

И. Вареник, канд. биол. наук, Н. Шевчук, студ., Н. Рослова, инж., Н. Держинский, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТОЛСТОМ КИШЕЧНИКЕ КРЫС ПРИ ОЖИРЕНИИ И ПРИ ЕГО КОРРЕКЦИИ УТРЕННИМИ И ВЕЧЕРНИМИ ВВЕДЕНИЯМИ МЕЛАТОНИНА

Изучено влияние утреннего и вечернего введения мелатонина на структурно-функциональные изменения в толстой кишке крыс с ожирением в условиях весенне-осеннего фотопериода (12L:12D). Для этого у части животных вызвали ожирение высококалорийной диетой в течение шести недель, после чего нормальным животным и животным с ожирением утром или вечером давали мелатонин в дозе 30 мг/кг в течение семи недель. Через 13 недель брали два образца толстой кишки по 1 см каждый на расстоянии 3 см от анального отверстия; фиксировали их в 10 % формалине и в фиксаторе Карнуа; изготавливали парафиновые срезы толстой кишки; окрашивали их гематоксилин-эозином, альциановым синим-кармином или толуидиновым синим; проводили их микроскопический и морфометрический анализ. Показано, что при ожирении наблюдается гиперактивация слизистой оболочки толстой кишки, редукция и уменьшение активности колоноцитов, гипертрофия слизистых бокаловидных клеток и аккумуляция гранул в тучных клетках. Утреннее введение мелатонина жирным крысам нормализует состояние слизистой оболочки, ослабляет редукцию колоноцитов, однако вызывает гипотрофию бокаловидных клеток. Вечернее введение мелатонина значительно ослабляет редукцию колоноцитов, однако не устраняет других изменений, вызванных ожирением. При этом введение мелатонина (и утреннее, и вечернее) животным без ожирения вызывает активацию слизистой оболочки толстой кишки, гипертрофию бокаловидных клеток, уменьшение активности колоноцитов и не изменяет состояние тучных клеток. Следовательно, нельзя сделать однозначного вывода о возможности коррекции мелатонином всех структурно-функциональных изменений в толстой кишке, вызванных ожирением. Хотя утреннее введение мелатонина имело определенное нормализующее влияние на толстую кишку и было более эффективным, чем вечернее введение.

Ключевые слова: мелатонин, ожирение, толстый кишечник.

I. Varenuk, Ph. D., N. Shevchuk, stud., N. Roslova, ingeneer, M. Dzerzhynsky, Dr. Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

STRUCTURAL CHANGES IN RATS' COLON UNDER OBESITY CONDITIONS AND ITS CORRECTION BY MORNING AND EVENING INJECTION OF MELATONIN

The effect of morning and evening administrations of melatonin on structural and functional changes in the large intestine of rats with obesity under conditions of the spring-autumn photoperiod (12L:12D) was studied in this work. The obesity was caused with a high-calorie diet for 6 weeks. After that, the morning or evening melatonin administrations were given to normal and obese animals at a dose of 30 mg/kg for 7 weeks. After 13 weeks, two specimens of the colon 1 cm each were taken at a distance of 3 cm from the anus; fixed in 10% formalin and in Carnua solution; paraffin sections of the large intestine were made; stained them with hematoxylin-eosin, alcian blue-carmin, or toluidine blue. Microscopic and morphometric analysis of these sections was performed. It has been shown, that obesity cause hyperactivation of the colonic mucosa, reduction of colonocytes, hypertrophy of goblet cells and overaccumulation of granules in mast cells. Morning administration of melatonin to obese animals normalizes the colonic mucosa, decreases the reduction of colonocytes, but causes the hypotrophy of goblet cells. Evening administration of melatonin significantly decreases the reduction of colonocytes, but does not eliminate other changes caused by obesity. The administration of melatonin (both morning and evening) to animals without obesity causes an activation of the mucosa, hypertrophy of goblet cells, reduction of colonocytes, and does not change the state of mast cells. Consequently, it cannot make a clear conclusion about the possibility of correction of all structural-functional changes in the large intestine during obesity by melatonin. Although, the morning administration of melatonin had some normalizing effects on the colon and it was more effective than evening administration.

Key words: melatonin, obesity, large intestine.

UDC 576.3.616

N. Vedenicheva, Dr. Sci., G. Al-Maali, Ph. D., N. Bisko, Dr. Sci., I. Kosakivska, Prof.
M. G. Kholodny Institute of Botany of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine,
L. Garmanchuk, Dr. Sci., L. Ostapchenko, Prof.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

EFFECT OF BIOACTIVE EXTRACTS WITH HIGH CYTOKININS CONTENT FROM MICELIAL BIOMASS OF HERICUM CORALLOIDES AND FOMITOPSIS OFFICINALIS ON TUMOR CELLS IN VITRO

Phytohormones cytokinins are known to promote cell division in plants. Contrary, in animal's and human's tissues they induce apoptosis and block the cell cycle of a wide spectrum of tumour cells. Therapeutic effects of cytokinins, specifically their anticancer and immunomodulatory actions are similar to those of medicinal mushrooms. We detected cytokinins in mycelial biomass of two species of medicinal mushrooms growing in vitro (*Fomitopsis officinalis* strain 5004 and *Herichium coralloides* strain 2332) using HPLC-MS. Trans-zeatin, zeatin riboside, zeatin-O-glucoside and isopentenyladenine were found. Crude extracts and purified cytokinin fractions from mycelial biomass were tested on the growth and development of cultures of tumor cells lines: Hela (MTT-assay), T24/83 (viability and level apoptotic cells) and HepG2 (consumption of glucose). The effect of cytokinin fraction from mycelial biomass of *Fomitopsis officinalis* on pathogenic cells was higher compared to *Herichium coralloides* one. The data obtained revealed a higher cytotoxic/cytostatic effect of the purified cytokinin fractions in comparison with crude methanolic extracts; also higher apoptotic index was found. Under the influence of the test agents the intensification of glucose uptake into cells was observed. This indicator was higher for crude mushroom mycelium extracts, whereas under the action of purified fractions the glucose uptake rate was lower, thus decreased glycolysis level was recorded. Also, the effect of both crude extract and purified fraction from *H. coralloides* mycelial biomass on glucose uptake in the conditioned medium was lower against *F. officinalis*. These results confirm the assumption that biologically active substances of medicinal mushrooms with high pharmacological potential include cytokinins.

Key words: medicinal mushrooms, mycelial biomass, cytokinins, HepG2, T-24/83 and Hela cells.

Introduction. Deadly side effects of artificially synthesized drugs can be avoided only by means of natural preparations or those that are as close as possible to them in composition and structure of substances. Therefore, the urgent task of today is to find alternative therapies using natural biological raw materials. Macromycetes have enormous potential in this regard. Medicinal mushrooms have a wide range of medicinal properties. They exhibit

more than 130 therapeutic effects due to the content of biologically active substances in fruiting bodies and cultured mycelium that enhance innate and acquired immune responses and demonstrate antitumor activity in animals and humans [1, 2]. Polysaccharides and terpenoids are the most studied among them. However, since the systematic study of the biochemical composition of mushrooms, the physiological and medical action of its components has

begun recently, the list of such compounds is not comprehensive. Most likely, the medicinal properties of mushrooms are determined by the presence of a complex of compounds that act jointly, enhancing the effect of each other [3]. The active substances of medicinal mushrooms probably include phytohormones, in particular, cytokinins, whose therapeutic effect has been detected in the last decade [4]. Cytokinins are polyfunctional hormones of plants that are involved in regulating of their growth and development in many aspects, in particular, positively regulating cell division [5]. At the same time, in animal cell culture the addition of cytokinins is known to have an opposite effect. Thus, cytokinin analogues have been found to block cell cycle pattern and inhibit the growth of many types of human cancers [6, 7]. The therapeutic properties of cytokinins were similar to those shown by medicinal mushrooms. The ability to produce cytokinins is inherent in both fruiting bodies [8] and mycelial culture [9] of many medicinal mushroom species. Therefore, it can be assumed that the medicinal properties of mushrooms depend on the cytokinins synthesized in their cells in combination with fungal specific metabolites. However, medical cytokinins testing has only recently begun, and detailed information is lacking today.

Species of basidiomycetes, which have been used in traditional Chinese and European medicine for many centuries, include the honeysuckle coral-like *Hericium coralloides* and the larch sponge *Fomitopsis officinalis* [10]. These are tree-destructive species with a large fruiting body that cause wood rot. In *H. coralloides*, they contain a complex of substances that are used as antidepressants, antioxidants, in the treatment of Alzheimer's and Parkinson's diseases and a number of cancers, to fight insomnia and impotence, to reduce blood cholesterol, etc. [11]. Extracts from *F. officinalis* fruiting body have a wide range of antimicrobial and antiviral activity due to the content of

coumarins and triterpenoids, but the crude extract exhibits the highest activity, in particular against *Mycobacterium tuberculosis* and *Yersinia pseudotuberculosis* [12].

A necessary step to determine the nature of the biologically active substances of medicinal mushrooms is to investigate the effect of cytokinins produced by them on the growth and development of pathogenic cells.

Materials and Methods.

1. Micelial biomass cultivation

Hericium coralloides (Scop.) Pers., strain 2332, and *Fomitopsis officinalis* (Vill.) Bondartsev & Singer, strain 5004, from the IBK Mushroom Culture Collection were studied (Fig. 1). Fungi strains were cultivated in 250 ml Erlenmeyer flasks with 50 ml liquid medium in stationary conditions ($26 \pm 1^\circ \text{C}$) during 20 days in darkness. Inoculation with physiologically active mycelium in proportion of 10 % to the total volume was carried out in accordance with the method developed for Basidiomycetes [13]. Microbiological control of nutrient medium and inoculum material purity was fulfilled before inoculation. For cultivation of *F. officinales* 5004 the following liquid nutrient medium was used: glucose – 30.0 g/l; NH_4NO_3 – 3.5 g/l; KCl – 0.5 g/l; K_2HPO_4 – 1.0 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5 g/l; beer wort (15° in accordance with Baling method) – 115 ml; pH 5.0. For cultivation of *H. coralloides* 2332 such liquid nutrient medium was used: glucose – 25.0 g/l; peptone – 3.0 g/l; yeast extract – 3.0 g/l; KH_2PO_4 – 1.0 g/l; K_2HPO_4 – 1.0 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.25 g/l; pH 6.5. Media acidity was maintained at necessary pH levels by 1 N KOH and 1 N HCl solutions addition.

Mycelial biomass was separated from the culture medium through filtration under vacuum followed by a double rinsing with 50 ml of potassium-phosphate buffered saline, pH 6.5.



Fig. 1. Fruiting bodies of *Hericium coralloides* (left) and *Fomitopsis officinalis* (right) in nature

2. Cytokinins purification

The sample (10 g of mycelial biomass) was homogenized during 3 min using an electrical homogenizer (Mechanika Precyzyjna, Poland) in 80 % methanol solution. Cytokinins were extracted with 80 % methanol (10 ml per 1 g) thrice during 24 h at $+4^\circ\text{C}$. The obtained extract was evaporated under vacuum using the rotor evaporator (Unipan, Poland) at $+50^\circ\text{C}$ to a water phase state. Water residue was kept for 24 h in a freezer at -20°C . After a fast defrosting, it was centrifuged (pH 2.5, 15000 g, $+4^\circ\text{C}$) for 30 min in the K 24 centrifuge (Janetzky, Germany). Supernatant was fractionated with n-butanol (1:1 by volume) at pH 8 and purified using the ion-exchange chromatography on column 20x2 cm (Bio-Rad, USA) with Dowex 50Wx8 (Serva, Germany) in H^+ form, elution with 0.1 N ammonia. Eluate was evaporated under vacuum to a dry residue, which was dissolved in 1 ml of 96 % ethanol and applied

on thin layer chromatography plates Silicagel 60 F₂₅₄ (Merk, Germany), run in solvent system isopropanol:ammonia:water (10:1:1 by volume).

3. HPLC/MS analysis

Detection and quantification of cytokinins were performed using the HPLC-MS system (Agilent 1200, USA). Solid samples were dissolved in 200 μl of mobile phase and 5 μl aliquot was injected into Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 column (4.6x250 mm, 5 μm). The column was eluted with an isocratic solvents system methanol:water:acetic acid (37:62.9:0.1 by volume) at a flow rate of 0.5 ml/min and column temperature of $+30^\circ\text{C}$. The fractions eluted were directly passed through the mass spectrometer (Agilent 6120 Quadrupole LC/MS) in a combined regime "multi mode" (electrospray and chemical ionization at atmosphere pressure) of positive ionization. Data were analysed and processed using the software Agilent Chem-

Station, version B.03.01 online. Concentrations were calculated based on the peak areas for the endogenous compounds relative to those determined for the internal standards. All experiments were carried out in three biological replicates. HPLC-MS analysis was done in five analytical replications. The data was processed by standard methods of variation statistics using Microsoft Excel 2007 program. Values of $P < 0.05$ were considered to be significant.

4. MTT-assay.

For *in vitro* screening of the epithelial line of Hela cells (human cervical carcinoma) has been employed. Cell lines were maintained in a RPMI medium (Sigma, USA) supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine and Penicillin-Streptomycin solution at a final concentration of 50-100 I.U./ml penicillin and 50-100 µg/ml streptomycin. After cell inoculation into 96 well microtiter plates (Falcon, USA), the cells were incubated at 37 °C, 5% of CO₂, 95% air and 100% relative humidity for 24 h prior to addition of test compounds. For a typical screening experiment, cells were cultured in medium containing *H. coralloides* and *F. officinalis* extracts with the growing concentration from 0.0156 to 500 mkg in 100 µL within 24 hrs. The initial plating density of cells was about 5×10^4 cells/mL in 100 µL plate volume. The test agents were added to cells in 100 µL of medium, and cells were cultured for 24 hrs. It was used cells at the about 70-80 % confluent growth. Proliferative parameters of the cultivated cells were defined as it was described elsewhere [14] with the MTT-colorimetric method. The biochemical essence of this method is based on the fact that mitochondrial dehydrogenases of living cells are capable to cleave tetrazolium rings with formation of insoluble purple crystals (formazan). MTT (20 µl) was added to

the culture medium 4 h before the termination of the cells incubation in order to achieve the final concentration of 0.6 mM. Formazan crystals formed after the incubation with MTT were dissolved in 100 µl of dimethylsulfoxide. The plate was analyzed on the spectrophotometer at 540 nm.

5. *Apoptotic and necrotic cells* was determined in wells counts were performed using a trypan blue (necrotic cells) and by cytofluorimetry assay (apoptotic cells) dye after incubation with agents in concentration 0,08 mg/ml as described previously [15]. For them used cells line T24/83 (human bladder tumor).

6. Determination of glucose by glucose-oxidase method.

Determining the level of glucose in the incubation medium of HepG2 cells (human hepatocellular carcinoma) was performed using a standard set based on glucose-oxidase reaction which we modified for culture medium of cells. Initial cell concentration was about 1×10^5 cells/ml in the sample volume of 200 µl. Determination was performed according to the protocol of the manufacturer "Felic-it-Diagnostics" (Ukraine) [16].

Results and Discussion.

Analysis of mycelial biomass of two species of medicinal macromycetes resulted in finding the main cytokinins, the presence of which is characteristic of most plants – *trans*-zeatin zeatinriboside, zeatin-O-glucoside and isopentenyladenine (Table 1). In *H. coralloides* 2332, the content of free cytokinin – *trans*-zeatin – was the highest. In *F. officinalis* 5004, mycelial biomass was characterized by a high concentration of the bound form, zeatin-O-glucoside. The total cytokinin hormone content in *H. coralloides* was almost four times higher than that of *F. officinalis*.

Table 1. Cytokinin content in mycelial biomass of medicinal mushrooms, ng/g FW

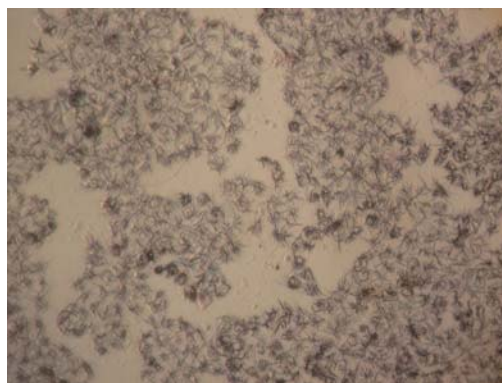
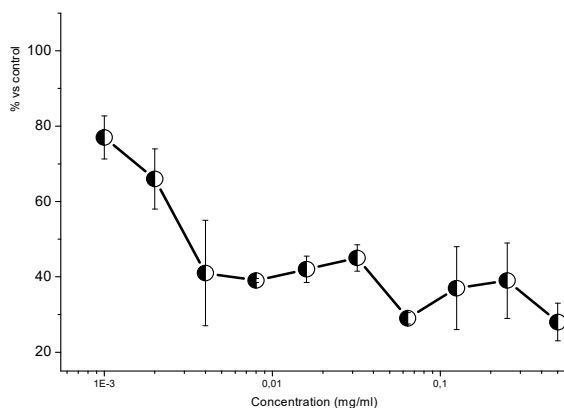
Mushrooms species	t-Z *	ZR*	iPa*	iP*	ZOG*	Σ
<i>Hericium coralloides</i> , strain 2332	941,12±46,8	531,99±26,1	0	348,60±17,3	0	2044,47
<i>Fomitopsis officinalis</i> , strain 5004	81,41±3,7	146,21±6,7	0	0	167,34±7,5	525,41

Notes. *t-Z – *trans*-zeatin, ZR – zeatin riboside; iPa – isopentenyladenosine, iP – isopentenyladenine, ZOG – zeatin-O-glucoside

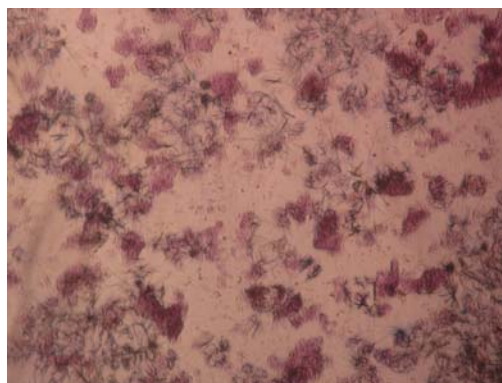
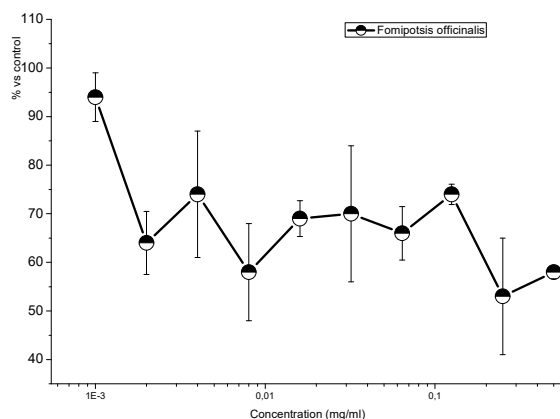
Modern science considers mushrooms as producers of a wide range of compounds that can affect multiple processes in the human body synergistically, so it is important to study the combinations of molecules in fungal extracts [17]. We have established the ability of mycelial biomass of two species of fungi with a high pharmacological potential to produce cytokinins in large quantities. Comparison of the spectra of the pharmacological properties of medicinal mushrooms and cytokinins suggests that cytokinins are one of the components providing the therapeutic effect of macromycetes. In this regard, cytokinin-containing mycelial biomass fractions of *H. coralloides* and *F. officinalis* were tested on cultures tumor cells lines: Hela (MTT-assay), T24/83 (viability and level apoptotic cells) and HepG2 (consumption of glucose) The crude methanol extracts and

cytokinin fractions, purified to the stage of ion exchange chromatography inclusive, were investigated.

The cytotoxic/cytostatic or proliferative effect (cell viability) was estimated as a percent of live cells in comparison against control and expressed in term of median growth inhibition (GI₅₀, the compound's concentration that causes 50 % decrease in the net cell growth or mitogenic stimulation vs control). Higher activity was found for purified cytokinin fractions than for crude methanol extracts. The inhibitory effect for both mushroom species after cytokinin fractions treatment was in the range of 0,04-0,08 mg/ml, whereas IC₅₀ was not determined for crude methanol extract due to large deviations in parallel measurements (Fig. 2 and Fig. 3).

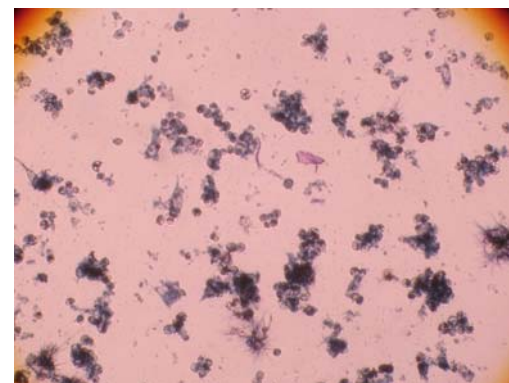
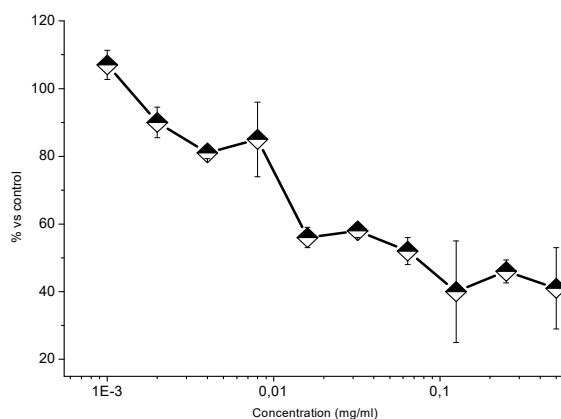


1

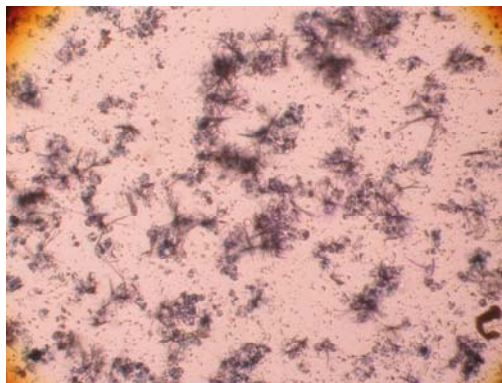
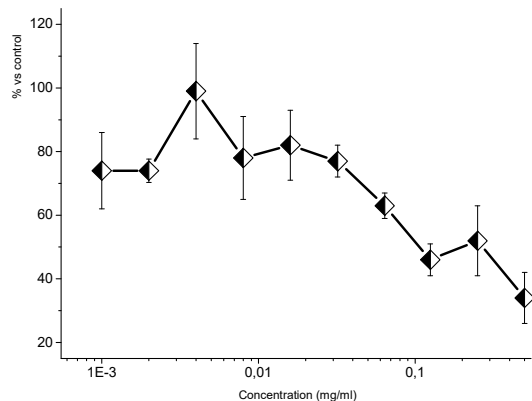


2

Fig. 2. Cytotoxic/cytostatic influence of *F. officinalis* cytokinin fractions (1) and crude methanol extract (2). Typical photo MTT-test



1



2

Fig. 3. Cytotoxic/cytostatic influence of *H. coralloides* cytokinin fractions (1) and crude methanol extract (2). Typical photo MTT-test

To evaluate the level of apoptotic cells and percent viability the cells line of bladder tumor T24/83 was used. The content of dead cells under the effect of the crude extracts was $18,7 \pm 4,3\%$ for *H. coralloides* and $24,3 \pm 3,3\%$ for *F. officinalis*, respectively; while it was $7,6 \pm 1,4\%$ and $10,2 \pm 3,4\%$ for the purified fractions for *H. coralloides* for *F. officinalis*, respectively. However, the percentage of apoptotic cells was higher for the purified fractions with the addition of equimolar concentrations of the substances: $32,8 \pm 5,6$ for *H. coralloides* and $34,4 \pm 1,3$ for *F. officinalis*, respectively, while for crude extracts of *H. coral-*

loides and *F. officinalis* these values were $27,0 \pm 1,6$ and $23,4 \pm 2,8$ respectively.

For metabolic pathways studies we used usually Hep G2 cells. As can be seen from the data under the influence of the test agents the intensification of glucose uptake into cells was observed. This indicator was higher for crude mushroom mycelium extracts, whereas under the action of purified fractions the glucose uptake rate was lower (Table 2). The effect of both crude extract and purified fraction from *H. coralloides* mycelial biomass on glucose uptake in the conditioned medium was lower against *F. officinalis*.

Table. 2. The effect of extracts from *Hericium coralloides* and *Fomitopsis officinalis* mycelial biomass on consumption of glucose by HepG2 cells; ($M \pm m$, $n = 5$, * – $p < 0.05$ relative to control ^-relative crude extract)

Test agent	Glucose level (mkM) in conditional medium
Control	$5,9 \pm 0,3$
<i>Hericium coralloides</i> crude extract	$1,9 \pm 0,1^*$
<i>Hericium coralloides</i> purified fractions	$2,4 \pm 0,2^{*^A}$
<i>Fomitopsis officinalis</i> crude extract	$3,2 \pm 1,0^{*^A}$
<i>Hericium coralloides</i> purified fractions	$4,3 \pm 0,3^*$

Cytokinins are known to change morphology and disorganize actin cytoskeleton of bladder carcinoma T24 cells, block DNA synthesis and increase the level of cycline-dependent kinase inhibitor and induce genes involved in a negative regulation of the cell cycle in tumour cells of epithelium [18–20]. Cytokinins also inhibit the human enterovirus replication, show immunostimulating effects promoting proliferation of natural killer cells, provoke apoptosis in myeloid leukemia HL-60 cells [21–23]. Thus, comparing the data obtained with the literature, we can reasonably assume that the inhibitory effect of fungal extracts on tumor cells is associated with the presence of cytokinins in them. Moreover, the cytokinin fraction from the *F. officinalis* mycelial biomass exhibited greater activity compared to *H. coralloides* one despite the higher cytokinin concentration in it. It has previously been found that aqueous and ethanol fungal extracts from *F. officinalis* exhibit growth-inhibition effect on different cancer cell lines (mouse sarcoma, human hepatoma, lung cancer, colon cancer and breast cancer) [24], whereas *H. coralloides* has another medicinal properties. Perhaps, cytokinins act in complex with different compounds in these mushrooms species.

Conclusion. In the present study the influence of extracts from two species of medicinal Basidiomycetes mycelial biomass on tumor cells of different origin was examined. The data obtained revealed a higher cytotoxic/cytostatic effect of the purified cytokinin fractions in comparison with crude methanolic extracts; also higher apoptotic index and decreased glycolysis were recorded. These results confirm the assumption that biologically active substances of medicinal mushrooms with high pharmacological potential include cytokinins.

Список використаних джерел:

1. Wasser S.P. Medicinal mushrooms in human clinical studies. / S.P. Wasser // Part I. Anticancer, oncoimmunological and immunomodulatory activities : A Review. Int. J. Med. Mushrooms, 2017. – 19 (4). – P. 279–317.
2. Cancer without pharmacological illusions and a niche for mycotherapy (review) / I.V. Zmitrovich, N.V. Belova, M.E. Balandaykin et al. // Int. J. Med. Mushrooms, 2019. – 21 (2) – P. 105–119.
3. Chang S.T. Current and future research trends in agricultural and biomedical applications of medicinal mushrooms and mushroom products / S.T. Chang, S.P. Wasser // Int. J. Med. Mushrooms, 2018. – 20(12). – P. 1121–1133.
4. Anticancer activity of natural cytokinins: A structure-activity relationship study / J. Voller, M. Zatloukal, R. Lenobel et al. // Phytochemistry, 2010. – 71. – P. 1350–1359.
5. Schaller G.E. Cytokinin and the cell cycle. Curr. Opin / G.E. Schaller, I.H. Street, J.J. Kieber // Plant Biol., 2014. – 21. – P. 7–15.

6. Antiproliferative effect of plant cytokinin analogues with an inhibitory activity on cyclin-dependent kinases / K. Vermeulen, M. Strnad, V. Krystof et al. // Leukemia, 2002. – 16. – P. 299–305.
7. Orto-topolin riboside induces apoptosis in acute myeloid leukemia HL-60 cells / L. Wang, D.L. Yu, H.W. Zhang et al. // Mol. Cell. Toxicol., 2016. – 12 (2) – P. 159–166.
8. Detection of phytohormones in temperate forest fungi predicts consistent abscisic acid production and a common pathway for cytokinin biosynthesis / E.N. Morrison, S. Knowles, A. Hayward et al. // Mycologia, 2015. – 107. – P. 245–257.
9. Comparative analysis of cytokinins in mycelial biomass of medicinal mushrooms / N.P. Vedenicheva, G.A. Al-Maali, N.A. Bisko et al. // Int. J. Med. Mushrooms, 2018. – 20(9). – P. 837–847.
10. Hao Y.F. Origin and evolution of China Pharmacopoeia and its implication for traditional medicines / Y.F. Hao, J.G. Jiang // Mini Rev. Med. Chem., 2015. – 15. – P. 595–603.
11. Antioxidant and anti-aging activities of ethyl acetate extract of the coral tooth mushroom, *Hericium coralloides* (Agaricomycetes) / J. Zhang, J. Zhang, L. Zhao et al. // Int. J. Med. Mushrooms, 2019. – 21(6). – P. 561–570.
12. Girometta C. Antimicrobial properties of *Fomitopsis officinalis* in the light of its bioactive metabolites : a review / C. Girometta // Mycology, 2018. – 10(1). – P. 32–39.
13. The IBK Mushroom Culture Collection / N.A. Bisko, M.L. Lomberg, N.Yu. Mytropolska, O.B. Mykchaylova. – Kyiv : M.G. Kholodny Institute of Botany, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine. Kyiv : Alterpres, 2016.
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays / T. Mosmann // J. of Immunological Methods, 1983. – 65. – P. 55–63.
15. A Cytostatic effect of polyphenol compound melanin in combination with Cisplatin on bladder cancer cell line T24/83 / P. Yakovlev, L. Garmanchuk, T. Falalyeyeva et al. // European Urology Supplements, 2018. – 17(10). – e2553–e2554.
16. Influence of VEGF, EGF and their antagonists on proliferative activity and glucose consumption by endothelial cells / T. Nikolaenko, N. Petruk, D. Shelest, L. Garmanchuk // Bull. of T. Shevchenko Nat. Univ. of Kyiv, 2015. – 1(69). – P. 36–38.
17. Medicinal mushrooms as an attractive new source of natural compounds for future cancer therapy / A. Blagodatski, M. Yatsunskaya, V. Mikhailova et al. // Oncotarget., 2018. – 9(49). – P. 29259–29274.
18. N6-isopentenyladenosine and its analogue N6-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 Chem., 2013. – 13. – P. 672–678.
19. Pharmacogenomics and analogues of the antitumour agent N 6 – isopentenyladenosine / F. Colombo, F.S. Falvella, L. de Cecco et al. // Int. J. Cancer, 2009. – 124. – P. 2179–2185.
20. N6-Isopentenyladenosine: A potential therapeutic agent for a variety of epithelial cancers / M. Spinola, F. Colombo, F.S. Falvella, T.A. Dragani // Int. J. Cancer, 2007. – 120. – P. 2744–2748.
21. Chemical modification of the plant isoprenoid cytokinin N⁶-isopentenyladenosine yields a selective inhibitor of human enterovirus 71 replication / V.I. Tararov, A. Tijma, S.V. Kolyachkina et al. // European J. Medicinal Chem., 2015. – 90. – P. 406–413.
22. N6-isopentenyladenosine, an endogenous isoprenoid end product, directly affects cytotoxic and regulatory functions of human NK cells through FDPS modulation / E. Ciaglia, S. Pisanti, P. Picardi et al. // J. Leukocyte Biology, 2013. – 94. – P. 1207–1219.

23. Orto-topolin riboside induces apoptosis in acute myeloid leukemia HL-60 cells / L. Wang, D.L. Yu, H.W. Zhang et al. // Mol. Cell. Toxicol. 2016. – 12(2). – P. 159–166.

24. *In vivo* and *in vitro* anti-tumor effects of fungal extracts / H.T. Wu, F.H. Lu, Y.C. Su et al. // Molecules. 2014. – 19(2). – P. 2546–2556.

Reference (Scopus):

1. Wasser S.P. Medicinal mushrooms in human clinical studies. Part I. Anticancer, oncoimmunological and immunomodulatory activities: A Review. Int. J. Med. Mushrooms. 2017; 19 (4): 279-317.

2. Zmitrovich I.V., Belova N.V., Balandaykin M.E., Bondartseva M.A., Wasser S.P. Cancer without pharmacological illusions and a niche for mycotherapy (review). Int. J. Med. Mushrooms. 2019; 21 (2): 105-119.

3. Chang S.T., Wasser S.P. Current and future research trends in agricultural and biomedical applications of medicinal mushrooms and mushroom products. Int. J. Med. Mushrooms. 2018; 20 (12): 1121-1133.

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

5. Schaller G.E., Street I.H., Kieber J.J. Cytokinin and the cell cycle. Curr. Opin. Plant Biol. 2014; 21: 7-15.

6. Vermeulen K., Strnad M., Krystof V. et al. Antiproliferative effect of plant cytokinin analogues with an inhibitory activity on cyclin-dependent kinases. Leukemia. 2002; 16: 299-305.

7. 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.

8. Morrison E.N., Knowles S., Hayward A. et al. Detection of phytohormones in temperate forest fungi predicts consistent abscisic acid production and a common pathway for cytokinin biosynthesis. Mycologia. 2015; 107: 245-257.

9. Vedenicheva N.P., Al-Maali G.A., Bisko N.A., Shcherbatiuk M.M., Lomberg M.M., Mytropolska N.Yu., Mykchaylova O.B., Kosakivska I.V. Comparative analysis of cytokinins in mycelial biomass of medicinal mushrooms. Int. J. Med. Mushrooms. 2018; 20 (9): 837-847.

10. Hao Y.F., Jiang J.G. Origin and evolution of China Pharmacopoeia and its implication for traditional medicines // Mini Rev. Med. Chem. 2015; 15: 595-603.

11. Zhang J., Zhang J., Zhao L., Shui X., Wang L., Wu Y. Antioxidant and anti-aging activities of ethyl acetate extract of the coral tooth mushroom, *Hericium coralloides* (Agaricomycetes). Int. J. Med. Mushrooms, 2019; 21 (6): 561-570.

12. Girometta C. Antimicrobial properties of *Fomitopsis officinalis* in the light of its bioactive metabolites: a review. Mycology. 2018; 10(1): 32-39.

13. Bisko N.A., Lomberg M.L., Mytropolska N.Yu., Mykchaylova O.B. The IBK Mushroom Culture Collection. Kyiv: M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv: Alterpres, 2016.

14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods. 1983; 65:55-63.

15. Yakovlev P., Garmanchuk L., Falalyeyeva T., Beregova T., Ostapchenko L., Nehelia A. A Cytostatic effect of polyphenol compound melanin in combination with Cisplatin on bladder cancer cell line T24/83. European Urology Supplements. 2018; 17 (10): e2553–e2554.

16. 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. of T. Shevchenko Nat. Univ. of Kyiv. 2015; 1(69): 36-38.

17. Blagodatski A., Yatsunskaya M., Mikhailova V., Tiasto V., Kagansky A., Katanaev V.L. Medicinal mushrooms as an attractive new source of natural compounds for future cancer therapy. Oncotarget. 2018; 9 (49): 29259-29274.

18. Castiglioni S., Casati S, Ottria R, Ciuffreda P, Maier JAM. N6-isopentenyladenosine and its analogue N6-benzyladenosine induce cell cycle arrest and apoptosis in bladder carcinoma T24 cells. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. 2013; 13: 672-678.

19. Colombo F., Falvella F.S., De Cecco L., Tortoreto M., Pratesi G., Ciuffreda P., Ottria R., Santaniello E., Cicatiello L., Weisz A., Dragani T.A. Pharmacogenomics and analogues of the antitumour agent N 6 – isopentenyladenosine. Int. J. Cancer. 2009; 124: 2179-2185.

20. Spinola M., Colombo F., Falvella F.S., Dragani T.A. N6-isopentenyladenosine: A potential therapeutic agent for a variety of epithelial cancers. Int. J. Cancer. 2007; 120: 2744-2748.

21. Tararov V.I., Tijsma A., Kolyachkina S.V., Oslovsky V.E., Nevts J., Drenichev M.S., Leyssen P., Mikhailov S.N. Chemical modification of the plant isoprenoid cytokinin N⁶-isopentenyladenosine yields a selective inhibitor of human enterovirus 71 replication. European J. Medicinal Chemistry. 2015; 90: 406-413.

22. Ciaglia E., Pisanti S., Picardi P., Laezza C., Malfitano A.M., D'Alessandro A., Gazzero P., Vitale M., Carbone E., Bifulco M. N6-isopentenyladenosine, an endogenous isoprenoid end product, directly affects cytotoxic and regulatory functions of human NK cells through FDPS modulation. J. Leukocyte Biology. 2013; 94: 1207-1219.

23. Wang L., Yu D.L., Zhang H.W., He L.Y., Wu L. Orto-topolin riboside induces apoptosis in acute myeloid leukemia HL-60 cells. Mol. Cell. Toxicol. 2016; 12 (2): 159-166.

24. Wu H.T., Lu F.H., Su Y.C., et al. *In vivo* and *in vitro* anti-tumor effects of fungal extracts. Molecules. 2014;19(2):2546–2556.

Investigations were supported by grant 8B "Research of anti-tumor properties of biologically active substances of the cytokinin nature from mycelial biomass of medicinal basidial mushrooms".

Надійшла до редколегії 02.10.19

Отримано виправлений варіант 04.11.19

Підписано до друку 04.11.19

Received in the editorial 02.10.19

Received a revised version on 04.11.19

Signed in the press on 04.11.19

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

ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ЕКСТРАКТІВ З ВИСОКИМ ВМІСТОМ ЦИТОКІНІНІВ З МІЦЕЛІАЛЬНОЇ БІОМАСИ *HERICIAM CORALLOIDES* ТА *FOMITOPSIS OFFICINALIS* НА ПУХЛИННІ КЛІТИНИ *IN VITRO*

Відомо, що фітогормони цитокініни стимулюють поділ клітин у рослин. У тканинах тварин і людини навпаки, вони індукують апоптоз і блокують клітинний цикл широкого спектра пухлинних клітин. Терапевтична дія цитокінінів, зокрема їхня протипухлинна та імуномодуюча дія, аналогічна дії лікарських грибів. Ми виявили цитокініни в міцеліальній біомасі двох видів лікарських грибів, вирощеної *in vitro* (*Fomitopsis officinalis* штам 5004 та *Hericium coralloides* штам 2332). Виявлено транс-зеатин, зеатинрибозид, зеатин-О-глюкозид та ізопентеніладенін. Досліджено вплив неочищених екстрактів та очищених фракцій цитокінінів з міцеліальної біомаси на ріст і розшток культур ліній пухлинних клітин: *Hela* (МТТ-аналіз), T24/83 (життєздатність і рівень апоптотичних клітин) та НерG2 (засвоєння глюкози). Виявлено більш високу цитотоксичну/цитостатичну дію очищених фракцій цитокінінів порівняно з неочищеними метанольними екстрактами; також було зафіксовано вищий апоптотичний індекс. Під впливом досліджуваних агентів спостерігалася посилення поглинання глюкози в клітини. Цей показник був вищим для неочищених екстрактів міцелію грибів, тоді як під дією очищених фракцій швидкість поглинання глюкози була нижчою, реєструвався знижений гліколіз. Також вплив як сирого екстракту, так і очищеної фракції міцеліальної біомаси *H. coralloides* на поглинання глюкози в кондиціонованому середовищі був меншим відносно *F. officinalis*. Вплив цитокінінових фракцій з міцеліальної біомаси *Fomitopsis officinalis* на патогенні клітини був вищим порівняно з *Hericium coralloides*. Ці результати підтримують припущення, що до складу біологічно активних речовин лікарських грибів з високим фармакологічним потенціалом входять цитокініни.

Ключові слова: лікарські гриби, міцеліальна біомаса, цитокініни, НерG2, T-24/83 та *Hela* клітини.

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

ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ЭКСТРАКТОВ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ЦИТОКИНИНОВ С МИЦЕЛИАЛЬНОЙ БИОМАССЫ *HERICUM CORALLOIDES* И *FOMITOPSIS OFFICINALIS* НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ *IN VITRO*

Известно, что фитогормоны цитокинины стимулируют деление клеток у растений. И напротив, в тканях животных и человека они индуцируют апоптоз и блокируют клеточный цикл широкого спектра опухолевых клеток. Терапевтическое действие цитокининов, в частности их противоопухолевое и иммуномодулирующее действие, аналогично действию лекарственных грибов. Мы обнаружили цитокинины в мицелиальной биомассе двух видов лекарственных грибов, выращенной *in vitro* (*Fomitopsis officinalis* штамм 5004 и *Hericum coralloides* штамм 2332). Выявлено транс-зеатин, зеатинрибозид, зеатин-О-глюкозид и изопентениладенин. Исследовали влияние неочищенных экстрактов и очищенных фракций цитокининов из мицелиальной биомассы на рост и развитие культур линий опухолевых клеток: *Hela* (МТТ-анализ), *T24* / 83 (жизнеспособность и уровень апоптотических клеток) и *HerG2* (усвоение глюкозы). Выявлено более высокое цитотоксическое / цитостатическое действие очищенных фракций цитокининов по сравнению с неочищенными метанольными экстрактами; также апоптотический индекс был зафиксирован выше. Под влиянием исследуемых агентов наблюдалось усиление поглощения глюкозы в клетки. Этот показатель был выше для неочищенных экстрактов мицелия грибов, тогда как под действием очищенных фракций скорость поглощения глюкозы была ниже и регистрировался пониженный гликолиз. Также влияние как сырого экстракта, так и очищенной фракции мицелиальной биомассы *H. coralloides* на поглощение глюкозы в кондиционированной среде было меньше по сравнению с *F. officinalis*. Влияние цитокининовой фракции из мицелиальной биомассы *F. officinalis* на патогенные клетки было выше по сравнению с *H. coralloides*. Эти результаты поддерживают предположение, что в состав биологически активных веществ лекарственных грибов с высоким фармакологическим потенциалом входят цитокинины.

Ключевые слова: лекарственные грибы, мицелиальная биомасса, цитокинины, *HerG2*, *T-24/83* и *Hela* клетки.

УДК 581.9 (477.41)

В. Коломійчук, канд. біол. наук, доц.
Ботанічний сад ім. акад. О.В. Фомина, "Навчально-науковий центр Інститут біології та медицини",
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
М. Шевера, канд. біол. наук, ст. наук. співроб.
Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ, Україна,
Є. Воробйов, наук. співроб.
Чорнобильський радіаційно-екологічний біосферний заповідник, Іванків, Україна,
О. Орлов, канд. біол. наук, ст. наук. співроб.
Поліський філіал Українського науково-дослідного інституту лісового господарства та агролісомеліорації
ім. Г.М. Висоцького НАН України та Держлісагентства України, Житомир, Україна,
О. Прядко, канд. біол. наук
Національний природний парк "Голосіївський", Київ, Україна

ERECHTITES HIERACIFOLIA (L.) RAF. EX DC. (ASTERACEAE BERCHT. & J. PRESL) – НОВИЙ ВИД АДВЕНТИВНИХ РОСЛИН ДЛЯ ФЛОРИ КИЇВСЬКОГО ПОЛІССЯ

Повідомлено про знахідку *Erechtites hieracifolia* (L.) Raf. ex DC. (Asteraceae Bercht. & J. Presl) – нового виду адвентивних рослин для флори Київського Полісся, зафіксованого на території Чорнобильського радіаційно-екологічного біосферного заповідника та Національного природного парку "Голосіївський". Вид північноамериканського походження, за часом занесення – кенофіт, за способом занесення – ксенофіт, за ступенем натуралізації – колонофіт. Уперше в регіоні досліджень його виявлено в 2018 р. на території біосферного заповідника: на північній околиці колишнього с. Іловиця Іванківського р-ну Київської обл. Згодом, у 2019 р., вид відмічений ще на двох ділянках заповідника: в околицях колишніх сіл Кливини та Кам'янка цієї області. Загалом зафіксовано понад 30 рослин виду, як вегетативних, які суттєво переважають, так і генеративних. Рослини відмічені спорадично на галявинах соснового лісу та лісових дорогах у складі неформованих рослинних угруповань. У серпні 2019 р. вид виявлено також на території національного природного парку "Голосіївський" (Святошинсько-Біличанське відділення), де рослини росли поодинокі або невеликими групами по 5–10 особин. Нині на досліджених об'єктах природно-заповідного фонду відмічено близько 60 екземплярів виду. На територію Київського Полісся вид потрапив, імовірно, кілька років тому, занесення рослин відбувалося автомагістралями, які вони використовують як вітрові коридори, до яких прилягають лісові масиви, а також за допомогою транспорту; не виключено, що розселення діаспор здійснювалося й за допомогою птахів. Складено картосхеми поширення виду в регіоні. Наведено дані про первинний і вторинний ареал *E. hieracifolia*, еколого-фітоценотичну приуроченість рослин. Реконструйовано основні етапи занесення та подальшого розповсюдження виду в Україні, який поширюється передусім у західних та північних районах країни й виявляє тенденцію до активного поширення в інші регіони. В Європі належить до інвазійних видів, який підлягає контролю за поширенням.

Ключові слова: *Erechtites hieracifolia*, вид адвентивних рослин, флористична знахідка, Київське Полісся, Україна.

Вступ. Останнім часом в Україні спостерігається активне поширення низки видів адвентивних рослин, зокрема і тих, що належать до групи інвазійних. Враховуючи їхній негативний вплив на довкілля, такі види потребують моніторингу та розробки заходів контролю за їхнім подальшим розповсюдженням. До таких, зокрема, належить *Erechtites hieracifolia* (L.) Raf. ex DC. (Asteraceae Bercht. & J. Presl), вид північноамериканського походження [6]. Рослини виду продукують велику кількість (до 30.000) насіння з однієї рослини [14, 16], яке зберігає здатність до проростання протягом восьми років [13]. Утворюючи масові зарості, *E. hieracifolia*, зо-

крема в Поліському природному заповіднику, на частині післяпожежних ділянок щільність його популяцій складає 60–80 особин/м², що призводить до збіднення флористичного різноманіття лісових ценозів, перешкоджаючи природному відновленню проростків та підросту деревного та трав'яно-чагарничкового ярусів. Лімітуючими факторами його поширення є рівень освітлення, вміст мінерального азоту та вологість ґрунту [5]. В Європі цей вид визнаний інвазійним, який підлягає контролю ЕРРО. Окрім того, рослини отруйні, оскільки містять піролізидинові алкалоїди [5]. Зазначається, що *E. hieracifolia* є серед господарів нематод родини