

Н. Веденичова, д-р біол. наук,  
Г. Аль-Маалі, канд. біол. наук  
Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ, Україна,  
Л. Кот, канд. біол. наук,  
Л. Остапченко, д-р біол. наук,  
Л. Гарманчук, д-р біол. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

## РІВЕНЬ ГЛЮКОЗИ ТА ГАММА-ГЛУТАМІЛТРАНСПЕПТИДАЗНА АКТИВНІСТЬ У КЛІТИНАХ ГЕПАТОЦИТАРНОГО ПОХОДЖЕННЯ ЗА ДІЇ ЕКСТРАКТІВ ТА ЦИТОКІНІНОВИХ ФРАКЦІЙ ЛІКАРСЬКИХ ГРИБІВ

Грибні екстракти виявляють багатофункціональну активність та мають широкий спектр застосування для лікування різних захворювань, зокрема й онкологічних. Проте повний склад сполук, які продукують макроміцети, що виявляють протипухлинні властивості, досі не встановлений. Порушення метаболізму глюкози та активація гамма-глутамілтранспептидази (ГГТ) у пухлинних клітинах може бути ключовим маркером біохімічної анаплазії при новоутвореннях. Метою роботи було дослідити вплив неочищених екстрактів та цитокінінових фракцій, виділених із міцеліальної біомаси лікарських грибів, на біологічні властивості клітин гепатоцитарного походження лінії HepG2 (гепатоцитарної карциноми людини). Об'єктами досліджень були чисті культури грибів *Hericium coralloides*, *Fomitopsis officinalis*, *Trametes (Coriolus) versicolor*, *Pleurotus ostreatus* та *Morchella esculenta*. Цитокінінові фракції з екстрактів виділяли центрифугуванням з подальшим фракціонуванням та очищенням за допомогою іонообмінної хроматографії. Якісний і кількісний аналіз цитокінінів проводили методом вискоєфективної рідинної хроматографії. ГГТ-активність визначали за допомогою тест-набору "Філісіт" (Україна), рівень глюкози – глюкозооксидазним методом з модифікаціями для клітинного культурального середовища. При аналізі міцеліальної біомаси лікарських макроміцетів виявлено наявність транс-зеатину, зеатинрибозиду, зеатин-О-глюкозиду та ізопентеніладеніну, що свідчить про високу активність щодо синтезу цитокінінів. Зазначено пригнічення дифузії глюкози із середовища культивування при використанні неочищених екстрактів та цитокінінових фракцій лікарських грибів та зниження ГГТ-активності, більш виражене при дії цитокінінових фракцій порівняно з неочищеними екстрактами. Різниця між ефектами неочищених екстрактів і цитокінінових фракцій указує на комплексний характер дії біологічно активних речовин лікарських грибів. Проведені дослідження щодо впливу неочищених екстрактів та цитокінінових фракцій лікарських грибів показали нормалізуючий ефект на основні метаболічні показники, які змінюються в пухлинних клітинах, як механізм біохімічної анаплазії.

**Ключові слова:** глюкоза, цитокініни, гамма-глутамілтранспептидазна активність, клітини HepG2, лікарські гриби.

**Вступ.** Зміна біологічних властивостей пухлинних клітин може бути обумовлена різними причинами, в тому числі біохімічною анаплазією та метаболічним перепрограмуванням, яке у пухлинних клітинах включає декілька аспектів [1, 2, 3]. Згідно з теорією Варбурга, одними з основних є анаеробний гліколіз та гостра метаболічна модифікація через депривацію глюкози і суттєве пригнічення тканинного дихання [4]. Ця дисфункція, викликана зниженою активністю мітохондріальних ферментів в умовах гіпоксії, призводить до гальмування електрон-транспортного ланцюга, вираженого споживання глюкози, накопичення лактату та пригнічення апоптичного сигналіну [5]. Мутації генів деяких мітохондріальних білків, зокрема сукцинатдегідрогенази (СДГ), викликають порушення функціонування циклу трикарбонових кислот (ЦТК) та можуть бути не лише наслідком, а й причиною утворення пухлин. Одним із маркерних ферментів при виникненні опірності пухлин є гамма-глутамілтранспептидаза (ГГТ), яка шляхом зв'язування з глутатіоном призводить до зниження біодоступності лікарських препаратів [5]. Таким чином, порушення метаболізму глюкози та активація ферменту антиоксидантного захисту гамма-глутамілтранспептидази в пухлинних клітинах може бути ключовим маркером біохімічної анаплазії при новоутвореннях.

Лікарські гриби як природне джерело протипухлинних речовин привертають увагу науковців упродовж багатьох років [6]. Фармакологічна промисловість в усьому світі виробляє сотні медичних протипухлинних препаратів на основі грибів [7]. До біологічно активних речовин грибів відносять терпеноїди, полісахариди, флавоноїди,  $\beta$ -глюкани, органічні кислоти, пептиди, проте повний склад сполук грибного походження, які виявляють протипухлинний ефект, досі не встановлено [8]. Тому актуальним є дослідження біологічно активних компонентів грибів, які асоціюються з полісахаропептидами або їх молекулярними мішенями і виявляють терапевтичні ефекти [9].

Плодові тіла та міцелії грибів здатні продукувати цитокініни – поліфункціональні фітогормони, які беруть участь у регуляції росту і розвитку рослин. Однією з основних функцій цитокінінів є позитивна регуляція поділу клітин [10]. Водночас у культурі тваринних клітин цитокініни мають протилежний ефект, зокрема блокують клітинний цикл та пригнічують ріст багатьох типів ракових пухлин [11]. Протипухлинні властивості цитокінінів можуть бути подібними до таких, що виявляють лікарські гриби. Оскільки у грибних тканинах концентрація цитокінінів оцінюється як наномолярна, то роль цитокінінів у протипухлинній активності грибів досі була поза увагою дослідників.

Метою представленої роботи є виявлення впливу неочищених екстрактів та цитокінінових фракцій, виділених із міцеліальної біомаси лікарських грибів, на біологічні властивості ракових клітин HepG2 для з'ясування можливості включення цих фітогормонів до переліку активних інгредієнтів макроміцетів з терапевтичним ефектом.

**Матеріали та методи.** Об'єктами досліджень були чисті культури *Hericium coralloides*, штам 2332, *Fomitopsis officinalis*, штам 5004, *Trametes (Coriolus) versicolor*, штам 353, *Pleurotus ostreatus*, штам 551 та *Morchella esculenta*, штам 1755, які зберігаються у колекції культур шапинкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України. Умови культивування міцеліальної біомаси описано у попередніх роботах [12].

Неочищені екстракти отримували шляхом гомогенізації міцеліальної біомаси грибів у електричному гомогенізаторі з додаванням розчину 80 %-го етанолу з розрахунку 10 мл розчину на 1 г біомаси за температури +4 °С. Екстракт упарювали під вакуумом за температури +45 °С. Цитокінінові фракції з екстрактів виділяли центрифугуванням при 15000 об/хв із подальшим фракціонуванням із водонасиченим *n*-бутанолом у пропорції 1 : 1 та очищенням за допомогою іонообмінної хроматографії на колонці зі смолою Dowex 50Wx8 у H<sup>+</sup>-формі

(елюція 0,1 М аміаком). Якісний і кількісний аналіз цитокінінів проводили методом високоефективної рідинної хроматографії на рідинному хроматографі високого тиску Agilent 1200 LC з діодно-матричним детектором G 1315 B (США). Деталі очищення цитокінінів та їх аналіз представлено у роботі [13].

У дослідженні використали клітини гепатоцитарного походження лінії *HepG2* (гепатоцитарної карциноми людини), які культивували у пластикових 96-лункових планшетах (Orange Scientific, Бельгія). Для вирощування та культивування клітин використовували поживне середовище DMEM (Sigma, США) із 10 %-ю ембріональною телячою сироваткою (Sigma, США) в інкубаторі за 100 % вологості, 5 % вмісту CO<sub>2</sub> та за температури 37 °С; а також культивували у безсироваткових умовах.

**Визначення гамма-глутамілтрансептидазної активності.** Визначення ГТТ-активності в середовищі інкубації клітин лінії *HepG2* за впливу неочищених екстра-

ктів та цитокінінових фракцій лікарських грибів здійснювали за допомогою комерційного тест-набору (Філісіт, Україна) згідно з інструкцією виробника. Принцип методу полягає в тому, що під дією ГТТ глютаміновий залишок з  $\gamma$ -L(+)-глютамін *p*-4-нітроаніліду переходить на діпептидний акцептор гліцил-гліцин. При цьому вивільняється хромоген – *p*-нітроанілін. Оптичну щільність реакційного розчину вимірювали після зупинення ферментативної реакції розчином оцтової кислоти при довжині хвилі 405 нм.

**Рівень поглинання глюкози.** Рівень глюкози в інкубаційному середовищі клітин визначали за допомогою стандартного набору реактивів на основі реакції глюкозооксидази, яку модифікували для клітинного культурального середовища згідно з [14].

**Результати та їх обговорення.** При аналізі міцеліальної біомаси п'яти видів лікарських макроміцетів було виявлено наявність *транс*-зеатину, зеатинрибозиду, зеатин-*O*-глюкозиду та ізопентеніладеніну (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст цитокінінів у міцеліальній біомасі лікарських грибів, нМ/г сухої речовини

Варіант досліджу	t-Z *	ZR*	iP*	ZOG*	Σ
<i>Hericium coralloides</i> штам 2332	33,56±1,67	11,55±0,57	13,08±0,63	0	58,19
<i>Fomitopsis officinalis</i> штам 5004	8,62±0,43	9,68±0,46	0	10,20±0,51	28,50
<i>Trametes versicolor</i> штам 353	10,03±0,49	4,30±0,21	0	0,16±0,008	14,49
<i>Pleurotus ostreatus</i> штам 551	0	0	0	26,09±1,29	26,09
<i>Morchella esculenta</i> штам 1755	46,44±2,32	0	7,18±0,35	16,60±0,82	70,22

Примітка: \*t-Z – *транс*-зеатин, \*ZR – зеатинрибозид, \*iP – ізопентеніладенін, \*ZOG – зеатин-*O*-глюкозид.

Зокрема, у *T. versicolor*, штам 353, і *H. coralloides*, штам 2332, переважали зеатинподібні гормони, серед яких найвищим був вміст *транс*-зеатину. У *P. ostreatus*, штам 551, і *F. officinalis*, штам 5004, міцеліальна біомаса характеризувалася значною концентрацією кон'югату, зеатин-*O*-глюкозиду, неактивної форми, яка вважається "депо" цитокінінів через здатність легко розщеплюватися  $\beta$ -глюкозидазою з утворенням вільного зеатину. Міцеліальна біомаса *M. esculenta*, штам 1755, і *H. coralloides*, штам 2332, містила ізопентеніладенін, який є первинним продуктом біосинтезу цитокінінів, що свідчило про високу синтетичну активність щодо цитокінінів у цього виду. Загалом, як показали отримані результати, якісний склад і кількісний вміст цитокінінів у грибів є видоспецифічною ознакою.

Цитокініни відомі як позитивні регулятори поділу рослинних клітин [10], тоді як у культурах клітин тварин і людини вони спричиняють протилежну дію. Зокрема, додавання цитокініну до культур багатьох видів пухлинних клітин викликало блокування проходження клітинного циклу й апоптоз [11]. Ізопентеніладенозин і бензиладенозин затримували перехід до G0/G1 фази клітинного циклу в культурі клітин карциноми сечового міхура, дезорганізуючи актиновий цитоскелет [15]. Ізопентеніладенозин у концентрації 10  $\mu$ M інгібував утворення колоній клітин восьми ліній раку людини різних типів і з різних тканин, включаючи рак легень, грудей, печінки [16], при цьому було виявлено індукцію генів негативної регуляції проходження клітинного циклу [17]. Апоптоз клітин цервікального раку людини *HeLa* за дії цитокініну був спричинений зв'язуванням фітогормону з доменом гена, що кодує специфічний фактор некрозу пухлинних клітин, а також репресією протеїнкіназної активності [18]. Пригнічення проліферації клітин меланоми було пов'язано із впливом цитокініну на аутофагоцитарну систему [19]. Причиною загибелі клітин мієлоїдної лейкемії при внесенні в культуру рибозиду орто-тополоїну була активація внутрішніх мітохондріальних метаболічних шляхів [20]. Слід зауважити, що найбільшу протипухлинну активність демонстрували рибозидні форми цитокінінів [21]. Загалом цитокініни виявляють цитотокси-

чну та імуномодулюючу дію, їх розглядають як перспективні сучасні біологічно активні сполуки з високим терапевтичним потенціалом [22].

Усі досліджені види грибів широко використовуються у традиційній китайській медицині понад 2000 років як загальнозміцнювальні й терапевтичні засоби, що забезпечують витривалість і довголіття, а також лікують численні хвороби. Сучасні клінічні дослідження екстрактів *T. versicolor* показали, що вони сприяють виживанню та поліпшенню якості життя пацієнтів з онкологією, гепатопатією, гіперліпідемією, хронічним бронхітом та іншими захворюваннями [23, 24]. На основі *T. versicolor* було створено 14 типів ліків і оздоровчих препаратів для клінічного і комерційного використання, які підвищують активність імунних клітин, зміцнюють фагоцитоз макрофагів, підсилюють експресію цитокінів і хемокінів, зокрема таких, як фактор некрозу пухлин  $\alpha$ , інтерлейкіни, гістамін, простагландин Е, стимулюють проникнення Т-клітин і дендритних клітин у пухлини, усуваючи негативні наслідки хіміотерапії [25, 26]. Очищені хроматографічними методами фракції полісахаридів із плодівих тіл *P. ostreatus* виявляли цитотоксичний протипухлинний ефект на клітини цервікального раку людини [27], карциноми і саркоми Ерліха [28]. Вони також негативно впливали на проліферацію клітин раку шлунка людини, інгібували утворення колоній ракових клітин, їхню міграцію та виживання *in vitro*, а також значно зменшували вагу і розмір пухлин у мишей при застосуванні *in vivo* [29]. Припускають, що протипухлинна активність метанольних екстрактів *M. esculenta* за умов раку легень людини спричинена дією стеролів і жирних кислот [30], тоді як антипроліферативна активність проти клітин гепатоми – наявністю гетерополісахаридів [31]. Полісахариди інгібували проліферацію і ріст ракових клітин товстої кишки людини [32]. Біоактивні речовини, виділені з *M. esculenta*, використовують як антиоксиданти, імуномодулятори, для лікування онкологічних і запальних захворювань тощо [33]. Раніше нами було встановлено, що екстракти *H. coralloides* і *F. officinalis* спричиняють апоптоз ракових клітин *HepG2* [34].

Здатність міцеліальної біомаси грибів з високим фармакологічним потенціалом продукувати цитокініни у

великих кількостях і порівняння спектрів фармакологічних властивостей лікарських грибів і цитокінінів дозволяють припустити, що цитокініни є одним із компонентів, які забезпечують терапевтичний ефект макроміцетів. У зв'язку із цим було проведено тестування дії екстрактів із міцеліальної біомаси грибів, які містили цитокініни, на культуру патогенних клітин HepG2.

Дисфункція мітохондрій є однією з визначальних ланок у токсичності хіміопрепаратів, що використовуються в онкологічній практиці. Невдалими випробуваннями клінічного та доклінічного скринінгу деякою мірою можна

запобігти, використовуючи у прескринінгу клітини гепатоцитарного походження. Як модельний об'єкт для досліджень метаболічних дисфункцій, пов'язаних із таргетним впливом на шляхи детоксикаційної системи, використовують клітини гепатоцитарного походження людини HepG2 [35–37].

При використанні неочищених екстрактів та цитокінінових фракцій деяких лікарських грибів було зафіксовано пригнічення дифузії глюкози із середовища культивування (табл. 2)

**Таблиця 2.** Рівень поглинутої глюкози клітинами HepG2 за дії неочищених екстрактів та цитокінінових фракцій лікарських грибів за умов культивування в повному поживному середовищі та в умовах безсироваткового культивування

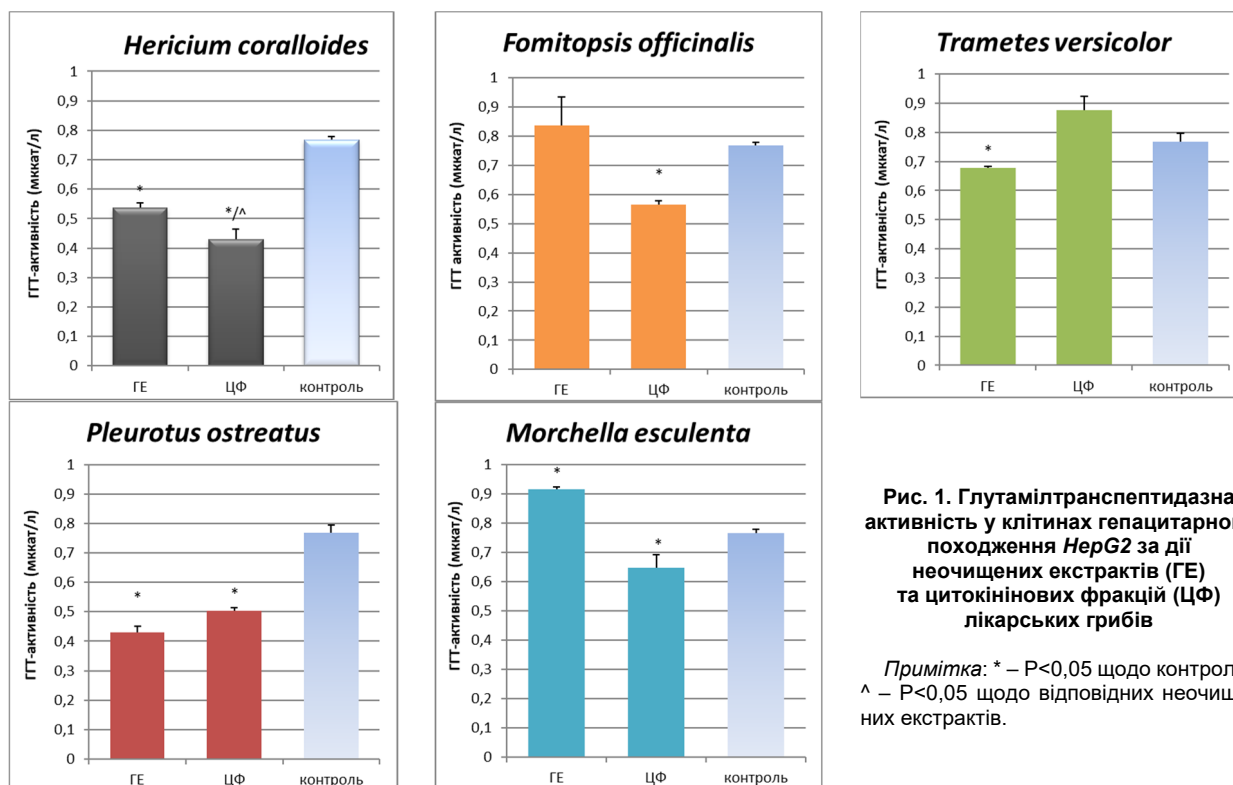
Зразки	<i>Hericium coralloides</i>	<i>Fomitopsis officinalis</i>	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Morchella esculenta</i>
Неочищені екстракти	1,9±0,1*	3,2±1,0*	3,6±0,9*	6,2±0,8	3,3±1,1*
Цитокінінові фракції	2,4±0,2*^	4,3±0,3*	5,8±0,7^	4,9±1,2	7,9±0,8^
Контроль (RPMI+10 % FBS)	6,3±0,5				
Неочищені екстракти	6,7±1,4#	5,9±1,8	7,4±2,4#	9,5±0,6#	11,4±0,2#
Цитокінінові фракції	6,1±2,0#	3,2±0,5*	4,4±0,5*	5,5±1,9^	5,3±2,3^#
Контроль (безсироваткове середовище RPMI)	8,6±0,5				

*Примітка:* \* – P<0,05 щодо контролю (без додавання зразків неочищених екстрактів та цитокінінових фракцій); ^ – P<0,05 щодо відповідних неочищених екстрактів; # – P<0,05 – різниця між культивуванням у середовищі із сироваткою проти безсироваткового середовища відповідних зразків.

Як свідчать результати досліджень, у більшості випадків виявлено пригнічення дифузії глюкози у клітинах за дії неочищених екстрактів та очищених цитокінінових фракцій деяких лікарських грибів за стандартних умов культурального середовища (RPMI+10 % FBS). Лише при додаванні екстракту та цитокінінових фракцій *P. ostreatus* і *M. esculenta* не виявлено відмінностей від контролю. За умов культивування в безсироватковому середовищі лише за додавання цитокінінових фракцій *F. officinalis* та *T. versicolor* виявлено зменшення дифузії глюкози у клітинах, а у випадку грубого екстракту *M. esculenta* виявлено збільшення глюкозного показника

порівняно з контролем. При додаванні інших зразків рівень поглинання глюкози практично не відрізнявся від контролю. При порівнянні умов культивування без додавання сироватки з контролем у повному поживному середовищі загалом неочищені екстракти та цитокінінові фракції збільшували рівень поглинання глюкози клітинами HepG2.

Наступним важливим етапом визначення впливу екстрактів лікарських грибів було дослідження їх впливу на ГТТ-активність. Показано, що більш виражений пригнічувальний ефект на ГТТ-активність виявили цитокінінові фракції порівняно з неочищеними екстрактами (рис. 1).



**Рис. 1.** Глутамілтранспептидазна активність у клітинах гепатоцитарного походження HepG2 за дії неочищених екстрактів (ГЕ) та цитокінінових фракцій (ЦФ) лікарських грибів

*Примітка:* \* – P<0,05 щодо контролю; ^ – P<0,05 щодо відповідних неочищених екстрактів.

Як свідчать наведені дані (рис. 1), за дії цитокінінових фракцій лікарських грибів (за виключенням *T. versicolor*) ГТТ-активність пригнічувалася в 1,3–1,4 раза порівняно з контролем. Три із досліджених неочищених екстрактів лікарських грибів також пригнічували ГТТ-активність, тоді як дія на клітини неочищених екстрактів *F. officinalis* та *M. esculenta* збільшувала ферментативну активність.

Отже, проведені дослідження щодо впливу грубих екстрактів та цитокінінових фракцій лікарських грибів показали нормалізуючий ефект на основні метаболічні показники, що змінюються в пухлинних клітинах як механізм біохімічної анаплазії.

**Висновки.** Отримані результати опосередковано вказують на те, що цитокініни можуть бути одним із біологічно активних компонентів лікарських грибів. Склад і вміст ендогенних цитокінінів є видоспецифічною ознакою, як і ступінь впливу на пухлинні клітини. Різниця між ефектами неочищених екстрактів і цитокінінових фракцій свідчить про комплексний характер дії біологічно активних речовин лікарських грибів.

*Робота виконана за підтримки гранту НАН України 8В "Дослідження протипухлинних властивостей біологічно активних речовин цитокінінової природи з міцеляльної біомаси лікарських базидієвих грибів", Но ДР 0119У10172*

#### Список використаних джерел

1. Ward P. S. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even Warburg did not anticipate / P. S. Ward, C. B. Thompson // *Cancer Cell*. – 2013. – Vol. 21, № 3. – P. 297-308.
2.  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase accelerates tumor growth and increases the resistance of tumors to cisplatin in vivo / M. H. Hanigan, B. C. Gallagher, D. M. Townsend, V. Gabarra // *Oxford Journal*. – 1999. – Vol. 20, № 4. – P. 559.
3. Gamma-glutamyltransferase of cancer cells at the crossroads of tumor progression, drug resistance and drug targeting / A. Corti, M. Franzini, A. Paolicchi, A. Pompella // *Anticancer Research*. – 2010. – Vol. 30, № 4. – P. 69-81.
4. Okon I. S. Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: Implications for therapy / I. S. Okon, M.-H. Zou // *Pharmacology Research*. – 2015. – Vol. 100. – P. 170-174.
5. Narrative review: bioactive potential of various mushrooms as the treasure of versatile therapeutic natural product [Electronic resource] / H. Chopra, A. K. Mishra, A. A. Baig et al. // *Journal of Fungi*. – 2021. – Vol. 7. – P. 728. – Access mode : <https://doi.org/10.3390/jof7090728>.
6. Wasser S. P. Medicinal mushrooms in human clinical studies. Part I. Anticancer, oncoimmunological and immunomodulatory activities: a review / S. P. Wasser // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2017. – Vol. 19, № 4. – P. 279-317.
7. Cancer without pharmacological illusions and a niche for mycotherapy (review) / I. V. Zmitrovich, N. V. Belova, M. E. Balandaykin et al. // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2019. – Vol. 21, № 2. – P. 105-119.
8. Medicinal mushrooms as an attractive new source of natural compounds for future cancer therapy / A. Blagodatski, M. Yatsunskaya, V. Mikhailova et al. // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9, № 49. – P. 29259–29274.
9. Promising anti-cancer therapeutics from mushrooms: current findings and future perceptions / M. K. Panda, M. Paul, S. K. Singdevsachan et al. // *Current Pharmaceutical Biotechnology*. – 2021. – Vol. 22(9). – P. 1164-1191.
10. Веденичова Н. П. Цитокініни як регулятори онтогенезу рослин за різних умов зростання / Н. П. Веденичова, І. В. Косаківська. – К.: Наш формат, 2017.
11. Anticancer activity of natural cytokinins: a structure-activity relationship study / J. Voller, M. Zatloukal, R. Lenobel et al. // *Phytochemistry*. – 2010. – Vol. 71. – P. 1350-1359.
12. Колекція культур шапинкових грибів (ІВК) / Н. А. Бісько, М. Л. Ломберг, Н. Ю. Митропольська, О. Б. Михайлова. – К.: Альтер-прес, 2016.
13. 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.
14. Influence of VEGF, EGF and their antagonists on proliferative activity and glucose consumption by endothelial cells / T. Nikolaienko, N. Petruk, D. Shelest, L. Garmanchuk // *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv*. – 2015. – Vol. 69, № 1. – P. 36-38.
15. N<sup>6</sup>-isopentenyladenosine and its analogue N<sup>6</sup>-benzyladenosine induce cell cycle arrest and apoptosis in bladder carcinoma T24 cells / S. Castiglioni, S. Casati, R. Ottria et al. // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. – 2013. – Vol. 13. – P. 672-678.
16. N<sup>6</sup>-isopentenyladenosine: a potential therapeutic agent for a variety of epithelial cancers / M. Spinola, F. Colombo, F. S. Falvella, T. A. Dragani // *International Journal of Cancer*. – 2007. – Vol. 120. – P. 2744-2748.
17. Pharmacogenomics and analogues of the antitumor agent N<sup>6</sup>-isopentenyladenosine / F. Colombo, F. S. Falvella, L. De Cecco et al. // *International Journal of Cancer*. – 2009. – Vol. 124. – P. 2179-2185.
18. N<sup>6</sup>-isopentenyladenosine promoted HeLa cell apoptosis through inhibitions of AKT and transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase 1 activation [Electronic resource] / M. Li, Y. Qi, J. Wei et al. // *Tumor Biology*. – 2017. – Access mode : <https://doi.org/10.1177/1010428317695966>.
19. N<sup>6</sup>-isopentenyladenosine dual targeting of AMPK and Rab7 prenylation inhibits melanoma growth through the impairment of autophagic flux / R. Ranieri, E. Ciaglia, G. Amodio et al. // *Cell Death and Differentiation*. – 2018. – Vol. 25. – P. 353-367.
20. Orto-topolin riboside induces apoptosis in acute myeloid leukemia HL-60 cells / L. Wang, D. L. Yu, H. W. Zhang et al. // *Molecular and Cellular Toxicology*. – 2016. – Vol. 12, № 2. – P. 159-166.
21. Anti-cancer activities of cytokinin ribosides / J. Voller, T. Béres, M. Zatloukal et al. // *Phytochemistry Reviews*. – 2019. – Vol. 18. – P. 1101-1113.
22. Drenichev M. S. Cytokinin nucleosides – natural compounds with a unique spectrum of biological activities / M. S. Drenichev, V. E. Oslovsky, S. N. Mikhailov // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2016. – Vol. 16, № 23. – P. 2562-2576.
23. Preclinical and clinical studies of Coriolus versicolor polysaccharopeptide as an immunotherapeutic in China / Y. Y. Chang, M. Zhang, Y. F. Jiang et al. // *Discovery Medicine*. – 2017. – Vol. 23(127). – P. 207-219.
24. Li J. F. Biological characteristics, pharmacological action and application prospect of Coriolus versicolor / J. F. Li // *Journal of Anhui Agricultural Sciences*. – 2003. – Vol. 1, № 3. – P. 509-510.
25. Dou H. Coriolus versicolor polysaccharopeptide as an immunotherapeutic in China / H. Dou, Y. Chang, L. Zhang // *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. – 2019. – Vol. 163. – P. 361-381.
26. Habtemariam S. *Trametes versicolor* (Synn. *Coriolus versicolor*) polysaccharides in cancer therapy: targets and efficacy / S. Habtemariam // *Biomedicines*. – 2020. – Vol. 8, № 5. – P. 135. – doi:10.3390/biomedicines8050135.
27. Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* / H. Tong, F. Xia, K. Feng et al. // *Bioresource Technology*. – 2009. – Vol. 100. – P. 1682-1686.
28. Antitumor activity of *Pleurotus ostreatus* polysaccharide fractions on Ehrlich tumor and Sarcoma 180 / J. M. Facchini, E. P. Alves, C. Aguilera et al. // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2014. – Vol. 68. – P. 72-77.
29. Antitumor activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus ostreatus* mycelia against gastric cancer in vitro and in vivo / X. Cao, J. Liu, W. Yang et al. // *Molecular Medicine Reports*. – 2015. – Vol. 12. – P. 2383-2389.
30. Bioactivity-guided isolation and chemical characterization of antiproliferative constituents from morel mushroom (*Morchella esculenta*) in human lung adenocarcinoma cells / S. R. Lee, H. S. Roh, S. Lee et al. // *Journal of Functional Foods*. – 2018. – Vol. 40. – P. 249-260.
31. Induction of apoptosis in HepG2 cells by polysaccharide MEP-II from the fermentation broth of *Morchella esculenta* / M. Hu, Y. Chen, C. Wang et al. // *Biotechnology Letters*. – 2013. – Vol. 35. – P. 1-10.
32. Characteristics and antitumor activity of *Morchella esculenta* polysaccharide extracted by pulsed electric field [Electronic resource] / C. Liu, Y. Sun, Q. Mao et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2016. – Vol. 17. – P. 986. – Access mode : <https://doi.org/10.3390/ijms17060986>.
33. Recent advances on bioactive ingredients of *Morchella esculenta* / H. Wu, J. Chen, J. Li et al. // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2021. – doi: 10.1007/s12010-021-03670-1.
34. Effect of cytokinin-containing extracts from some medicinal mushrooms mycelia on HepG2 cells in vitro / N. P. Vedenicheva, G. A. Al-Maali, N. A. Bisko et al. // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2021. – Vol. 23, № 3. – P. 15-28.
35. Circumventing the crab tree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants / L. D. Marroquin, J. Hynes, J. A. Dykens et al. // *Toxicological Sciences*. – 2007. – Vol. 97. – P. 539-547.
36. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins / H. H. J. Gerets, K. Tilmant, B. Gerin et al. // *Cell Biology and Toxicology*. – 2012. – Vol. 28. – P. 69-87.
37. The utility of HepG2 cells to identify direct mitochondrial dysfunction in the absence of cell death / L. Kamalian, A. E. Chadwick, M. Bayliss et al. // *Toxicology in Vitro*. – 2015. – Vol. 29. – P. 732-740.

#### References (Scopus)

1. Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even Warburg did not anticipate. *Cancer Cell*. 2013;21(3):297-308.
2. Hanigan MH, Gallagher BC, Townsend DM, Gabarra V.  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase accelerates tumor growth and increases the resistance of tumors to cisplatin in vivo. *Oxford J*. 1999;20(4):553-559.
3. Corti A, Franzini M, Paolicchi A, Pompella A. Gamma-glutamyltransferase of cancer cells at the crossroads of tumor progression, drug resistance and drug targeting. *Anticancer Res*. 2010;30(4):69-81.
4. Okon IS, Zou M-H. Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: Implications for therapy. *Pharmacol Res*. 2015;100:170-174.
5. Chopra H, Mishra AK, Baig AA, Mohanta TK, Mohanta YK, Baek K-H. Narrative review: bioactive potential of various mushrooms as the treasure of

versatile therapeutic natural product. *J Fungi*. 2021;7:728. <https://doi.org/10.3390/jof7090728>.

6. Wasser SP. Medicinal mushrooms in human clinical studies. Part I. Anticancer, oncoimmunological and immunomodulatory activities: a review. *Int J Med Mushrooms*. 2017;19(4):279-317.

7. Zmitrovich IV, Belova NV, Balandaykin ME, Bondartseva MA, Wasser SP. Cancer without pharmacological illusions and a niche for mycotherapy (review). *Int J Med Mushrooms*. 2019;21(2):105-119.

8. Blagodatski A, Yatsunskaya M, Mikhailova V, et al. Medicinal mushrooms as an attractive new source of natural compounds for future cancer therapy. *Oncotarget*. 2018;9(49):29259-29274.

9. Panda MK, Paul M, Singdevsachan SK, Tayung K, Das SK, Thatoi H. Promising anti-cancer therapeutics from mushrooms: current findings and future perceptions. *Curr. Pharm. Biotechnol*. 2021;22(9):1164-1191.

10. Vedenicheva NP, Kosakivska IV. Cytokinins as regulators of plant ontogenesis under different growth conditions. *Kyiv: Nash Format*; 2017. 200 p.

11. Voller J, Zatloukal M, Lenobel R, et al. Anticancer activity of natural cytokinins: a structure – activity relationship study. *Phytochemistry*. 2010;71:1350-1359.

12. Bisko NA, Lomberg ML, Mytropolska NYu, Mykchaylova O.B. The IBK mushroom culture collection. *Kyiv: Alterpress*; 2016. 120 p.

13. Vedenicheva NP, Al-Maali GA, Mytropolska NYu, et al. Endogenous cytokinins in medicinal basidiomycetes mycelial biomass. *Biotechnol Acta*. 2016;9(1):55-63.

14. Nikolaienko T, Petruk N, Shelest D, Garmanchuk L. Influence of VEGF, EGF and their antagonists on proliferative activity and glucose consumption by endothelial cells. *Bull. T. Shevchenko Nat. Univ. Kyiv*. 2015;69(1):36-38.

15. Castiglioni S, Casati S, Ottria R, et al. N<sup>6</sup>-isopentenyladenosine and its analogue N<sup>6</sup>-benzyladenosine induce cell cycle arrest and apoptosis in bladder carcinoma T24 cells. *Anti-Cancer Agents Med Chem*. 2013;13:672-678.

16. Spinola M, Colombo F, Falvella FS, Dragani TA. N<sup>6</sup>-isopentenyladenosine: a potential therapeutic agent for a variety of epithelial cancers. *Int J Cancer*. 2007;120:2744-2748.

17. Colombo F, Falvella FS, De Cecco L, et al. Pharmacogenomics and analogues of the antitumor agent N<sup>6</sup>-isopentenyladenosine. *Int J Cancer*. 2009;124:2179-2185.

18. Li M, Qi Y, Wei J, Lu L, Zhao X, Zhou L. N<sup>6</sup>-isopentenyladenosine promoted HeLa cell apoptosis through inhibitions of AKT and transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase 1 activation. *Tumor Biol*. 2017. <https://doi.org/10.1177/1010428317695966>.

19. Ranieri R, Ciaglia E, Amodio G, et al. N<sup>6</sup>-isopentenyladenosine dual targeting of AMPK and Rab7 prenylation inhibits melanoma growth through the impairment of autophagic flux. *Cell Death Differ*. 2018;25:353-367.

20. Wang L, Yu DL, Zhang HW, He LY, Wu L. Orto-topolin riboside induces apoptosis in acute myeloid leukemia HL-60 cells. *Mol Cell Toxicol*. 2016;12(2):159-166.

21. Voller J, Bérés T, Zatloukal M, Džubák P, et al. Anti-cancer activities of cytokinin ribosides. *Phytochem Rev*. 2019;18:1101-1113.

22. Drenichev MS, Oslovsky VE, Mikhailov SN. Cytokinin nucleosides – natural compounds with a unique spectrum of biological activities. *Curr Top Med Chem*. 2016;16(23):2562-2576.

23. Chang YY, Zhang M, Jiang YF, et al. Preclinical and clinical studies of *Coriolus versicolor* polysaccharopeptide as an immunotherapeutic in China. *Discov Med*. 2017;23(127):207-219.

24. Li JF. Biological characteristics, pharmacological action and application prospect of *Coriolus versicolor*. *J Anhui Agri Sci*. 2003;1(3):509-510.

25. Dou H, Chang Y, Zhang L. *Coriolus versicolor* polysaccharopeptide as an immunotherapeutic in China. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2019;163:361-381.

26. Habtemariam S. *Trametes versicolor* (Synn. *Coriolus versicolor*) polysaccharides in cancer therapy: targets and efficacy. *Biomedicines*. 2020;8(5):135. doi:10.3390/biomedicines8050135.

27. Tong H, Xia F, Feng K, et al. Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresour Technol*. 2009;100:1682-1686.

28. Facchini JM, Alves EP, Aguilera C, et al. Antitumor activity of *Pleurotus ostreatus* polysaccharide fractions on Ehrlich tumor and Sarcoma 180. *Int J Biol Macromol*. 2014;68:72-77.

29. Cao X, Liu J, Yang W, Hou X, Li Q. Antitumor activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus ostreatus* mycelia against gastric cancer in vitro and in vivo. *Mol Med Reports*. 2015;12:2383-2389.

30. Lee SR, Roh HS, Lee S, et al. Bioactivity-guided isolation and chemical characterization of antiproliferative constituents from morel mushroom (*Morchella esculenta*) in human lung adenocarcinoma cells. *J Funct Foods*. 2018;40:249-260.

31. Hu M, Chen Y, Wang C, et al. Induction of apoptosis in HepG2 cells by polysaccharide MEP-II from the fermentation broth of *Morchella esculenta*. *Biotechnol Lett*. 2013;35:1-10.

32. Liu C, Sun Y, Mao Q, et al. Characteristics and antitumor activity of *Morchella esculenta* polysaccharide extracted by pulsed electric field. *Int J Mol Sci*. 2016;17:986. <https://doi.org/10.3390/ijms17060986>.

33. Wu H, Chen J, Li J, Liu Y, Park HJ, Yang L. Recent advances on bioactive ingredients of *Morchella esculenta*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2021. doi:10.1007/s12010-021-03670-1.

34. Vedenicheva NP, Al-Maali GA, Bisko NA, Kosakivska IV, Ostrovska GV, Khranovska NM, Horbach OI, Garmanchuk LV, Ostapchenko LI. Effect of cytokinin-containing extracts from some medicinal mushrooms mycelia on HepG2 cells in vitro. *Intern J Med Mushrooms*. 2021;23(3):15-28.

35. Marroquin LD, Hynes J, Dykens JA, Jamieson JD, Will Y. Circumventing the crab tree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. *Toxicol Sci*. 2007;97:539-547.

36. Gerets HHJ, Tilmant K, Gerin B, et al. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol Toxicol*. 2012;28:69-87.

37. Kamalian L, Chadwick AE, Bayliss M, et al. The utility of HepG2 cells to identify direct mitochondrial dysfunction in the absence of cell death. *Toxicol in Vitro*. 2015;29:732-740.

Надійшла до редколегії 22.09.2021  
Отримано виправлений варіант 22.10.2021  
Підписано до друку 22.10.2021

Received in the editorial 22.09.2021  
Received version on 22.10.2021  
Signed in the press on 22.10.2021

Н. Веденичева, д-р биол. наук,  
Г. Аль-Маали, канд. биол. наук  
Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины, Киев, Украина,  
Л. Кот, канд. биол. наук,  
Л. Остапченко, д-р биол. наук,  
Л. Гарманчук, д-р биол. наук  
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

## УРОВЕНЬ ГЛЮКОЗЫ И ГАММА-ГЛУТАМИЛТРАНСПЕПТИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В КЛЕТКАХ ГЕПАТОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭКСТРАКТОВ И ЦИТОКИНИНОВЫХ ФРАКЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ГРИБОВ

Грибные экстракты проявляют многофункциональную активность, а также имеют широкий спектр применения для лечения различных заболеваний, в том числе онкологических. Однако полный состав соединений, которые продуцируют макромицеты, обладающие противоопухолевыми свойствами, до сих пор не установлен. Нарушение метаболизма глюкозы и активация гамма-глутамилтрансептидазы (ГГТ) в опухолевых клетках может быть ключевым маркером биохимической анаплазии при новообразованиях. Целью работы было исследовать влияние неочищенных экстрактов и цитокининовых фракций, выделенных из мицелиальной биомассы лекарственных грибов, на биологические свойства клеток гепатоцитарного происхождения линии HepG2 (гепатоцитарной карциномы человека). Объектами исследований были чистые культуры грибов *Hericium coralloides*, *Fomitopsis officinalis*, *Trametes (Coriolus) versicolor*, *Pleurotus ostreatus* и *Morchella esculenta*. Цитокининовые фракции из экстрактов выделяли центрифугированием с последующим фракционированием и очисткой с помощью ионообменной хроматографии. Качественный и количественный анализ цитокининов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. ГГТ-активность определяли с помощью тест-набора "Филисит" (Украина), уровень глюкозы – глюкозооксидазным методом с модификациями для клеточной культуральной среды. При анализе мицелиальной биомассы лекарственных макромицетов выявлено наличие транс-зеатина, зеатинрибозида, зеатин-О-глюкозида и изопентениладенина, что свидетельствует о высокой активности в отношении синтеза цитокининов. Отмечено угнетение диффузии глюкозы из среды культивирования при использовании неочищенных экстрактов и цитокининовых фракций лекарственных грибов, а также снижение ГГТ-активности, более выраженное при действии цитокининовых фракций по сравнению с неочищенными экстрактами. Разница между эффектами неочищенных экстрактов и цитокининовых фракций указывает на комплексный характер действия биологически активных веществ лекарственных грибов. Проведенные исследования по влиянию неочищенных экстрактов и цитокининовых фракций лекарственных грибов обнаружили нормализующий эффект на основные метаболические показатели, изменяющиеся в опухолевых клетках, как механизм биохимической анаплазии.

Ключевые слова: глюкоза, цитокинины, гамма-глутамилтрансептидазная активность, клетки HepG2, лекарственные грибы.

N. Vedenicheva, Dr Hab.,  
G. Al-Maali, PhD  
Kholodny Institute of Botany of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine,  
L. Kot, PhD,  
L. Ostapchenko, Dr Hab., Prof.,  
L. Garmanchuk, Dr Hab.  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

#### THE GLUCOSE LEVEL AND GAMMA-GLUTAMYL TRANSEPTIDASE ACTIVITY IN HEPATOCYTE-LIKE CELLS UNDER THE ACTION OF EXTRACTS AND CYTOKININ FRACTIONS OF MEDICINAL MUSHROOMS

*Mushroom extracts show the multifunctional activity and have a wide range of applications for the treatment of various diseases, including cancer. However, the full composition of the compounds that produce macromycetes that exhibit antitumor properties has not yet been established. Impaired glucose metabolism and activation of gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) in tumor cells may be a key marker of biochemical anaplasia in neoplasms. The aim of the study was to investigate the effect of crude extracts and cytokinin fractions isolated from the mycelial biomass of medicinal mushrooms on the biological properties of cells of hepatocyte-like cells of the HepG2 line (human hepatocellular carcinoma). The objects of the research were pure mushroom cultures of *Hericium coralloides*, *Fomitopsis officinalis*, *Trametes (Coriolus) versicolor*, *Pleurotus ostreatus* and *Morchella esculenta*. Cytokinin fractions from the extracts were isolated by centrifugation followed by fractionation and purification using ion exchange chromatography. Qualitative and quantitative analysis of cytokinins was performed by high-performance liquid chromatography. GGT activity was determined using the kit "Filisit" (Ukraine), glucose level – glucose oxidase method, with modifications for the cellular culture medium. The analysis of mycelial biomass of medicinal macromycetes revealed the presence of trans-zeatin, zeatin riboside, zeatin-O-glucoside and isopentenyladenine, that showed high activity in relation to cytokinin synthesis. Inhibition of glucose diffusion from the cultivation medium with the use of crude extracts and cytokinin fractions of medicinal mushroom and a decrease in GGT activity, more pronounced with the action of cytokinin fractions, compared with crude extracts, was noted. The difference between the effects of crude extracts and cytokinin fractions indicated the complex nature of the action of biologically active substances of medicinal mushroom. Presented results regarding the effects of crude extracts and cytokinin fractions of medicinal mushroom showed a normalizing effect on the main metabolic parameters which change in tumor cells, as a mechanism of biochemical anaplasia.*

**Keywords:** glucose, cytokinins, gamma-glutamyl transpeptidase activity, HepG2 cells, medicinal mushrooms.