

Н. Веденічева¹, д-р біол. наук,Н. Бісько¹, д-р біол. наук,Л. Кот², канд. біол. наук,Л. Гарманчук², д-р біол. наук,Л. Остапченко², д-р біол. наук¹Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ, Україна²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ЦИТОТОКСИЧНА / ЦИТОСТАТИЧНА ДІЯ НА ПУХЛИННІ КЛІТИНИ ЛІНІЇ HELA КУЛЬТИВОВАНИХ ГРИБІВ *FLAMMULINA VELUTIPES*, *CYCLOCYBE AEGERITA* ТА *HERICIMUM ERINACEUS*

Використання у клінічній і фармацевтичній практиці біопрепаратів, отриманих із природної сировини, зокрема грибів, має актуальне значення. На сьогодні широко застосовуються технології культивування лікарських грибів, міцелій яких містить значну кількість цитокінінів – стимуляторів проліферації і диференціювання рослинних клітин, які також виявляють імуномодулювальну й онкостатичну дію в організмі тварин і людини. Тому метою цієї роботи було визначення цитотоксичного / цитостатичного ефекту на клітини лінії HeLa, отримані з ракових пухлин шийки матки людини, культивованих грибів *Flammulina velutipes*, *Cyclocybe aegerita* та *Hericium erinaceus*. Очищення цитокінінів здійснювали поетапно, використовуючи методи центрифугування, фракціонування з н-бутанолом, іонообмінної хроматографії на колонках Dowex 50Wx8 і тонкошарової хроматографії на пластинах Silicagel 60 F254. Ідентифікацію і кількісне визначення цитокінінів виконували за допомогою аналітичного методу ВЕРХ/МС з використанням хроматомасспектрометра Agilent 1200 (США) на колонці Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18. Цитотоксичний / цитостатичний скринінг проводили на клітинах лінії HeLa із застосуванням рутинного підрахунку співвідношення живих і мертвих клітин. Результати дослідження показали, що найвищий вміст цитокінінів у розрахунку на 1 г сухої маси був характерний для культивованих грибів виду *Hericium erinaceus*. Також у *Hericium erinaceus* зареєстровано найвищу токсичність відносно клітин раку шийки матки людини лінії HeLa, тоді як у грибах *Flammulina velutipes* та *Cyclocybe aegerita* виявлено лише цитостатичну (ант проліферативну) дію.

Ключові слова: культивовані гриби, *Flammulina velutipes*, *Cyclocybe aegerita*, *Hericium erinaceus*, цитокініни, цитотоксична дія.

Вступ. Останнім часом зростає зацікавленість у технологіях отримання біомаси культивованих грибів, які широко використовують у харчовій промисловості, а також як вихідну сировину для виробництва фармацевтичних препаратів. Сьогодні збирання сировини лікарських рослин і грибів у природних умовах має певні обмеження, зумовлені об'єктивними причинами: по-перше, території, на яких поширені певні види рослин і грибів, що мають потенційну харчову й лікарську цінність, містять підвищену кількість токсикантів у зв'язку як зі зростаючим забрудненням довкілля відходами промислових виробництв, так і накопиченням токсикантів унаслідок воєнних дій; по-друге, у природних ареалах зростання лікарських рослин і грибів неможливо отримувати стандартизовану сировину з відтворенням найбільш придатних для використання характеристик біомаси. Велика кількість біологічно активних сполук, які містяться в міцеліальній масі лікарських грибів, виявляють протипухлинні й імуномодулювальні властивості [1–4]. Наприклад, використання екстрактів одного з найбільш культивованих у світі їстівних грибів – *Flammulina (F) velutipes*, який містить у своєму складі полісахариди, сесквітерпени, стероли, фенольні сполуки, глікопротеїни, показало їхній протипухлинний ефект на лініях клітин багатьох видів раку [1, 3, 5, 6]. Білкові фракції, отримані з їстівного культивованого гриба *Cyclocybe (C) aegerita*, пригнічували розвиток клітин мієлоїдної лейкемії [2]. Показано, що риботоксинподібний білок агерітин, виділений із *C. aegerita*, індукував апоптоз клітин нейробластоми, гліоми, лімфоми та інших ракових клітин, серед яких найбільш чутливими виявилися клітини HeLa, отримані з ракових пухлин шийки матки людини [7]. У дослідженнях установлено, що дітерпеноїд ерінацин, виділений із гриба *Hericium (H) erinaceus*, може інгібувати інвазію і метастазування клітин раку товстої кишки [8], зменшувати проліферацію клітин раку товстої кишки [9]. Відомо, що *H. erinaceus* містить у своєму складі більше 50 вторин-

них метаболітів, зокрема флавоноїди і тритерпени, яким властива протипухлинна активність [10]. Також у грибах присутні фітогормони – цитокініни, вміст яких може визначати цитотоксичну / цитостатичну активність культивованих грибів. Вивчення механізмів антинеопластичної дії біологічно активних компонентів культивованих грибів нині перебуває лише на початкових етапах і потребує додаткових досліджень [4].

Мета та завдання дослідження – визначення цитотоксичного / цитостатичного ефекту культивованих грибів *F. velutipes*, *C. aegerita* та *H. erinaceus* на пухлинні клітини лінії HeLa залежно від вмісту в них цитокінінів. Для досягнення мети було поставлено такі завдання: визначити вміст цитокінінів в екстрактах культивованих грибів *F. velutipes*, *C. aegerita* та *H. erinaceus*; проаналізувати виживаність клітин лінії HeLa за дії грубих екстрактів і цитокінінових фракцій досліджуваних культивованих грибів; порівняти цитотоксичні / цитостатичні ефекти *F. velutipes*, *C. aegerita* та *H. erinaceus* залежно від вмісту цитокінінів.

Матеріали і методи. У дослідженні використано культивовані гриби видів *F. velutipes*, штам 1878, *C. aegerita*, штам 960, і *H. erinaceus*, штам 991, які отримані з колекції грибних культур Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України. Штами грибів культивували за стандартних умов, як описано в [11].

Для визначення вмісту цитокінінів у зразках міцеліальну біомасу грибів гомогенізували в розчині, що містив 80 %-й метанол, і проводили поетапне очищення за допомогою методів центрифугування, фракціонування із н-бутанолом, іонообмінної хроматографії на колонках Dowex 50Wx8 і тонкошарової хроматографії на пластинах Silicagel 60 F254. Ідентифікацію і кількісне визначення цитокінінів здійснювали за допомогою аналітичного методу ВЕРХ/МС із використанням хроматомасспектрометра Agilent 1200 (США) на колонці Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 з елююванням системою

розчинників метанол : вода : оцтова кислота (у співвідношенні за об'ємом 37 : 62,9 : 0,1) [12]. Цитотоксичний / цитостатичний скринінг проводили на клітинах лінії HeLa із застосуванням рутинного підрахунку в камері Горяєва за співвідношенням живих і мертвих клітин після забарвлення останніх трипановим синім. Для цього до клітин, які культивували у 24-лункових планшетах за стандартних умов (37 °C, 5 % CO₂ та 100 % вологості) у повному поживному середовищі RPMI 1640 (Sigma, США) із 10 %-ю ембріональною телячою сироваткою (ETC) і 40 мкг/л сумішшю антибіотиків / антимікотиків, додавали неочищені екстракти культивованих грибів *F. velutipes*, *C. aegerita* та *H. erinaceus*, а також їхні очищені з міцеліальної біомаси цитокінінові фракції у послідовно зменшуваних концентраціях (1, 0,1 та 0,01 мкг) у кінцевому об'ємі 200 мкл. Інкубували зразки протягом двох діб, після чого робили підрахунок концентрації клітин.

Отримані експериментальні результати обробляли за допомогою загальноприйнятих статистичних методів. У кожній експериментальній групі розраховували серед-

не арифметичне значення (М) і похибку середнього значення (m). Для визначення вірогідних відмінностей між середніми розраховували t-критерій Стюдента.

Результати та їх обговорення. Отримані результати представленого дослідження показали, що для міцеліальної біомаси культивованих грибів *F. velutipes*, штаму 1878, *C. aegerita*, штаму 960 та *H. erinaceus*, штаму 991, характерна наявність високих концентрацій *транс*-зеатину (рис. 1). Установлено, що лікарські гриби *F. velutipes* та *C. aegerita* містили у своєму складі зеатинрибозид. У попередніх дослідженнях [13] показано, що саме рибозильовані форми цитокінінів виявляли найбільшу протипухлинну активність у культурах ракових клітин. Наявність ізопентеніладеніну в міцелії грибів *F. velutipes* і *C. aegerita* може свідчити про те, що на момент відбору зразків у них відбувався інтенсивний процес біосинтезу цитокінінів, адже ізопентеніладенін є первинним продуктом на шляху утворення зеатинових форм гормону [14].

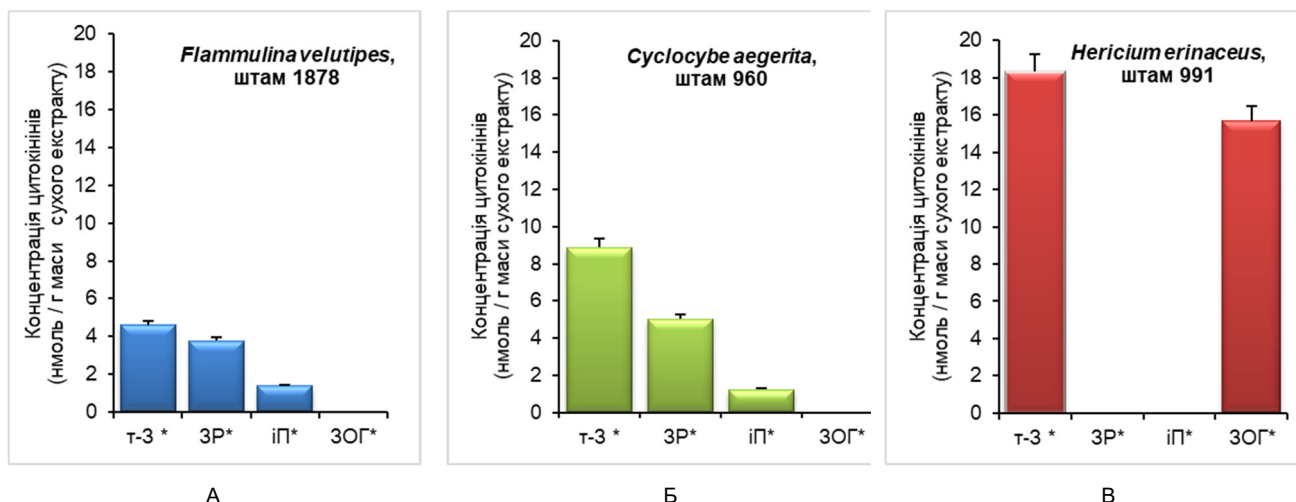


Рис. 1. Концентрація цитокінінів у міцеліальній біомасі лікарських грибів *Flammulina velutipes*, штам 1878 (А), *Cyclocybe aegerita*, штам 960 (Б), і *Hericium erinaceus*, штам 991 (В). Примітка: * т-З – *транс*-зеатин, ЗР – зеатинрибозид, іП – ізопентеніладенін, ЗОГ – зеатин-О-глюкозид

Аналізуючи отримані дані, можна стверджувати, що для гриба *H. erinaceus* характерним був процес кон'югації, про що свідчив високий вміст зеатин-О-глюкозиду, який є запасною неактивною формою гормону. Нами встановлено, що в екстракті культивованого гриба *H. erinaceus* був найвищий сумарний вміст цитокінінів, який становив $34,01 \pm 1,66$ нмоль/г сухої речовини (табл. 1).

Проте слід зазначити, що у складі *H. erinaceus* не виявлено зеатинрибозид та ізопентеніладенін (рис. 1), наявність яких було показано для двох інших видів досліджуваних грибів – *F. velutipes* та *C. aegerita*. Найнижчий сумарний вміст цитокінінів був характерним для гриба *F. velutipes* (табл. 1).

Таблиця 1. Сумарний вміст цитокінінів у міцеліальній біомасі лікарських грибів

Назва гриба	Сумарний вміст цитокінінів (нмоль/г сухої речовини)
<i>Flammulina velutipes</i> , штам 1878	$9,77 \pm 0,43$
<i>Cyclocybe aegerita</i> , штам 960	$15,16 \pm 0,84$
<i>Hericium erinaceus</i> , штам 991	$34,01 \pm 1,66$

При визначенні цитотоксичного / цитостатичного ефекту досліджуваних грибів (грубих екстрактів і цитокінінових фракцій) виявлено найвищу цитотоксичну дію цитокінінових фракцій *H. erinaceus* у концентраціях 1 та

0,1 мкг, тоді як грубий екстракт *H. erinaceus* лише за концентрації 1 мкг становив 40 % цитотоксичної активності (табл. 2).

Таблиця 2. Концентрація і відсоток мертвих клітин HeLa за культивування протягом 2 діб із грубими екстрактами й цитокініновими фракціями лікарських грибів *F. velutipes*, *S. aegerita* та *H. erinaceus*

Назва гриба		Вміст зразків у середовищі культивування, мкг			
		0 (контроль)	0,01	0,1	1
<i>Flammulina velutipes</i> , штам 1878 (грубий екстракт)	концентрація клітин (тис.)	38,4±3,7	31,4±5,5	26,7±9,4	24,3±5,4*
	% мертвих клітин	6,4±1,7	14,3±1,3*	32,0±7,9*	36,0±5,6*
<i>Flammulina velutipes</i> , штам 1878 (цитокінінові фракції)	концентрація клітин		36,4±5,8	31,3±2,2	22,4±6,4*
	% мертвих клітин		6,1±3,2	35,5±7,9*	35,4±2,4*
<i>Cyclocybe aegerita</i> , штам 960 (грубий екстракт)	концентрація клітин		42,3±6,8	27,4±6,6*	29,5±2,2*
	% мертвих клітин		5,4±3,2	11,7±3,9	17,4±5,5*
<i>Cyclocybe aegerita</i> , штам 960 (цитокінінові фракції)	концентрація клітин		34,5±2,7	24,3±4,9*	25,5±7,3
	% мертвих клітин		11,3±4,8	9,3±1,8	10,4±3,3
<i>Hericium erinaceus</i> , штам 991 (грубий екстракт)	концентрація клітин		37,4±5,2	29,4±7,6	19,5±6,4*
	% мертвих клітин		9,7±1,5	18,7±3,2*	40,3±3,2*
<i>Hericium erinaceus</i> , штам 991 (цитокінінові фракції)	концентрація клітин		26,6±12,2	19,8±6,9*	15,5±4,8*
	% мертвих клітин		16,8±6,8	51,0±11,4*	59,4±6,3*

Примітка: * p < 0,05 відносно контролю (без додавання зразків)

Установлено цитостатичний ефект *S. aegerita* як при додаванні грубого екстракту, так і цитокінінових фракцій, який полягав у пригніченні проліферації клітин HeLa в 1,3–1,8 раза порівняно з контролем (табл. 2).

Висновки. Отже, експериментальні результати дослідження показали найбільш виражену цитотоксичну дію на клітини раку шийки матки людини лінії HeLa культивованого гриба *H. erinaceus*, штам 991. Установлено антипроліферативний ефект екстрактів гриба *S. aegerita*, штам 960. Імовірно, що виявлені ефекти досліджуваних грибів на пухлинні клітини пов'язані з наявністю у грибних екстрактах різних форм цитокінінів. На відміну від штамів *H. erinaceus*, який містив високу концентрацію зеатин-О-глюкозиду, у міцеліальній масі грибів *F. velutipes* та *S. aegerita* цей цитокінін не виявлено, проте встановлено в їхньому складі наявність зеатинрибозиду й ізопентеніладеніну, які не визначалися в екстрактах *H. erinaceus*. На основі отриманих результатів можна зробити припущення щодо важливої ролі цитокінінів у протипухлинних ефектах лікарських грибів [11, 12].

Дослідження було виконано за підтримки спільного проєкту Відділення цільової підготовки Київського національного університету імені Тараса Шевченка та Національної академії наук України "Цитокініни лікарських базидієвих грибів: онкостатична та імуномодельюча дія в культурах пухлинних клітин № ДР0122U002461"

Список використаних джерел

1. Tang C. Golden needle mushroom: A culinary medicine with evidenced-based biological activities and health promoting properties / C. Tang, P. Hoo, L. Tan [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 474.
2. Jakopovic B. Proteomic research on the antitumor properties of medicinal mushrooms / B. Jakopovic, N. Oršolić, I. Jakopovich // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, № 21. – P. 6708. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/21/6708>.
3. Ukaegbu C. Acetone extract of *Flammulina velutipes* caps: A promising source of antioxidant and anticancer agents / C.I. Ukaegbu, S.R. Shah, A.H. Hazrulrizawati, O.R. Alara // *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. – 2018. – Vol. 7, № 4. – P. 675–682.
4. Gravina A.G. *Hericium erinaceus*, a medicinal fungus with a centuries-old history: Evidence in gastrointestinal diseases / A. Gravina, R. Pellegrino, S. Auletta [et al.] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2023. – Vol. 29, № 20. – P. 3048–3065.
5. Mitra S. Plasma-treated *Flammulina velutipes*-derived extract showed anticancer potential in human breast cancer cells / S. Mitra, P. Bhartiya, N. Kaushik [et al.] // *Applied Sciences*. – 2020. – Vol. 10, № 23. – P. 8395. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3417/10/23/8395>.
6. Wu M. Antioxidant and immunomodulatory activities of a polysaccharide from *Flammulina velutipes* / M. Wu, X. Luo, X. Xu [et al.] // *Journal of Traditional Chinese Medicine*. – 2014. – Vol. 34, № 6. – P. 733–740.
7. Ragucci S. Ageritin from *Pioppino* mushroom: The prototype of ribotoxin-like proteins, a novel family of specific ribonucleases in edible mushrooms / S. Ragucci, N. Landi, R. Russo [et al.] // *Toxins*. – 2021. –

Vol. 13, № 4. – P. 263. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6651/13/4/263>.

8. Kuo H.C. A comparative proteomic analysis of *Erinaceus* A's inhibition of gastric cancer cell viability and invasiveness / H.C. Kuo, Y.R. Kuo, K.F. Lee [et al.] // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2017. – Vol. 43. – P. 195–208.

9. Lee K.C. A proteomics approach to identifying novel protein targets involved in *erinaceus* A-mediated inhibition of colorectal cancer cells' aggressiveness / K.C. Lee, H.C. Kuo, C.H.J. Shen [et al.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2017. – Vol. 21. – P. 588–599.

10. Friedman M. Chemistry, nutrition, and health-promoting properties of *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom fruiting bodies and mycelia and their bioactive compounds / M. Friedman // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2015. – Vol. 63. – P. 7108–7123.

11. Garmanchuk L.V. Antiproliferative activities of extracts from mycelial biomass of some medicinal basidiomycetes in human colon cancer cells COLO 205 / L.V. Garmanchuk, N.P. Vedenicheva, G.A. Al-Maali [et al.] // *Experimental oncology*. – 2022. – Vol. 44, № 3. Available from: <https://exp-oncology.com.ua/article/18434>.

12. Vedenicheva N.P. Endogenous cytokinins in medicinal basidiomycetes mycelial biomass / N.P. Vedenicheva, G.A. Al-Maali, N.Yu. Mytropolska [et al.] // *Biotechnologia Acta*. – 2016. – Vol. 9, № 1. – P. 55–63.

13. Voller J. Anti-cancer activities of cytokinin ribosides / J. Voller, T. Béres, M. Zatloukal [et al.] // *Phytochemistry Reviews*. – 2019. – Vol. 18. – P. 1101–1113.

14. Jameson P.E. Zeatin: The 60th anniversary of its identification / P.E. Jameson // *Plant Physiology*. – 2023. – Vol. 192, № 1. – P. 34–55.

References

1. Tang C, Hoo PC, Tan LT, Pusparajah P, Khan TM, Lee LH, et al. Golden needle mushroom: A culinary medicine with evidenced-based biological activities and health promoting properties. *Front. Pharmacol.* 2016;7:474. doi: 10.3389/fphar.2016.00474.
2. Jakopovic B, Oršolić N, Jakopovich I. Proteomic research on the antitumor properties of medicinal mushrooms. *Molecules*. 2021;26(21):6708. doi: 10.3390/molecules26216708.
3. Ukaegbu CI, Shah SR, Hazrulrizawati AH, Alara OR. Acetone extract of *Flammulina velutipes* caps: A promising source of antioxidant and anticancer agents. *BJBAS*. 2018;7(4):675–682.
4. Gravina AG, Pellegrino R, Auletta S, Palladino G, Brandimarte G, D'Onofrio R, et al. *Hericium erinaceus*, a medicinal fungus with a centuries-old history: Evidence in gastrointestinal diseases. *World J. Gastroenterol.* 2023;29(20):3048–3065.
5. Mitra S, Bhartiya P, Kaushik N, Nhat Nguyen L, Wahab R, Bekeschus S, et al. Plasma-treated *Flammulina velutipes*-derived extract showed anticancer potential in human breast cancer cells. *Appl. Sci.* 2020;10(23):8395.
6. Wu M, Luo X, Xu X, Wei W, Yu M, Jiang N, et al. Antioxidant and immunomodulatory activities of a polysaccharide from *Flammulina velutipes*. *J. Trad. Chin. Med.* 2014;34(6):733–740.
7. Ragucci S, Landi N, Russo R, Valletta M, Pedone PV, Chambery A, Di Maro A. Ageritin from *Pioppino* mushroom: The prototype of ribotoxin-like proteins, a novel family of specific ribonucleases in edible mushrooms. *Toxins*. 2021;13(4):263. <https://doi.org/10.3390/toxins13040263>.
8. Kuo HC, Kuo YR, Lee KF, Hsieh MC, Huang CY, Hsieh YY, et al. A Comparative proteomic analysis of *erinaceus* a's inhibition of gastric cancer cell viability and invasiveness. *Cell. Physiol. Biochem.* 2017;43:195–208.
9. Lee KC, Kuo HC, Shen CH, Lu CC, Huang WS, Hsieh MC, et al. A proteomics approach to identifying novel protein targets involved in *erinaceus* A-mediated inhibition of colorectal cancer cells' aggressiveness. *J. Cell. Mol. Med.* 2017;21:588–599.

10. Friedman M. Chemistry, nutrition, and health-promoting properties of *Herichium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom fruiting bodies and mycelia and their bioactive compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2015;63:7108–7123.

11. Garmanchuk LV, Vedenicheva NP, Al-Maali GA, Ostapchenko DI, Tseyslyer YuV, Liashenko VA, et al. Antiproliferative activities of extracts from mycelial biomass of some medicinal basidiomycetes in human colon cancer cells COLO 205. *Exp. Oncol.* 2022;44,3. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-3.18434.

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

13. Voller J, Béres T, Zatloukal M, et al. Anti-cancer activities of cytokinin ribosides. *Phytochem. Rev.* 2019;18:1101–1113.

14. Jameson PE. Zeatin: The 60th anniversary of its identification. *Plant Physiol.* 2023;19(1):34–55.

Стаття надійшла / Submitted: 05.05.23
Статтю надіслано на рецензування / Reviewed: 05.05.23
Статтю прийнято / Accepted: 09.06.23

N. Vedenicheva¹, DSc (Biol.),
N. Bisko¹, DSc (Biol.),
L. Kot², PhD (Biol.),
L. Garmanchuk², DSc (Biol.),
L. Ostapchenko², DSc (Biol.)

¹M. G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine
²ESC "Institute of Biology and Medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

CYTOTOXIC / CYTOSTATIC EFFECT OF CULTIVATED MUSHROOMS *FLAMMULINA VELUTIPES*, *CYCLOCYBE AGERITA* AND *HERICIUM ERINACEUS*

*The use in clinical and pharmaceutical practice of biological preparations obtained from natural raw materials, in particular from mushrooms, is of urgent importance. Currently, the cultivation technologies of medicinal mushrooms are widely used, the mycelium of which contains a significant amount of cytokinins – stimulators of proliferation and differentiation of various types of plant cells, which also exhibit an immunomodulatory and oncostatic effects in the organism of animals and humans. Therefore, the aim of this work was to determine the cytotoxic/cytostatic effect on cells of the HeLa line obtained from human cervical cancer tumors, cultivated mushrooms *Flammulina velutipes*, *Cyclocybe aegerita* and *Herichium erinaceus*. Purification of cytokinins was carried out in stages, using methods of centrifugation, fractionation with n-butanol, ion exchange chromatography on Dowex 50Wx8 columns and thin-layer chromatography on Silicagel 60 F254. Identification and quantification of cytokinins was performed by liquid chromatography in the reverse phase of MS (Agilent 1200 LC, USA) on an Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 column. Cytotoxic/cytostatic screening was performed on HeLa cells using the routine counting of the ratio of live to dead cells. The results of the research showed that the highest content of cytokinins per 1 g of dry weight was characteristic of cultivated mushrooms of the species *Herichium erinaceus*. Also, *Herichium erinaceus* has the highest toxicity against human cervical cancer cells of the HeLa line, while the mushrooms *Flammulina velutipes* and *Cyclocybe aegerita* showed only a cytostatic (antiproliferative) effect.*

Keywords: cultivated mushrooms, *Flammulina velutipes*, *Cyclocybe aegerita*, *Herichium erinaceus*, cytokinins, cytotoxic effect.