид або вода, із утворенням γ -глутаміл-з'єднання і цистеїнілгліцину [33]. Переважна біологічна роль ГГТ полягає в розщепленні позаклітинного глутатіону (GSH), таким чином, забезпечуючи амінокислоти для ресинтезу глутатіону всередині клітини. Отже, ГГТ підтримує гомеостаз глутатіону, грає роль у детоксикації ксенобіотиків і є ключовим компонентом антиоксидантного захисного механізму клітини [34]. ГГТ здебільшого розміщується на зовнішній мембрані клітин, особливо в епітеліальних тканинах, таких як печінка, нирки, підшлункова залоза та жовчні протоки. У печінці він керує глутатіональним метаболізмом та ліпідним метаболізмом, а також є важливим біомаркером для визначення функціонального стану гепатоцитів [35]. Ширший діапазон значимості ГГТ проявляється за антиоксидантним щитом, а підвищення активності ГГТ пов'язують із онкогенезом, а також із розвитком фіброзу печінки, неалкогольного стеатогепатиту (НАСГ),

алкогольного ураження печінки і кардіометаболічних порушень [36]. Визначення активності ГГТ широко застосовується в клінічній діагностиці як маркер функціонального стану печінки та жовчних шляхів. Підвищення її активності в сироватці крові часто вказує на ушкодження гепатоцитів, холестаза або токсичну дію певних лікарських препаратів [37].

Вивчення ефективності ферменту γ -глутамілтранспептидази (ГГТ) у контексті взаємодії цитокінінів грибного походження з клітинами ссавців має не лише біомедичне, але й значне екологічне значення, адже ГГТ є ферментом II фази біотрансформації ксенобіотиків і належать до класу трансфераз. Трансферази функціонують у всіх клітинах, проте метаболізують лише ті сполуки, які мають функціональні групи. Переважно знаходяться в цитоплазмі клітин, за винятком глюкуронілтрансфераз та ацилтрансфераз, які зосереджені в ЕПР та мітохондріях. У другій фазі біотрансформації ксенобіотиків і токсинів природнього походження проміжні метаболіти перетворюються до нетоксичних водорозчинних сполук. Основні ферменти, залучені у другій фазі трансформації ксенобіотиків - N-ацетилтрансферази, глутатіон-S-трансферази, глюкуронозилтрансферази та метилтрансферази. Під час другої фази утворюються водорозчинні кон'югати токсинів з глюкуроною, сірчаною, оцтовою кислотами та іншими ендогенними молекулами. Підвищення гідрофільності ксенобіотиків робить їх більш доступними для дії ферментів. У сукупності ферменти I та II фаз біотрансформації чужорідних речовин називаються ферментами, що метаболізують ксенобіотики (ФМК).

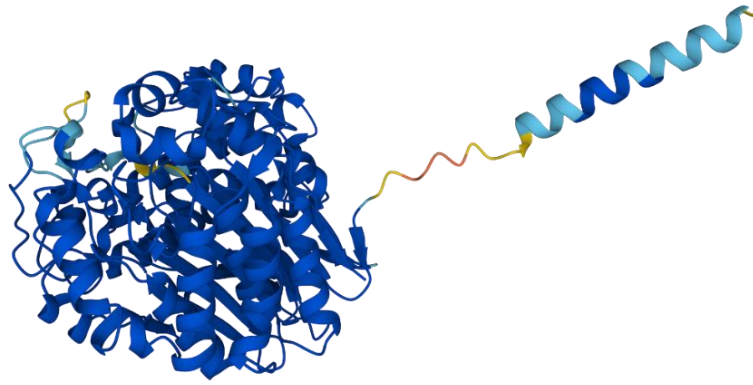


Рис. 2.3. Структура глутатіонгідролази 1 у формі проензиму (GGT1) [38]

γ -Глутамілтранспептидаза (ГГТ) є ключовим ферментом у метаболізмі глутатіону — основного антиоксиданту в клітинах еукаріотів. ГГТ регулює рівень глутатіону, сприяючи підтриманню редокс-гомеостазу та захисту клітин від окислювального стресу. Підвищена активність ГГТ асоціюється з підвищеною стійкістю клітин до окислювального стресу та швидшим ростом, що має значення в умовах запалення та прогресування пухлин [43].

У контексті біоремедіації, гриби, здатні продукувати ГГТ, можуть сприяти детоксикації забруднених середовищ, знижуючи рівень окислювального стресу в локальних екосистемах. Це відкриває можливості для використання грибів як біоремедіаційних агентів у очищенні ґрунтів та вод від токсичних речовин.

Цитокініни, фітогормони, що також продукуються деякими грибами, відіграють важливу роль у регуляції росту та розвитку рослин, а також у відповіді на стресові фактори. Дослідження показали, що цитокініни можуть інгібувати розвиток та вірулентність фітопатогенних грибів, таких як *Botrytis cinerea*, шляхом впливу на цитоскелет та клітинний транспорт та можуть модулювати енергетичний метаболізм грибів, що впливає на їхню здатність до інфекції [44].

Взаємодія між грибами та рослинами, опосередкована цитокінінами, може покращити стратегії відновлення ґрунтів та підвищити стійкість

агроекосистем до стресових умов. Наприклад, ендofітні гриби можуть сприяти толерантності рослин до біотичних та абіотичних стресів, таких як засолення, важкі метали та посуха, шляхом секреції антиоксидантів та регуляції гормонального балансу [45].

Таким чином, розуміння механізмів дії ГГТ та цитокінінів грибного походження відкриває нові перспективи для розробки екологічно безпечних біостимуляторів та біоремедіаційних стратегій, спрямованих на підтримку та відновлення екосистем.

Проте, поширення грибів з потенційно важливими смаковими та фармацевтичними якостями потребують фундаментальних досліджень з визначення їх безпечності у застосуванні в таких прикладних сферах широкого вжитку. Як альтернатива використовують культивовані гриби, вирощені в стандартизованих умовах субстратів, що не містять токсикантів, які можуть бути поширеними в природних умовах з антропогенним навантаженням. О застосування в прикладних напрямках потребує додаткових експериментальних досліджень з оцінкою заданих властивостей, що вказують на їх ефективність як імуномодуляторів та регуляторів метаболізму в клітинах людини.

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Матеріали, реактиви та обладнання

Для того, щоб виконати дослідження, нам знадобилось:

1. Інвертований мікроскоп AxioVert-40 з програмним забезпеченням AxioVision
2. Фотозйомку клітинних препаратів здійснювали за допомогою цифрової фотокамери Digital Still Camera з об'єктивом Carl Zeiss Vario- Sonar.
3. Центрифугата центрифужні пробірки – для того, щоб осадити та відокремити клітини;
4. Шафа -ламінар (LS, ламінарні системи),
5. CO₂-інкубатор (Medcenter Einrichtungen GmbH MMM-Group),
6. Камера Горяєва – для підрахунку живих та мертвих клітин.
7. Фосфатно-сольовий буферний розчин, pH 7,4: 1,5 mM – K₂HPO₄, Na₂HPO₄ – 8,1 mM, KCl – 2,7 mM, NaCl – 140 mM – для центрифугування та промивання клітин;
8. Середовище RPMI-1640 (Sigma, США) з додаванням міксу антибіотиків – для культивування клітин;
9. Розчин барвника трипанового синього 0,2% – для підрахунку живих та мертвих клітин у камері Горяєва;
10. Диметилсульфоксид (Sigma, США) – для фіксації клітин та використання його у вигляді криопротектора при заморожуванні клітин
11. Барвники Май-Грюнвальда (азур-еозин та гематоксилін Бемера) - для зафарбовування клітин
12. 12-лункові планшети, (“Nunclon”, Данія) – для культивування клітин використовували стерильні.

2.2 Клітинні лінії

Нер-G2 – Клітинна лінія гепатокарциноми людини(Каталожний номер 85011430 Sigma ECACC Cell Line; Sigma, St. Louis, MO).

MT-4 – клітинна лінія Т-лімфоцитарного походження людини, люб'язно надана для дослідження Д-р Завелевичем Михайлом Петровичем.

Для культивування клітин в системі *in vitro* використовувалися стандартні підходи. Клітини були культивовані в пластикових флаконах та пересаджувались для визначення ефективності цитокінінових фракцій в повному поживному середовищі за стандартних умов. Збір клітин проводився в стерильних умовах в ламінарному боксі з вертикальним повітряним потоком. Кількість клітин у суспензії та їхню життєздатність підраховували за допомогою камери Горяєва, використовуючи 0,4% розчин трипанового синього в фосфатно-сольовому буфері.

Клітини інкубувалися в стандартному клітинному інкубаторі при температурі 37°C, 100% вологості та 5% рівні CO₂. Поживне середовище DMEM містило 10% FBS. Додавання до клітинний ліній НерG2 і MT4 цитокінінових фракцій лікарських грибів .

Умови культивування клітин з цитокініновими фракціями грибів
В дослідженнях використано наступні види грибів люб'язно надані Д-ром Веденичовою Н.П (Інститут Ботаніки ім.М. Холодного Національної Академії наук України)

- 1) *Morchella esculenta* – штам 1755
- 2) *Trametes versicolor* – штам 353
- 3) *Pleurotus nebrodensis* – штам 551
- 4) *Pleurotus osteratus* - штам 2035
- 5) *Sparassis crispa* – штам 314
- 6) *Flammulina velutipes* – штам 1878
- 7) *Cyclocibe aegerita* – штам 960
- 8) *Hericiium erinaceus* – штам 991

Ці фракції були проаналізовані співробітниками Інституту ботаніки ім.М.Г. Холодного [6] на наявність цитокінінів, які були присутні в цих екстрактах:

- т-З – транс-зеатин,
- ЗР – зеатинрибозид;
- іПа – ізопентеніладенозин,
- іП – ізопентеніладенін,
- ЗОГ – зеатин-О-глюкозид та надані для дослідження.

Після добового адаптаційного періоду до клітин додавали зразки за наступною схемою:

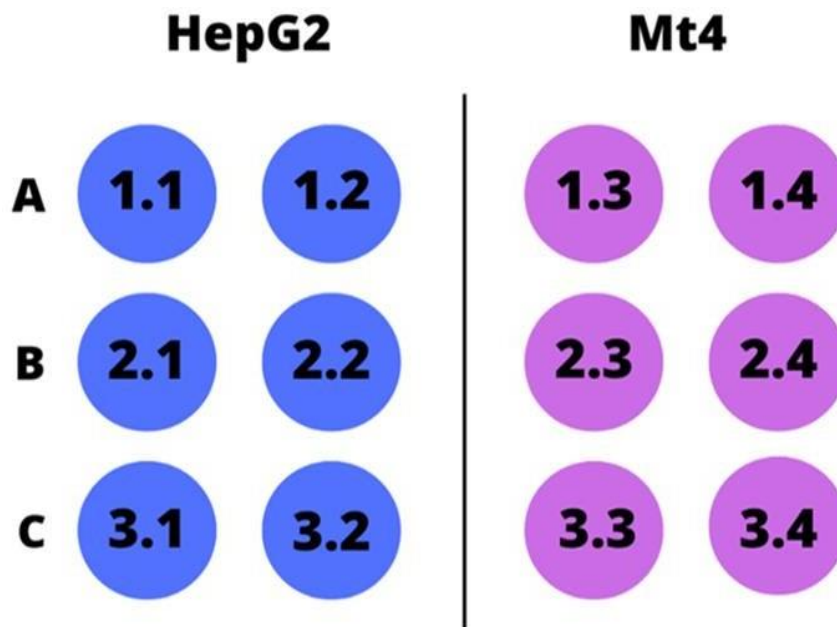


Рис 2.4. Схема розташування культивованих клітин НерG2 та МТ4 з внесеними цитокініновими фракціями лікарських грибів на 12-лунковому планшеті

2.3 Підрахунок клітин у камері Горяєва

Перед роботою предметне скло камери та шліфоване покривне скло добре промивали під водопровідною водою, прополіскували дистильованою водою та витирали насухо.

Після покриття камери покривним склом із-за появи райдужних "ньютонівих" кілець, було відібрано аліквоту клітин у фізіологічному розчині об'ємом 50 мкл. До цього додавали 50 мкл 0,4% розчину барвника трипанового синього, щоб отримати кінцевий вміст барвника в розчині 0,2%. Після 5- хвилинного профарбовування клітини були ретельно перемішані і автоматичною піпеткою перенесені в притерту камеру Горяєва під покривним склом. Надлишок розчину був видалений за допомогою фільтрувального паперу.

Кількість клітин підраховувалась під об'єктивом x10. Підрахунок проводили у п'яти наборах з 16 малих квадратів, розташованих в кожному куті центральної заштрихованої області. Кількість клітин була порахована і поділена на 5, отримуючи середнє число клітин в 1 мм². Далі розраховувалась кількість клітин в 1 мл фізіологічного розчину.

Загальна формула для підрахунку клітин в камері Горяєва має вигляд: $X = (a \times 4000 \times v) / b$, де X - кількість клітин в 1 мл; a - сума клітин, порахованих в певному об'ємі камери; b - кількість порахованих малих квадратів; v - розведення клітинної суспензії.

2.4 Оцінка рівня експресії ТЛР імунними та пухлинними клітинами за дії ТК та цитокінінових фракцій лікарських грибів

Дослідження з визначення експресії Тол-подібних рецепторів проводили в лабораторії Експериментальної онкології Національного Інституту раку МОЗ

України з люб'язної згоди завідувачки лабораторії, д.б.н.Храновської Н.М. Рівень експресії TLR-4, оцінювали методом ПЛР у реальному часі на 7500 Real-Time PCR Systems («Applied Biosystems», США) з використанням специфічних праймерів та флуорохрому SYBR Green («Applied Biosystems», США). Гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase –GADPH) використовували для нормалізації рівнів мРНК для методу відносного кількісного аналізу. Послідовності TLR-4, були сконструйовані за допомогою Primer Express Software 3.0 (Applied Biosystems, США) (табл. 2.1).

Розрахунки проводили методом відносної кількісної оцінки ΔC_t . Усі тести проводили в трьох повторях.

Тотальну РНК виділяли фенол-хлороформною екстракцією загальноприйнятим методом. Концентрацію РНК у всіх зразках вимірювали ThermoScientific NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific, США) і зразки розбавляли до 200 нг/мкл. кДНК отримували з сумарної РНК методом RT-PCR з використанням «High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit» (Applied Biosystems, США). Реакцію зворотної транскрипції проводили за таких умов: 25°C - 10 хв, 37 °C - 120 хв і 85 °C - 5 хв. ДНК розводили в 2 рази ДНК-буфером.

Таблиця 2.1

Характеристика праймерів для проведення експерименту

Зразки	Послідовність праймерів	Температура віджигу (T _m), °C	Концентрація праймерів (mM)
GADPH	f- GCCAAGGTCATCCATGACAACSTTTGG r- GCCTGCTTCACCACSTTCTTGATGTC	60	0.25
TLR-4	f- AAATTTCCGCTTCCTGGTCT r- TCAGCCCATATGTTTCTGGA	60	0.25

2.5 Статистичний аналіз

Результати експериментів були оброблені за допомогою широко використовуваних статистичних методів. Для цього були розраховані середні арифметичні значення (M) та їх похибки (m) в обсягах вибірок, які склалися з n об'єктів. Для виявлення значущих відмінностей між середніми був використаний t -критерій Стьюдента. Усі математичні обчислення були проведені з використанням стандартних пакетів комп'ютерних програм. Крім того, для аналізу даних та побудови графіків використовувались програми Microsoft Excel та Statistica 7.0.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Молекули цитокінінів в еволюційному відношенні дуже консервативні, вони присутні як у вільній формі, так і у складі тРНК у найрізноманітніших груп організмів: бактерій, нижчих та вищих рослин, грибів, нематод, комах, людини [23].

Останнім часом зростаюча зацікавленість з'явилась у дослідників щодо використання цих фітогормонів як потенційних лікарських засобів в протипухлинній терапії [24]. В дослідженнях авторів на ряді клітинних ліній зі злякисним фенотипом було зафіксовано онкостатичний ефект низки грубих екстрактів та цитокінінових фракцій лікарських грибів [25-26]. Потенційною мішенню впливу цих біопрепаратів можуть бути поверхневі рецептори, зокрема Тол-подібні рецептори, які експресуються в імунних та пухлинних клітинах. Тому, нами було проведено порівняльне дослідження токсичності цитокінінових фракцій грибів *Morchella esculenta*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus nebrodensis*, *Pleurotus osteratus*, *Sparassis crispa* на клітинах з фенотипом Т- лімфоцитів - МТ-4 та з вираженим фенотипом злякисної гепатоцитарної карциноми лінії HepG2.

Міцеліальна біомаса грибів *Flammulina velutipes* (штам 1878), *Cyclocybe aegerita* (штам 960) та *Hericium erinaceus* (штам 991) містила високі концентрації транс-зеатину (табл.3.1). У *F. velutipes* та *C. aegerita* також виявлено транс-зеатинрибозид. Раніше було показано, що саме рибозильовані форми цитокінінів мають найвищу протипухлинну активність в культурах ракових клітин.

Наявність ізопентеніладеніну в міцелії цих двох видів грибів свідчить про те, що на момент відбору зразків у них активно відбувався біосинтез цитокінінів. Ізопентеніладенін є первинним продуктом на шляху утворення зеатинових форм гормону .

У *H. erinaceus* переважає процес кон'югації, про що свідчить високий вміст

зеатин-О-глюкозиду, запасної неактивної форми гормону. Сумарний вміст цитокінінів у цьому грибі був найвищим. Всі три види грибів містили високі концентрації транс-зеатину. *F. velutipes* та *C. aegerita* також містили транс-зеатинрибозид, який має високу протипухлинну активність. Наявність ізопентеніладеніну в міцелії *F. velutipes* та *C. aegerita* свідчить про активний біосинтез цитокінінів. У *H. erinaceus* переважає процес кон'югації цитокінінів, що призводить до утворення неактивної форми - зеатин-О-глюкозиду. *H. erinaceus* мав найвищий сумарний вміст цитокінінів.

3.1 Цитотоксична/ цитостатична дія біопрепаратів на імунні та пухлинні клітини

При визначенні цитотоксичної дії цитокінінових фракцій *Morchella esculenta*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus nebrodensis*, *Pleurotus osteratus*, *Sparassis crispa* відносно Т-лімфоцитів та клітин гепатоцитарного злоякісного фенотипом було зафіксовано виражений цитотоксичний ефект відносно пухлинних клітин (Рис.3.1) за дії всіх досліджуваних екстрактів грибів, тоді як відносно Т-лімфоцитів цитотоксичності не виявлено (Рис 3.2)

Як видно із наведених даних, за дії на МТ-4 *M.esculenta* навіть спостерігається активація проліферації клітин порівняно з контролем. Така різнобічна дія досліджуваних екстрактів грибів імовірно пов'язана з наявністю в досліджуваних грибних екстрактах різного вмісту цитокінінів, як описано авторами[27] (табл.3.1).

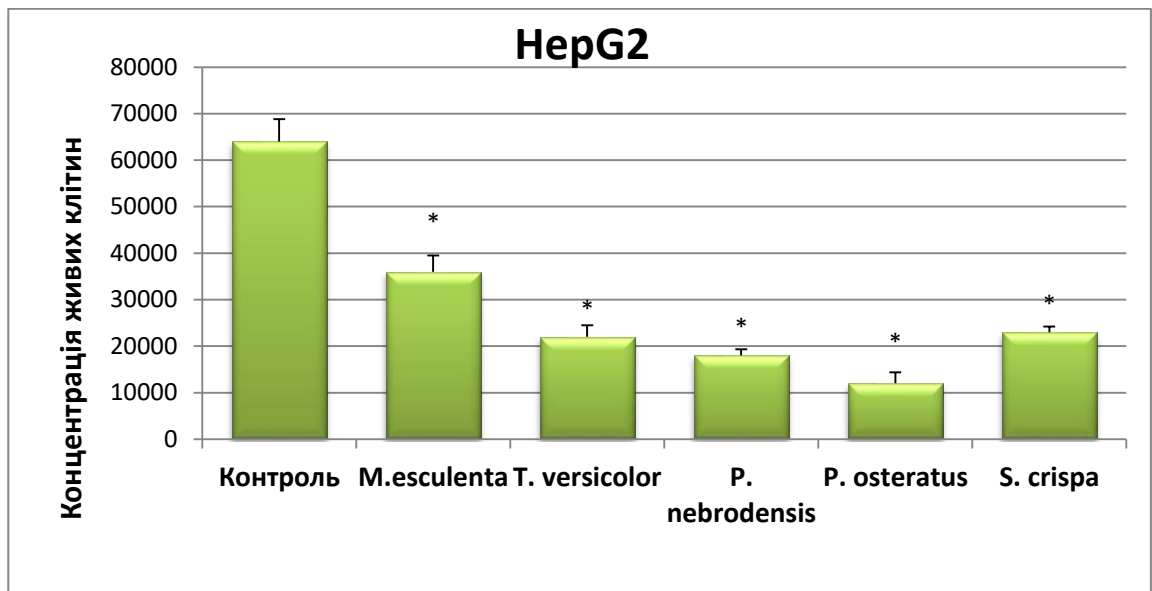


Рис.3.1. Концентрація живих клітин лінії HepG2 за дії цитокінінових фракцій культивованих грибів *Morchella esculenta*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus nebrodensis*, *Pleurotus osteratus*, *Sparassis crispa*; *P<0.5 проти контролю

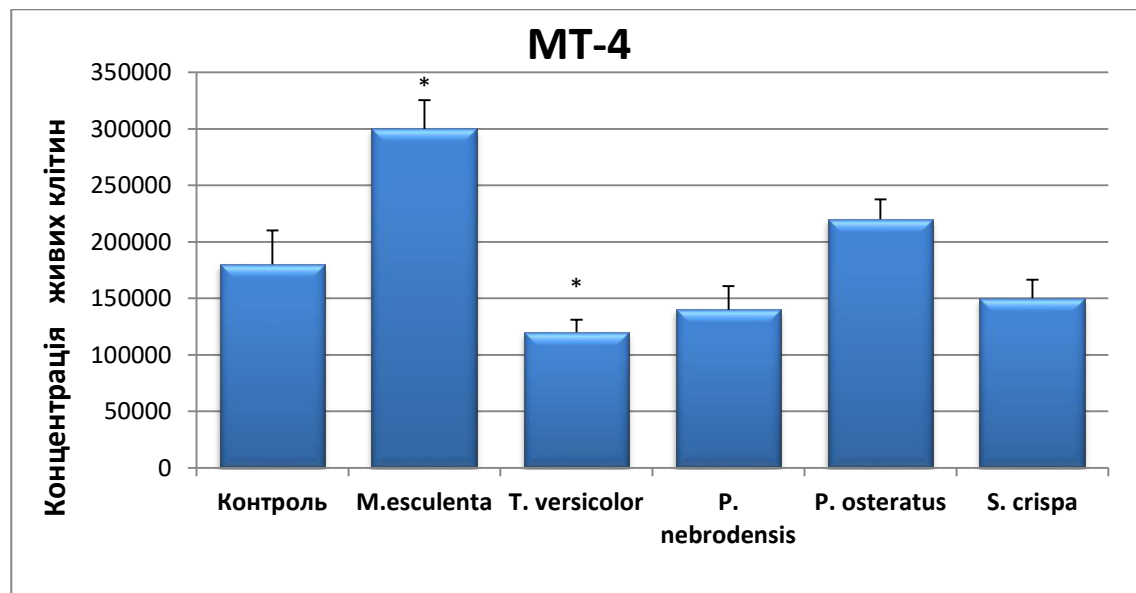


Рис.3.2. Концентрація живих клітин лінії MT4 за дії цитокінінових фракцій лікарських грибів *Morchella esculenta*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus nebrodensis*, *Pleurotus osteratus*, *Sparassis crispa*; *P<0.5 проти контролю

Як свідчать дані (таблиця 3.1), найвищий сумарний вміст цитокінінів у розрахунку на 1 г сухої маси характерний для *Morchella esculenta*, і, імовірно з цим пов'язано його стимулююча дія на клітини МТ-4 (рис.3.3 Б). Також, найменший пригнічувальний ефект при впливі *Morchella esculenta* зафіксовано відносно НерG2 (рис.3.4, Б). Всі інші досліджувані зразки не проявляли стимулюючого ефекту на клітини Т-лімфоцитів і мали виражену цитотоксичну дію на НерG2 (рис.3.3 та 3.4 В,Г,Д,Е).

Дослідження впливу неочищених екстрактів та очищених фракцій цитокінінів з міцеліальної біомаси грибів на клітини раку шийки матки HeLa показало: найвищу цитотоксичну активність мали очищені цитокінінові фракції *H. erinaceus* у концентраціях 1 мкг та 0,1 мкг (табл. .2.1).

Неочищений екстракт *H. erinaceus* проявив 40%-ий цитотоксичний ефект лише за концентрації 1 мкг (табл. 3.1). Як неочищений екстракт, так і очищена фракція цитокінінів з *C. aegerita* мали цитостатичний ефект, пригнічуючи проліферацію клітин НерG2 в 1.3-1.8 рази порівняно з контролем (табл.3.1).

Таким чином: *H. erinaceus*, штам 991 продемонстрував виражену цитотоксичну дію на клітини НерG2. Цитотоксична активність препаратів з міцелію *F. velutipes*, штам 1878, була менш вираженою. Препарати з міцелію *C. aegerita*, штам 960, проявили антипроліферативний ефект. Відмінності у впливі на пухлинні клітини, ймовірно, пов'язані з різноманітністю форм цитокінінів у грибних екстрактах:

У *H. erinaceus* з високим вмістом транс-зеатин-О-глюкозиду даний цитокінін був відсутній в міцеліальній біомасі *F. velutipes* та *C. aegerita*.

В останніх двох грибах виявлено транс-зеатинрибозид та ізопентеніладенін, які не були знайдені в *H. erinaceus*.

Таблиця 3.1.

**Вміст цитокінінів у міцеліальній біомасі лікарських грибів,
нмоль/г масисухої речовини**

Варіант досліджу	<i>m</i> -З *	ЗР*	іП*	ЗОГ*	Σ
<i>Morchella esculenta</i> , штамп 1755	46.44±2.32* *	0	7.18±0.35***	16.60±0.82 **	70.22
<i>Trametes versicolor</i> , штамп 353	10.03±0.49	4.30±0.21	0	0.16±0.008	14.49
<i>Pleurotus ostreatus</i> , штамп 551	0	0	0	26.09±1.29 **	26.09
<i>Pleurotus nebrodensis</i> , штамп 2035	8.44±0.43**	2.50±0.12* *	0	11.64±0.54 **	22.58
<i>Sparassis crispa</i> , штамп 314	10.31±0.51* *	6.43±0.31* *	1.08±0.05	0	17.82
<i>Flammulina velutipes</i> , штамп 1878	4.61±0.21	3.78±0.17	1.38±0.05	0	9.77
<i>Cyclocybe aegerita</i> , штамп 960	8.89±0.44**	5.04±0.25* *	1.23±0.05**	0	15.16
<i>Hericium erinaceus</i> , штамп 991	18.33±0.91* *	0	0	15.68±0.77 **	34.01

Примітка.* т-З – транс-зеатин, ЗР – зеатинрибозид;
іПа –ізопентеніладенозин, іП – ізопентеніладенін, ЗОГ –
зеатин-О-глюкозид;

** P<0,05 у порівнянні з відповідним значенням для *Trametes versicolori*, штамп 353,

** P<0,05 у порівнянні з відповідним значенням для *Sparassis crispa*, штамп

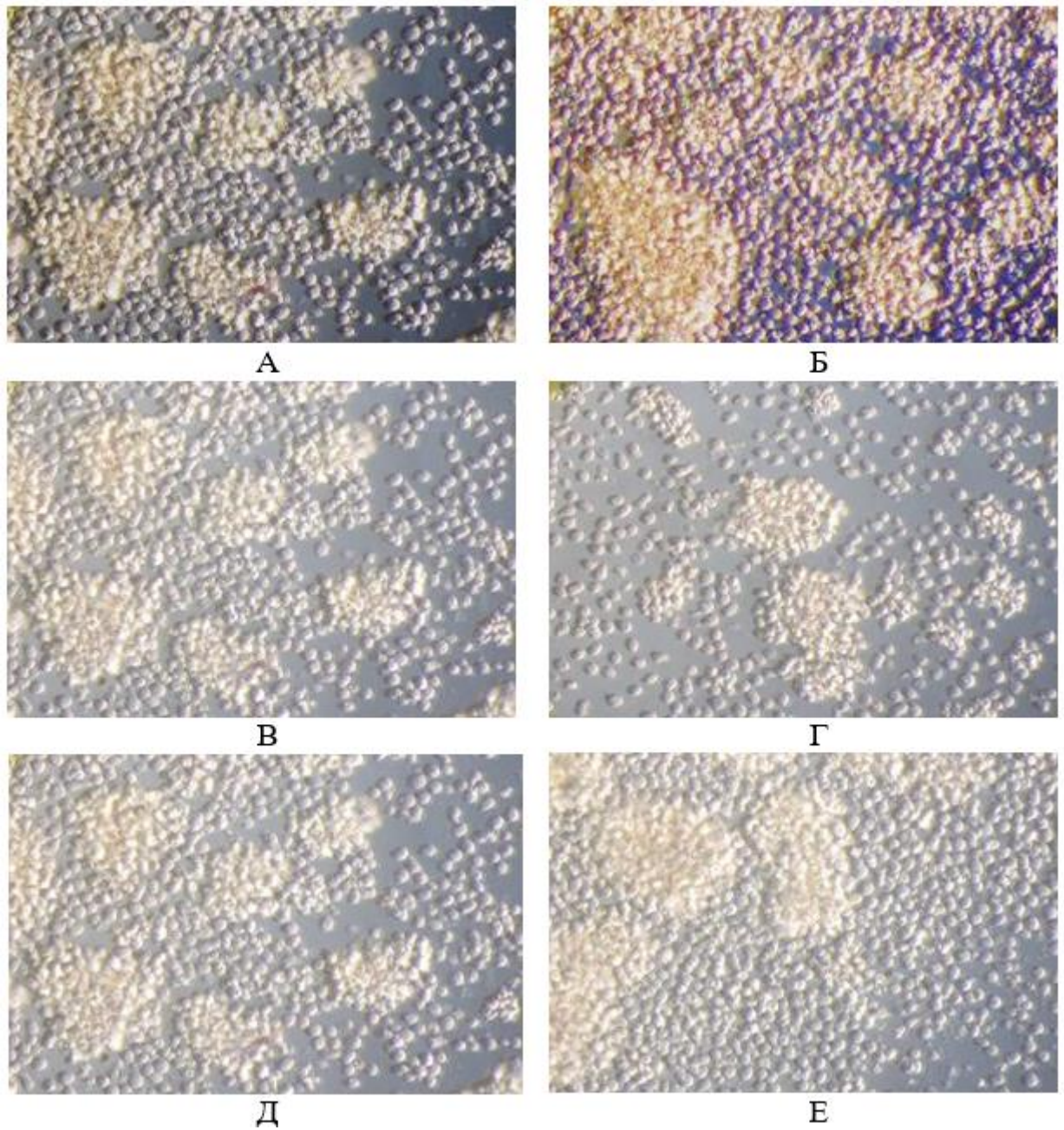


Рис.3.3. Клітини МТ-4 в контролі (А), за дії *Morchella esculenta* (Б), *versicolor* (В), *Pleurotus nebrodensis* (Г), *Pleurotus osteratus* (Д), *Sparassis crispa*(Е)

Так було показано, що ТК відносно імунних клітин стимулювала їх проліферацію відносно контролю (рис.3.5А), тоді як на пухлинні клітини дрібноклітинного раку легені вихідного штаму NCI-H69 (рис.3.5Б) та HerG2 (рис.3.5В) не зафіксовано відмінної від контролю дії, а при інкубації клітин резистентного до цисплатину штаму клітин NCI-H69/CPR з ТК виявлено пригнічувальну дію та зафіксовано цитотоксичну дію, яка полягала в 34% загибелі клітин порівняно з контролем (рис.3.5Г).

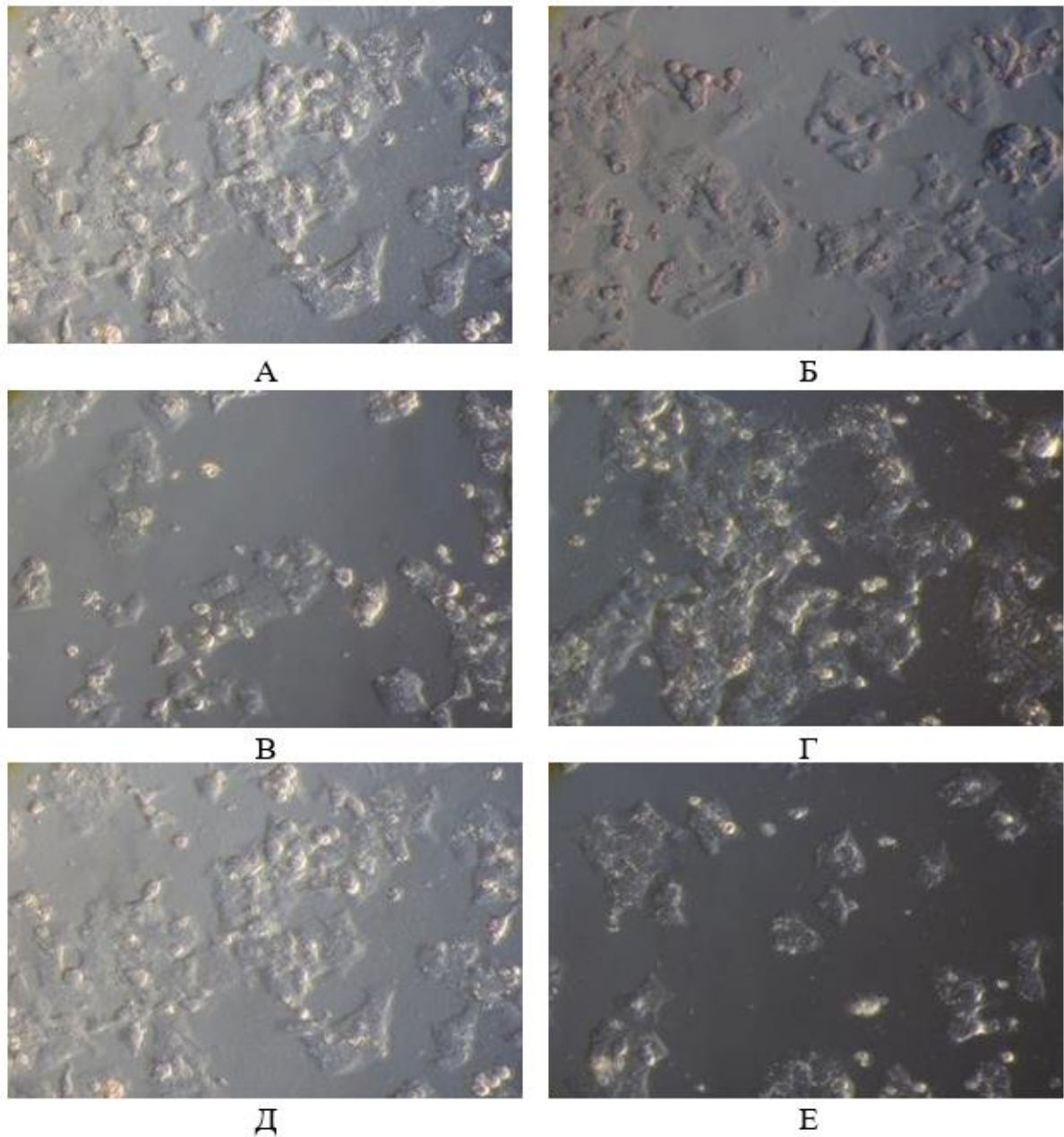


Рис.3.4. Клітини HerG2 в контролі (А), за дії *Morchella esculenta* (Б), *Trametes versicolor* (В), *Pleurotus nebrodensis* (Г), *Pleurotus osteratus* (Д), *Sparassis crispa*(Е)

Згідно наведених даних на рис.3.3Б, та 3.4Б видно, що цитокініновий екстракт *Morchella esculenta* окрім стимулюючої дії на проліферацію, має здатність забарвлювати клітини в світло-фіолетовий колір.

За дії цитокінінових фракцій досліджуваних грибів на клітини HerG2 виявлено стимуляцію секреторної функції та збільшення рівня поглинання глюкози, що може свідчити як про стимуляцію гліколізу так і мітохондріальної активності[28].

Таким чином проведене дослідження дії біопрепаратів, отриманих із мікроорганізмів, та очищені цитокінінові фракції грибів проявили різносторонню дію на клітини з диференціюванням Т-лімфоцитів та пухлинні клітини гепатоцитарного походження та дрібноклітинного раку легені. А саме в більшості випадків зафіксовано цитотоксичну дію, проте також виявлено стимулюючу активність тейхоевою кислотою та цитокінінами , виділеними із *Morchella esculenta*, зокрема на клітини МТ-4.

Наступним етапом наших досліджень було визначення експресії одного із ключових рецепторів, який може бути мішенню дії біопрепаратів з вмістом цитокінінів. Такими є на клітинах імунної системи Тол-подібні рецептори.

3.2 Визначення експресії TLR-4 в клітинах за дії цитокінінових фракцій

Для визначення впливу на фенотипові і функціональні особливості клітин, включаючи низку специфічних рецепторів, які є мішенями біопрепаратів, зокрема Тол-подібних рецепторів (TLRs). Саме тому, завданнями даного дослідження була оцінка дії цитокінінів на ефект токсичності та експресію TLRs. Для порівняння ефектів цитокінінів грибного походження на рівень експресії TLRs використали добре охарактеризований біопрепарат грам позитивних мікроорганізмів штаму *Staphylococcus aureus* , вплив якого досліджували як на імунних клітинах, так і на пухлинних.

Згідно отриманих даних видно, що цитокініни грибів *Pleurotus nebrodensis*, *Pleurotus osteratus* , *Sparassis crispa* стимулюють експресію TLR-4 як на

клітинах лімфоцитарного походження, так і на гепатоцитарного, тоді як *Morchella esculenta* у 1.5 рази підвищує рівень експресії TLR-4 в клітинах МТ-4 (Рис.3.6), порівняно з контролем і майже не відрізняється від контрольних значень в клітинах НерG2 (Рис.3.7).

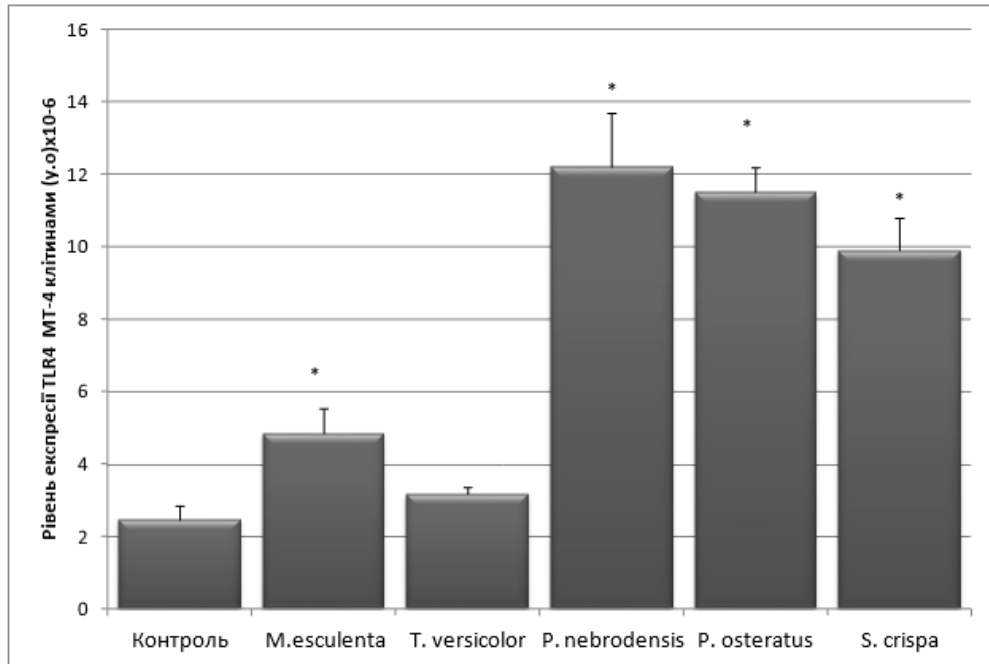


Рис 3.6. Рівень експресії TLR-4 клітинами МТ-4 за дії цитокінінових фракцій лікарських грибів. *P<0.5 проти контролю

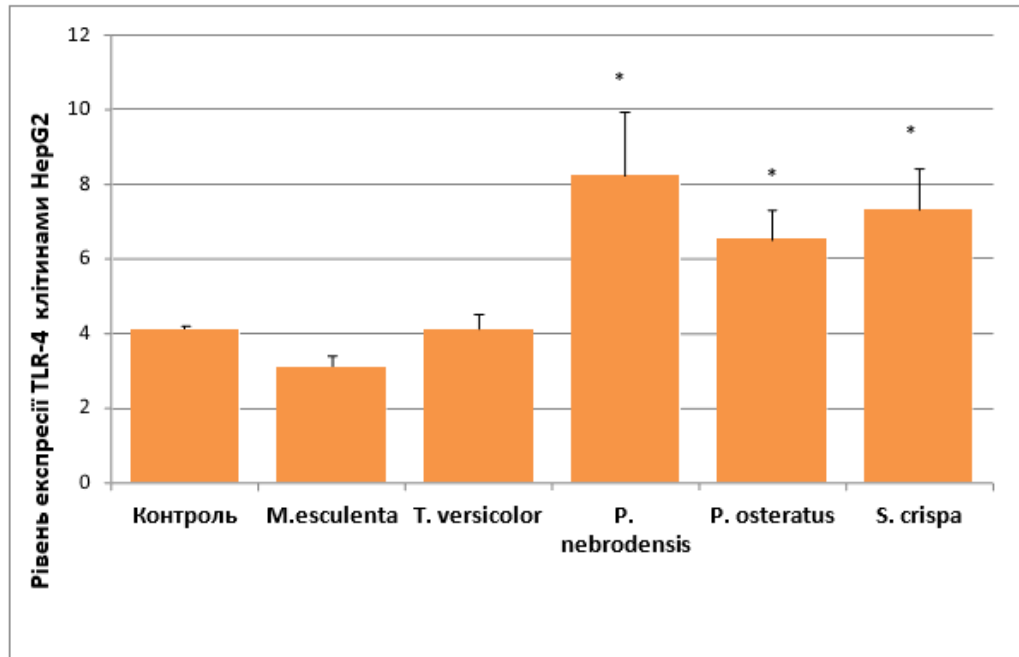


Рис 3.7. Рівень експресії TLR-4 клітинами HepG2 за дії цитокінінових фракцій лікарських грибів. *P<0.5 проти контролю

При порівнянні ефектів тейхоєвої кислоти на рівень експресії TLR-4 було зафіксовано наступне:

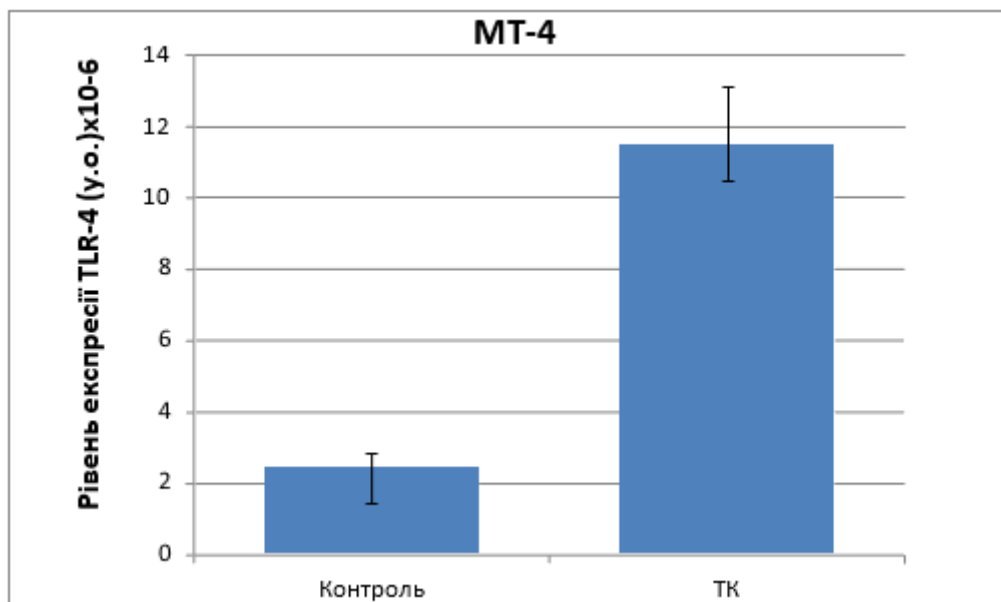


Рис 3.8. Рівень експресії TLR-4 клітинами MT-4 за дії тейхоєвої кислоти

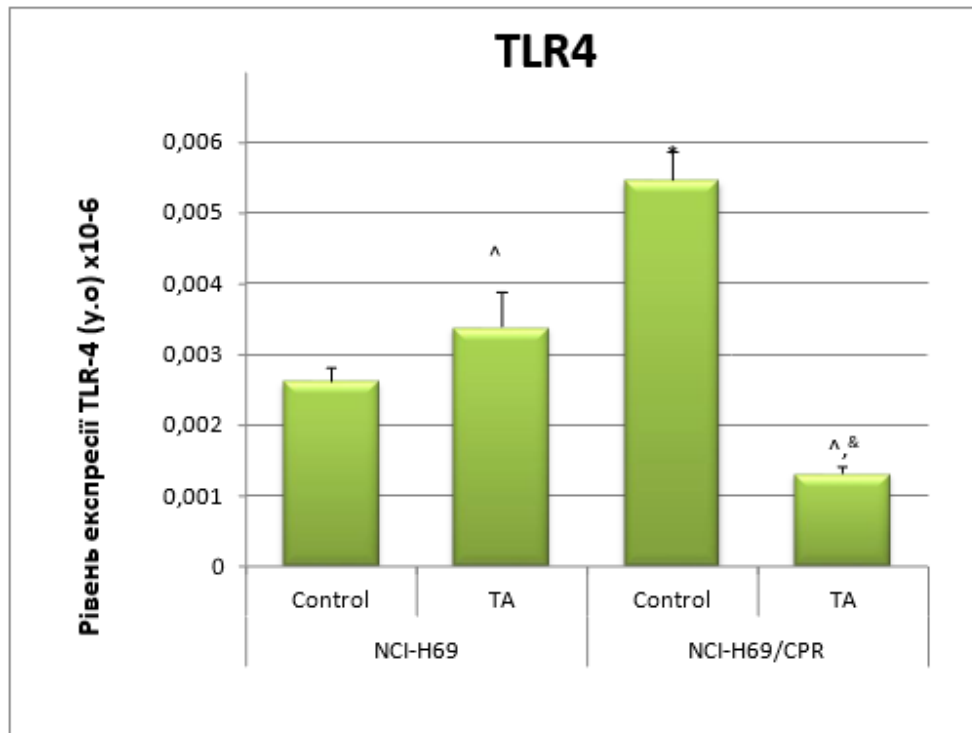


Рис 3.9. Рівень експресії TLR-4 клітинами дрібноклітинного раку легені задії тейхоєвої кислоти

З результатів, наведених на рис.3.8 та 3.9 видно, що ТК стимулює рівень експресії TLR-4 в клітинах МТ-4: так за показником рівня експресії зафіксовано майже 4-кратне зростання. Щодо клітин дрібноклітинного раку легені виявлено наступне в чутливій до терапії лінії клітин NCI-H69 зафіксовано 1.5 разове зростання показника експресії TLR-4 під впливом ТК, тоді як в клітинах резистентних до дії цисплатину NCI-H69/CPR без ТК рівень експресії TLR-4 NCI-H69/CPR високий, а при додаванні ТК зменшується в 5 разів.

Отже, підсумовуючи результати наших досліджень, можна стверджувати що цитокінінові фракції лікарських грибів *Morchella esculenta*, *Trametes versicolor* *Pleurotus nebrodensis*, *Pleurotus osteratus*, *Sparassis crispa* проявляють протилежні ефекти щодо клітин лімфоцитарного походження та пухлинних клітин з різною степінню злякисного фенотипу. А їх вплив на рівень експресії TLR-4 вказує на імуномодуляторні властивості цих біологічно активних речовин.

3.3 Вплив цитокінінів грибного походження на активність гамаглутамілтранспептидази в гепатоцитах

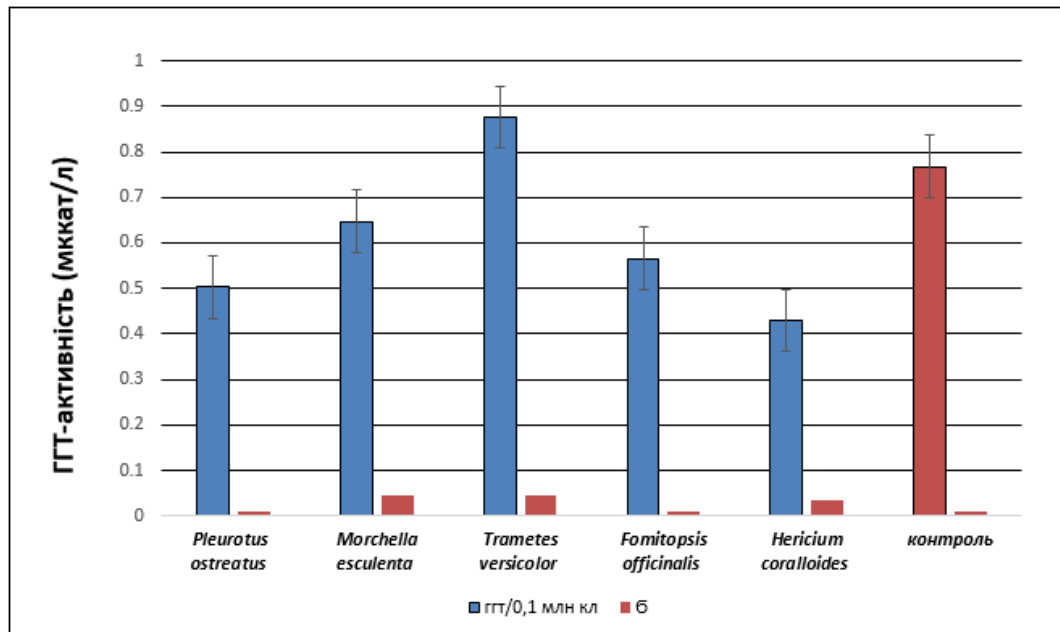


Рис 3.10. Вплив цитокінінових фракцій на ГГТ-активність у порівнянні з контролем

Для оцінки активності γ -глутамілтранспептидази (ГГТ) у середовищі культивування клітинної лінії HepG2 під впливом грубих екстрактів і цитокінінових фракцій лікарських грибів *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* та *Morchella esculenta* було використано комерційний тест-набір для кількісного визначення загальної активності ГГТ (Філісіт, Україна). Метод базується на реакції переносу γ -глутамінового залишку з субстрату γ -L(+)-глутаміл-п-нітроаніліну на дипептид-гліцилгліцин, що супроводжується вивільненням п-нітроаніліну — хромогенного продукту реакції. Після зупинення ферментативного процесу оцтовою кислотою оптичну щільність реакційного середовища вимірювали на довжині хвилі 405 нм. Зазначений метод нами було модифіковано для аналізу ГГТ-активності безпосередньо в середовищі культивування пухлинних клітин.

Після аналізу результатів експерименту, можна зробити висновок, що цитокінінові фракції лікарських грибів мають виражений інгібуючий ефект на активність γ -глутамілтранспептидази (ГГТ) у клітинній лінії HepG2.

Зокрема, спостерігається значне зниження ферментативної активності після обробки цитокініновими екстрактами грибів *Trametes versicolor*, *Morchella esculenta* та *Pleurotus ostreatus*, що ілюструють сині стовпці на графіку. Найбільший інгібуючий ефект було зафіксовано у зразках з цитокінінвою фракцією *Trametes versicolor*, де рівень активності ГГТ є найнижчим серед усіх досліджуваних грибів.

У той час як грубі екстракти виявили лише несуттєвий вплив на ГГТ-активність, у деяких випадках значення активності ферменту залишалися наближеними до контрольних, наприклад, у варіанті з *Morchella esculenta*. Контрольна група, без обробки грибними метаболітами, демонструє найвищу активність ферменту, що підтверджує дієвість цитокінінів у модулюванні цього біохімічного показника.

Таким чином, отримані дані вказують на потенціал цитокінінових фракцій як біологічно активних агентів з інгібуючими властивостями щодо ГГТ — ключового ферменту в системі клітинної детоксикації.

3.4 Кореляція між цитокініновим складом грибів і відповіддю клітин TLR-4

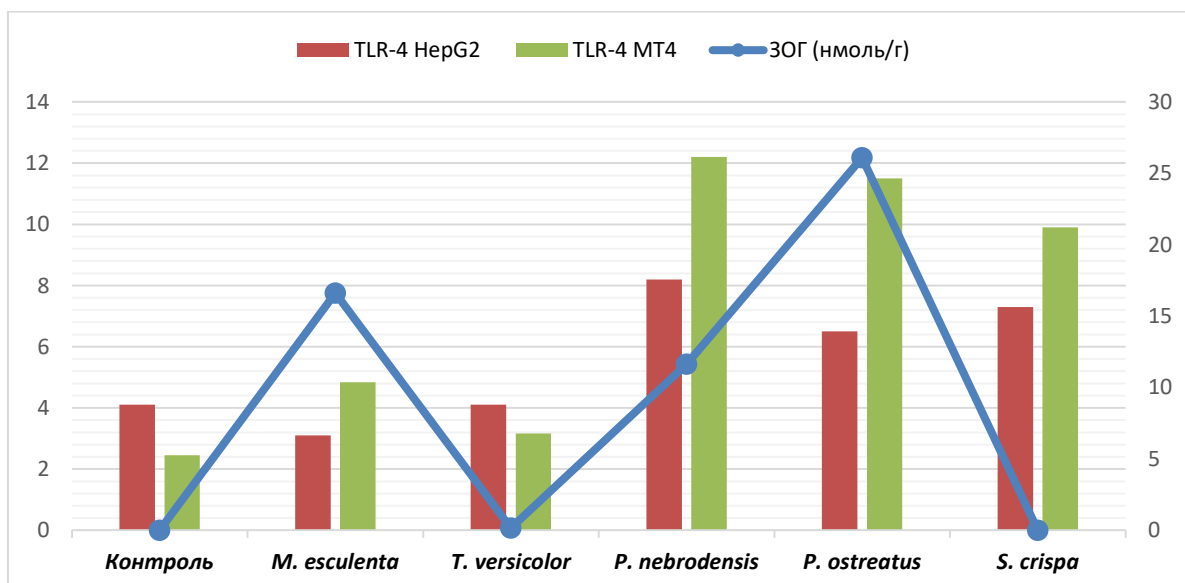


Рис 3.11. Вміст зетин-О-глюкозиду в грибах і рівень експресії TLR-4 у клітинах HepG2 та MT4

Згідно з даними Таблиці 3, найбільший вміст ЗОГ було зафіксовано в грибах *Pleurotus ostreatus* (26,09 нмоль/г), *Pleurotus nebrodensis* (11,64 нмоль/г) та *Morchella esculenta* (16,60 нмоль/г). Водночас інші досліджені гриби, такі як *Sparassis crispa*, *Flammulina velutipes* та *Cyclocybe aegerita*, не містили ЗОГ, проте мали інші форми цитокінінів, зокрема транс-зеатин, зеатинрибозид та іПа.

Результати експресії TLR-4 у клітинах HepG2 та MT4 вказували на підвищену активацію рецептора під дією фракцій саме тих культивованих грибів, які характеризувалися високим вмістом ЗОГ. Зокрема, *P. ostreatus*, *P. nebrodensis* та *S. crispa* викликали найвищий рівень експресії у обох клітинних лініях. Для подальшої оцінки можливого зв'язку між вмістом ЗОГ та TLR-4 було здійснено кореляційний аналіз.

Таблиця 3.3.

Клітинна лінія	r (коефіцієнт Пірсона)	R ² (коефіцієнт детермінації)
HepG2	-0.012	0.00015 (≈ 0)
MT4	0.382	0.146 (≈14.6%)

Коефіцієнт кореляції Пірсона (r) між вмістом ЗОГ та експресією TLR-4 у клітинах HepG2 становив -0,012, що вказує на відсутність залежності. Натомість для клітин MT4 значення $r = 0,382$, а $R^2 \approx 0,146$ свідчить про існування помірного позитивного зв'язку, згідно з яким до 14,6% варіації в експресії TLR-4 може пояснюватися концентрацією ЗОГ у грибних фракціях.

Отже, отримані нами результати дають нам підстави припустити, що зеатин-О-глюкозид може відігравати роль модулятора імунної відповіді. А конкретно, як глюкозидована форма цитокініну, ЗОГ є більш стабільним метаболітом, що дозволяє йому довше зберігатися у клітинному середовищі та потенційно взаємодіяти як рецепторними, так і сигнальними шляхами. Цей результат відкриває перспективи подальших досліджень, зокрема виділення

чистих форм ЗОГ та інших цитокінінів з метою перевірки їх прямого впливу на TLR-4 і пов'язані сигнальні шляхи. Також доцільним буде дослідження супутніх метаболітів у екстрактах грибів, які можуть мати синергічну дію.

За матеріалами даного розділу опубліковано наступні роботи:

1. I. Stupak, O. Gorbach, O. Sckachkova, N. Senchylo, E. Singayivskiy, **M. Starshinova**, L. Garmanchuk The expression of TLR4, IFN- γ , TGF- β AND TNF- α LL line of human small cell lung carcinoma NCI-H69 AND in cisplatin-resistant subline NCI-H69/CPR//Biotechnologia Acta T. 15, No. 6 , 2022 P. 55-60, <https://doi.org/10.15407/biotech15.06.055>

2. **Старшинова М.**, Колісник В., Горбач О., Скачкова О., Ступак І. , Аль- Маалі Г., Гарманчук Лі Експресія толл-подібних рецепторів 4 типу т-лімфоцитами за дії цитокінінінових фракцій лікарських грибів Матеріали XX international conference of students and young scientists “Shevchenkivska vesna: advancements in life sciences”· Book of abstracts ,Kyiv, 27-28 April, 2023, P.112-114

3. Garmanchuk L. , Vedenicheva N. , Stupak I. , **Starshinova M.** , Ostapchenko L. Biological activities of medicinal mushroom mycelium preparations in vitro// сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження. Матеріали VII Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції, 11 квітня 2025, м. Харків

ВИСНОВКИ

1. З використанням колориметричного МТТ-тесту та підрахунку співвідношення живих та мертвих клітин на моделях Т-лімфоцитарного та гепатоцитарного походження зафіксовано цитотоксичний/цитостатичний ефект цитокінінових фракцій наступних видів грибів *Morchella esculenta*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus nebrodensis*, *Pleurotus osteratus*, *Sparassis crispa*.
2. Виявлено виражений цитотоксичний ефект вищенаведених зразків відносно клітин HepG2 з ознаками диференціювання гепатоцитів та злякисним фенотипом гепатокарциноми, який полягав у загибелі клітин у 30-70% порівняно з контролем ($P < 0.05$), тоді як відносно Т-лімфоцитів не зафіксовано пригнічувальної дії цитокінінових фракцій.
3. З використанням ПЛР-аналізу в реальному часі виявлено високий рівень експресії TLR4 в Т-лімфоцитах (2-4-кратне перевищення відносно контролю, $P < 0.05$) і майже відсутні відмінності в експресії TLR4 від контролю в клітинах HepG2 за дії цитокінінів *Morchella esculenta*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus nebrodensis*, *Pleurotus osteratus*, *Sparassis crispa*, *Flammulina velutipes*, *Cyclocybe aegerita*, *Hericium erinaceus*.
4. На основі проведених досліджень встановлено, що цитокінінові фракції лікарських грибів *Trametes versicolor*, *Morchella esculenta* та *Pleurotus ostreatus* мають виражений інгібуючий вплив на активність γ -глутамілтранспептидази (ГГТ) у клітинній лінії гепатокарциноми HepG2. В той же час, найнижчий рівень ферментативної активності було зафіксовано у зразках які були оброблені фракцією цитокінінів грибів *Trametes versicolor*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ:

- [1] - Н. П. Веденичова, Г. А. Аль-Маалі, Н. Ю. Митропольська, О. Б. Михайлова, Н. А. Бісько, І. В. Косаківська (2016) Ендогенні цитокініни у міцелярній біомасі лікарських базидіоміцетів *Biotechnologia Acta*, Т. 9, № 1С. 55-63.
- [2] Choi J., Choi D., Lee S., Ryu C.-M., Hwang I. (2011) Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? *Trends Plant Sci.* V. 16, P. 388–394. doi: 10.1016/j.tplants.2011.03.003.
- [3] - Jakopovic B, Oršolić N, Jakopovich I.(2021) Proteomic Research on the Antitumor Properties of Medicinal Mushrooms. *Molecules.* 26(21): 6708.
- [4] - Nikulina VV, Garmanchuk LV, Senchylo NV, Nikolaenko TV, Dzhus OI, Ostapchenko LI, Khranovska NM (2014) Combined influence of teichoic acids from *Staphylococcus aureus* and heterometallic Cu/Cd ethylenediamine complex on peritoneal macrophages and tumor cells. *Tsitol Genet.* Nov-Dec;48(6):56-61.
- [5] - I. Stupak, O. Gorbach , O. Sckachkova , N. Senchylo, E. Singayivskiy, M. Starshinova, L. Garmanchuk (2022) The expression of TLR4, IFN- γ , TGF- β and TNF- α in line of human small cell lung carcinoma NCI-H69 and in cisplatin-resistant subline NCI-H69/CPR//*Biotechnologia Acta* T. 15, No. 6 , P. 55-60.
- [6] - Vedenicheva N. P., Al-Maali G. A., Bisko N. A., Kosakivska I. V., Ostrovska G. V., Khranovska N. M., Gorbach O. I., Garman chuk L. V., Ostapchenko L. I. (2021) Effect of Cytokinin-Containing Extracts from Some Medicinal Mushroom Mycelia on HepG2 Cells In Vitro. *International Journal of Medicinal Mushrooms.* 23(3):15–28.
- [7] - Mushrooms as Potential Sources of Active Metabolites and Medicine AnneBhambri, Malay Srivastava, Vivek G. Mahale, Sushma Mahale, and Santosh Kumar Karn.
- [8] - Chang S. T., Wasser S. P. (2012). The role of culinary-medicinal

mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *Int. J. Med. Mush.* 14 95–134.

[9] - Pant C., Karn S. K., Singh R. K. (2021). Nano-medicine or Nano-drug in Viral Infections. *Int. J. Sci. Innov. Res.* 9 5–10.

[10] - Negi R., Karn S. S., Singh R. K. (2020). An outlook of Pandemic disease: COVID 19. *Int. J. Sci. Innov. Res.* 8 15–23 ; Aida F. M. N. A., Shuhaimi M., Yazid M., Maaruf A. G. (2009). Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 20 567–575.

[11] - Wasser S. P. (2010). Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. *Int. J. Med. Mush.* 12 1–16.

[12] - Hetland G., Johnson E., Lyberg T., Kvalheim G. (2011). The mushroom *Agaricus blazei* Murill elicits medicinal effects on tumor, infection, allergy and inflammation through Its modulation of innate immunity and amelioration of Th1/Th2 imbalance and inflammation.

[13] - Mau J. L., Chang C. N., Huang S. J., Chen C. C. (2004). Antioxidant properties of methanolic extract from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia.

[14] - Nitha B., Meera C. R., Janardhanan K. K. (2007). Anti-inflammatory and antitumor activities of cultured mycelium of morel mushroom, *Morchella esculenta*.

[15] - Deepalakshmi K., Mirunalini S. (2014). *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties.

[16] - Ke M, Chen Y, Wu A, Sun Y, Su C, Wu H, Jin X, Tao J, Wang Y, Ma X, Pan JA, Guo D. (2012) Short peptides derived from the interaction domain of SARS coronavirus nonstructural protein nsp10 can suppress the 2'-O-methyltransferase activity of nsp10/nsp16 complex. *Virus Res.*

[17] - Н.В. Сенчило, В.В. Нікуліна, Т.В. Ніколаєнко, А.В. Путніков, Л.І. Томачинська, Л.В. Гарманчук (2013) Тейхоєва кислота *Staphylococcus aureus* WOOD 46 знижує адгезивний потенціал макрофагів та підсилює рівень інфільтрації лімфоцитів пухлиною.

- [18] Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ.(2015) Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. In: Vinken M, Rogiers V, editors. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research, Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business Media New York. V. 1250, p.77-93.
- [19] - [N.P. Vedenicheva, Galeb Al-Maali .A. BiskoI.V. Kosakivska,(2017) Cytokinins phytohormones production by basidiomycetes micelial biomass , DOI: 10.15407/frg2016.06.508 Веденичова Н.П., Косаківська І.В. *Цитокініни як регулятори онтогенезу рослин за різних умов зростання*. Київ : Наш формат : 200 с.
- [20] - Murai N. 2014 Review.(2018) Plant growth hormone cytokinins control the cropseed yield. *Amer. J. Plant Sci* 5 : 2178-2187 Kieber J.J., Schaller E. . Cytokinin signaling in plant development.
- [21] - Schaller G.E., Street I.H., Kieber J.J.(2014) Cytokinin and the cell cycle. *Curr.Opin. Plant Biol.* 2014. 21: 7–15
- [22] - Bhakdi S., Klonisch T., Nuber P., Fischer W (1991). Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids . *Infect, and Immun* 59, N 12.P. 4610—4625.
- [23] - Н. П. Веденичева, И. В. Косаковская (2020)Цитокинины грибов. *Вісник Харківського національного аграрного університету. серія Біологія* (50): 54-69
- [24] - Tang C, Ноо PC, Tan LT, Pusparajah P, Khan TM, Lee LH, Goh BH, Chan KG (2016) Golden Needle Mushroom: A Culinary Medicine with Evidenced-Based Biological Activities and Health Promoting Properties. *Front Pharmacol.* 7:474.
- [25] - Веденичова Н.П., Аль-Маалі Г.А., Бороменський Д.О., Бісько Н.А., Косаківська І.В., Гарманчук Л.В., Остапченко Л.І.(2021) Протипухлинна активність цитокінінових екстрактів з міцелію лікарських грибів *Ganoderma lucidum* і *Lentinula edodes*. “*Planta+*. *Наука, практика та*

освіта». *Мат. Міжнар. наук.- практ. конф.* Київ, ПАЛІВОДА А.В., 2021, С. 294- 298.

[26] - Nina P. Vedenicheva, Galeb A. Al-Maali, Nina A. Bisko, Iryna V. Kosakivska, Galyna V. Ostrovska, Natalia M. Khranovska, Olexandr I. Gorbach, Liudmyla V. Garmanchuk, & Liudmyla I. Ostapchenko (2021) Effect of Cytokinin- Containing Extracts from Some Medicinal Mushroom Mycelia on HepG2 Cells In Vitro *.International Journal of Medicinal Mushrooms*, 23(3):15–28

[27] - Vedenicheva NP, Al-Maali GA, Mytropolska NYu, Mykhaylova OB, Bisko NA, Kosakivska IV (2016) Endogenous cytokinins in medicinal basidiomycetes mycelial biomass. *Biotechnol Acta* 9 (1): 55–63.

[28] - Остапченко Д. , Гнатюк С., Веденичова Н.П. , Аль-Маалі Г.А., Гарманчук Л. (2023) Оцінка рівня глюкози в середовищі культивування клітин гепатоцитарного походження за дії цитокінінових фракцій, виділених ізміцелію лікарських грибів. *Матеріали XX international conference of students and young scientists “shevchenkivska vesna: advancements in life sciences”*. Book of abstracts ,Kyiv, 27-28 April, P.131-134

[29] - Bhakdi S., Klonisch T., Nuber P., Fischer W. (1991) Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids . *Infect, and Immun* 59, N 12. P. 4610-4625.

[30] - Hep G2, *American Type Culture Collection*

[31] - Ihrke, G; Neufeld, EB; Meads, T; et al. (1993). "WIF-B cells: an in vitro model for studies of hepatocyte polarity". *Journal of Cell Biology*. 123 (7): 1761– 1775. PMC 2290861 .

[32] - Mersch-Sundermann V.; Knasmüller, S.; Wu, X. J.; Darroudi, F.; Kassie, F. (2004). "Use of a human derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents". *Toxicology*. 198 (1–4): 329–340.

[33] - Hanigan, Marie H. “Gamma-glutamyl transpeptidase: redox

regulation and drug resistance.” *Advances in cancer research* vol. 122 (2014): 103-41.

[34] - Lu, S.C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5), 3143–3153

[35] - Whitfield, J.B. (2001). Gamma glutamyl transferase. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 38(4), 263–355.

[36] - Koenig, G., & Seneff, S. (2015). Gamma-Glutamyltransferase: A predictive biomarker of cellular antioxidant inadequacy and disease risk. *Disease Markers*, 2015, 818570.

[37] - Llabre, M.M., et al. (2020). Gamma-Glutamyl Transferase: A Biomarker for Health and Disease. *Clinica Chimica Acta*, 509, 302–308.

[38] - AlphaFold Protein Structure Database. (n.d.). *Glutathione hydrolase 1 proenzyme (GGT1)*. Retrieved May 11, 2025

[40] - Benson, Kathleen F et al. “The mycelium of the *Trametes versicolor* (Turkey tail) mushroom and its fermented substrate each show potent and complementary immune activating properties in vitro.” *BMC complementary and alternative medicine* vol. 19,1 342. 2 Dec. 2019

[41] - K., Darshan & SP, Sagar & B, Vajramma & Shreedeevasena, & Mushineni, Ashajyothi & Asaiya, A J K & Mishra, s.N.. (2024). Medicinal potential of Turkey tail mushroom (*Trametes versicolor*): A comprehensive review. *South African Journal of Botany*. 172. 254-266.

[42] – Teschke R, Wolff A, Frenzel C, Schulze J, Eickhoff A. Herbal hepatotoxicity: a tabular compilation of reported cases. *Liver Int*. 2012 Nov;32(10):1543-56

[43] – Mitrić A, Castellano I. Targeting gamma-glutamyl transpeptidase: A pleiotropic enzyme involved in glutathione metabolism and in the control of redox homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 2023 Nov 1;208:672-683

[44] – Gupta R, Anand G, Pizarro L, Laor D, Kovetz N, Sela N, Yehuda T, Gazit E, Bar M. Cytokinin Inhibits Fungal Development and Virulence by Targeting the Cytoskeleton and Cellular Trafficking. *mBio*. 2021 Oct

26;12(5):e0306820.

[45] – Khan, A. L., Waqas, M., Hussain, J., et al. (2015). A Critical Review on Communication Mechanism within Plant-Endophytic Fungi Interactions to Cope with Biotic and Abiotic Stresses. *Journal of Fungi*, 7(9), 719.