УДК: 582.28+581.19+576.345+615.15

ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА АНТИПРОЛІФЕРАТИВНА АКТИВНІСТЬ ФРАКЦІЙ МЕТАНОЛЬНОГО ЕКСТРАКТУ БАЗИДІОМ *Lactarius pergamenus* (Fr.)Fr

Л. В. Панчак[1]
О. Ю. Ключівська[2]
М. В. Цивінська[3, 4]
Р. С. Стойка[2, 3]
Р. Б. Лесик[1]
В. О. Антонюк[1, 2]

[1]Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького
[2]Інститут біології клітини НАН України, Львів
[3]Львівський національний університет ім. Івана Франка
[4]Науково-дослідний експертно-криміналістичний центр при ГУМВС України у Львівській області

E-mail: antonyuk@meduniv.lviv.ua

Отримано 20.09.2011

Описано методику розділення метанольного екстракту із базидіом гриба *Lactarius pergamenus* за допомогою екстракції органічних розчинників і хроматографії на колонці із силікагелем. Ідентифікацію речовин в одержаних фракціях здійснювали за допомогою мас-спектрометрії. Антипроліферативну активність визначали із використанням культури мишачих лейкозних клітин лінії L1210. Встановлено, що найвищу антипроліферативну активність має фракція, яка містить речовину із жовто-зеленою флуоресценцією в УФ-світлі. Її було ідентифіковано як 3,14,15-триметилфуранолактаран-8-ол. Також помітну роль в цитотоксичному ефекті відіграють супутні вищі жирні кислоти та їхні ефіри. Токсична дія триметилфуранолактарану із *L. pergamenus* на культуру клітин лінії L1210 є в декілька разів слабшою порівняно з таким ефектом алантолактону із кореневищ *Inula helenium*. Однак він є більш ефективним цитостатиком порівняно з алантолактоном. Сесквітерпенові сполуки, що містяться у базидіомах грибів роду *Lactarius*, можуть бути перспективними антипроліферативними чинниками.

Ключові слова: *Lactarius pergamenus*, метанольна екстракція, мас-спектрометрія, 3,14,15-триметилфуранолактаран-8-ол, цитотоксична дія, лейкозні клітини лінії L1210.

Гриби роду *Lactarius* відрізняються від інших грибів родини *Russulaceae* наявністю соку молочної консистенції, однією з функцій якого є захист базидіом від поїдання тваринами. У цьому сокові міститься комплекс речовин, одні з яких зумовлюють гіркоту або пекучий смак, а інші — забезпечують його стабільність. Дослідженнями останніх років показано, що цей сік містить речовини, яким притаманна цитотоксична активність. Цитотоксична дія може бути вибірковою щодо мікроорганізмів, патогенних грибів і пухлинних клітин. Її пов'язують із наявністю у грибах роду *Lactarius Pers*. сесквітерпенових сполук. Наприклад, сесквітерпен ізовелерал, виділений із *Latarius vellereus* (Fr.) Fr., пригнічував ріст грам-позитивних і грам-негативних бактерій у діапазоні концентрацій 0,5–5 мкг/мл і деяких грибів у діапазоні 0,1–5 мкг/мл. Сесквітерпен флавідулол А був високоактивним у дослідах *in vitro* щодо *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* та інших бактерій і грибів [1]. Сесквітерпени лактаровіолін і детерол виявляли помірну цитотоксичність стосовно клітин асцитної форми карциноми Ерліха і клітин лінії L1210 мишачого лейкозу *in vitro* [2]. Цитотоксичні ефекти ізовелералу щодо цих самих клітин спостерігалися за його концентрації 2 мкг/мл [1]. Екстракт із плодових тіл *Lactarius piperatus* (Fr.) S. F. Gray, одержаний екстракцією гарячою водою, пригнічував ріст культури клітин легеневої аденокарциноми Льюїса у білих мишей [3].

Серед хрящів-молочників особливо пекучим смаком відзначаються свіжі гриби *Lactarius vellereus*, *L. piperatus* і *L. pergamenus*; останній став об'єктом цього дослідження. Хрящ-молочник пергаментний (*Lactarius pergamenus* (Fr.) Fr.) — пластинчастий базидіомікотовий гриб, який доволі часто трапляється у листяних і мішаних лісах України в найгарячішу пору літа (липень–серпень).

Метою нашої роботи було дослідження хімічного складу метанольного екстракту базидіом хряща-молочника пергаментного на предмет виявлення речовин із цитотоксичною активністю та дослідження їх антипроліферативної активності.

Матеріали і методи

Матеріали

Базидіоми грибів заготовляли у період масової появи їх у липні-серпні в мішаному лісі Сколівського району Львівської області. Протягом 12 год після збору гриби доставляли в лабораторію і вміщували в сушильну шафу при +52 °С на 24–48 год. Більшу частину базидіом подрібнювали на м'ясорубці і вичавлювали сік під дією сильного пресу. Цей сік використовували для одержання лектину, а шрот, одержаний після вичавлювання соку, висушували в сушильній шафі при +52 °С.

У роботі застосовували силікагель для колонкової хроматографії фірми Chemapol (Чехія) L40/160 меш і розчинники: метанол, *н*-гексан, петролейний ефір ($t_{кип}$ = +40–65 °С), ацетон, етилацетат, хлороформ, ізопропанол, димексид (усі ці реактиви мали кваліфікацію «ч. д. а.»).

Фракціонування за допомогою розчинників та хроматографії на силікагелі

Після висушування шрот і базидіоми подрібнювали до порошку (d < 0,5 мм), вміщували в апарат Сокскслета і впродовж 3–6 год екстрагували різними розчинниками (метанол, хлороформ, метилен-дихлорид, вода). Із одержаних екстрактів відганяли до невеликого об'єму розчинник, рештки якого випаровували в сушильній шафі при +52 °С. Одержаний сухий залишок зважували на аналітичних терезах, а сумарні екстракти використовували для вивчення їхнього хімічного складу і дії на мишачі лейкозні клітини лінії L1210.

У зв'язку з тим, що за результатами попередніх досліджень найбільш виражену цитотоксичність має метанольна фракція, її розділяли на окремі субфракції послідовним екстрагуванням органічними розчинниками і водою у порядку збільшення їхньої полярності (табл. 1). Розчинник відганяли, а одержані витяжки досушували при +52 °С, після чого залишок зважували на аналітичних терезах. Одержані субфракції використовували для дослідження дії на клітини лінії L1210.

Найбільш виражену цитостатичну дію має перша фракція, одержана екстракцією гексаном. Тому надалі її розділяли на колонці силікагелю і досліджували хімічний склад методом тонкошарової хроматографії і мас-спектрометрії.

Під час екстракції гарячим метанолом в апараті Сокскслета до метанольного екстракту переходили речовини, які після охолодження випадали в осад. Як показали наші попередні дослідження, осад, що випадав із метанольного екстракту, містив майже чисту стеаринову кислоту, яка не виявляла цитостатичної активності [4]. Тому за подальшого екстрагування матеріалу з грибів одержаний метанольний екстракт після часткового відганяння метанолу вміщували в морозильну камеру при –18 °С для виморожування основної маси стеаринової кислоти.

Далі розділення одержаної суміші речовин здійснювали за допомогою хроматографічних методів. Із цією метою 2,8 г темно-коричневої густої маси, одержаної екстракцією гексаном метанольного залишку, розчиняли в 12,0 мл *н*-гексану (ч. д. а.), наносили на колонку силікагелю Л 40/160 (висота 40 см, діаметр 2,0 см), яку було попередньо промито чистим *н*-гексаном. Потім колонку промивали послідовно такими розчинниками: *н*-гексан (200 мл), гексан — етилацетат 7,5:1 (300 мл), гексан — етилацетат — етанол 4:2:1 (300 мл), ізопропанол (160 мл) і метанол (200 мл). Після цього колонка повністю очищувалася від пігментних речовин. За результатами вимірювання оптичної густини елюйованого розчину за 300 нм і 450 нм було одержано 6 підфракцій, які позначили як підфракції від №1.1 до №1.6, відповідно. Аналіз отриманих підфракцій здійснювали за допомогою методів тонкошарової хроматографії на пластинках «Силуфол» і мас-спектрометрії. Показано, що одержані підфракції не є індивідуальними речовинами, а становлять складну суміш речовин. Тому концентровані підфракції повторно (кожну окремо) було піддано розділенню на колонці із силікагелем.

Найбільша кількість речовин, що інтенсивно флуоресціювала в УФ-світлі, містилась у підфракціях 1.1–1.3. При цьому речовини із підфракцій 1.1 і 1.2 флуоресціювали синім або фіолетовим світлом, а речовини із підфракції 1.3. — жовто-зеленим або жовто-голубим світлом. Цитотоксична активність речовин фракції 1.3 проти лейкозних клітин лінії L1210 була значно вищою за активність підфракцій 1.1 і 1.2. Тому надалі основну увагу було приділено дослідженню саме цієї підфракції (1.3).

Із цією метою 1,4 г підфракції №1.3 розчиняли в 7 мл *н*-гексану при +30 °С і після розчинення знову вміщували в морозильну камеру для виморожування стеаринової кислоти. Після видалення стеаринової кислоти (≈0,85 г) розчин згущували випаровуванням до об'єму 2 мл і наносили на колонку силікагелю Л 40/160 (висота — 10 см, діаметр — 1,2 см). Колонку промивали послідовно *н*-гексаном (20 мл), сумішшю *н*-гексан — ацетон 10:1 (30 мл) і сумішшю

н-гексан — ацетон — етилацетат 4:2:1 (50 мл), збираючи фракції об'ємом 3 мл.

За допомогою тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинках «Силуфолу» у підфракціях виявляли речовину, що дає жовто-зелену флюоресценцію. Підфракції, що містили цю речовину, об'єднували, а розчинник випаровували.

Очищену підфракцію повторно наносили на колонку силікагелю Л 40/160 (висота — 10 см, діаметр — 1,2 см). Колонку промивали послідовно *н*-гексаном (20 мл), сумішшю *н*-гексан — етилацетат 16:1 (20 мл), сумішшю *н*-гексан — етилацетат 8:1 (20 мл) і метанолом (30 мл). Підфракції, які за даними ТШХ містили лише речовину із жовто-зеленою флюоресценцією, відбирали і розчинник випаровували.

Ідентифікацію одержаної речовини здійснювали за допомогою мас-спектрів на мас-спектрометрі 6C/MS Agilent Technologies 6890 N/5975 B і ЯМР-спектрів. ЯМР ^{1}H-спектри вивчали за допомогою приладу Varian Gemini 300 MHz із використанням тетраметилсилану (TMS) як внутрішнього стандарту за умов,описаних у попередній роботі [4].

Коли попередньо мас-спектрометричному аналізу було піддано очищену фракцію, що містила близько 15,9% речовини із жовто-зеленою флюоресценцією, відповідно до наявної бази даних мас-спектрометрії було встановлено, що мас-спектр одержаної речовини на 90% збігався з еудезма-5,11(13)-дієн-8,12-олідом або алантолактоном, який у значній кількості міститься в кореневищі дев'ясилу (*Inula helenium L.*). Для порівняння фізико-хімічних і біологічних властивостей флуоресціюючої речовини ми також здійснили очищування алантолактону з кореня дев'ясилу.

Із цією метою 150 г кореня дев'ясилу екстрагували в апараті Сокскле та. Метанол з екстракту відігнали до невеликого об'єму, залишок випарували у сушильній шафі при +45 °С. Одержану в'язку жовто-коричневу рідину з приємним запахом тричі екстрагували низькокиплячим петролейним ефіром. Петролейний ефір відганяли на водяній бані до ≈1/4 початкового об'єму, фільтрували й охолоджували до −25 °С. Білий кристалічний осад, що випадав, відфільтровували і промивали холодним петролейним ефіром. Після цього його ще раз перекристалізували із гарячого петролейного ефіру.

Подальше очищення речовини із жовто-зеленою флюоресценцією з базидіом *L. pergamenus* здійснювали за допомогою хроматографії підфракції 1.3 на колонці із силікагелем. Із цією метою розчинену в *н*-гексані підфракцію наносили на попередньо промиту *н*-гексаном колонку із силікагелем Л 40/160, яку після нанесення розчину послідовно промивали *н*-гексаном, *н*-гексан — ацетоном (10:1), *н*-гексан — ацетон — етилацетатом (4:2:1). Одержані підфракції аналізували за допомогою ТШХ. Пробірки, що містили речовину із жовто-зеленою флюоресценцією об'єднували, розчинник видаляли і ще раз здійснювали хроматографію на колонці із силікагелем. Фракції, які за даними ТШХ були найчистішими, аналізували за допомогою масспектрометра і ЯМР-спектрометрії. Згодом їх використовували для дослідження цитотоксичної дії на клітини лінії L 1210 мишачого лейкозу. Їхню дію порівнювали з дією алантолактону, виділеного з кореня дев'ясилу.

Біотестування на культурі клітин

Мишачі лейкозні клітини лінії L1210 було одержано з колекції Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (Київ). Клітини вирощували в середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко (ДМЕМ, Sigma, США) за присутності 10% -ї декомплементованої сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби (СК) і 50 мкг/мл гентаміцину (Sigma, США). Для визначення цитотоксичності алантолактону і речовини із жовто-зеленою флюоресценцією (одержаної, як описано нижче, з базидіом *L. pergamenus*, ідентифікованої як триметилфуранолактаран), клітини висівали у 24-лункові пластикові планшети в середовищі ДМЕМ за присутності 10% СК. Через 24 год до середовища з клітинами додавали вищезазначені препарати в різній концентрації. Підрахунок кількості клітин здійснювали в гемоцитометричній камері Горяєва через певні проміжки часу. Густину клітинної суспензії визначали за формулою: c = 12 500 n, де c — кількість клітин в 1 мл суспензії, n — середня кількість клітин у п'яти великих квадратах камери Горяєва. Відсоток мертвих клітин визначали після їх фарбування 0,1% (w/v) розчином трипанового синього, підрахувавши зафарбовані й незафарбовані клітини у світловому режимі мікроскопа МикМед 12 (ЛОМО, Російська Федерація). Трипанпозитивні клітини позначали як некротичні, оскільки в них було ушкоджено цілісність плазматичної мембрани. Відсоток апоптичних клітин визначали після фарбування їх акридиновим оранжевим (0,3 мкг/мл, 10 хв) і перегляду в люмінесцентному режимі мікроскопа. Критеріями зарахування клітин до апоптичних були конденсація ядерного хроматину, фрагментація ядер і/або клітин, утворення апоптичних тілець.

Статистичний аналіз

Кожен експеримент виконували тричі з трьома паралелями. Значення різниці результатів у типових експериментах оцінювали за критерієм Стьюдента, вважаючи вірогідною різницю за значення $P \leq 0{,}05$.

Результати та обговорення

У попередніх наших дослідженнях показано, що метанольний екстракт, одержаний із базидіом *Lactarius pergamenus*, має досить високу антипроліферативну активність [5]. Тому вважали за доцільне фракціонувати метанольний залишок різними розчинниками й аналізувати хімічний склад отриманих субфракцій за допомогою ГРХ-мас-спектрометрії, а також перевірити антипроліферативну активність очищених субфракцій. У процесі екстрагування метанольного залишку (1 г) органічними розчинниками в порядку зростання їхньої полярності було одержано 8 субфракцій та незначний залишок, який не піддавався розчиненню. Результати кількісного і якісного аналізу одержаних субфракцій та попереднє оцінювання їхньої антипроліферативної активності подано в табл. 1. Оскільки в усіх субфракціях було виявлено високий вміст стеаринової кислоти, його виділено в окрему графу.

Наведені в табл. 1 дані вказують на те, що найвищу цитотоксичність у культурі досліджуваних клітин має субфракція, одержана екстракцією гексаном. Тому саме її було взято для подальших досліджень. Стеаринова кислота, розчин якої також було досліджено як контроль, цитотоксичної дії не

Таблиця 1. **Хімічний склад метанольного екстракту базидіом *L. pergamenus* та оцінка антипроліферативної активності його субфракцій**

№ субфракції	Екстрагент	Маса після висушування	Хімічний склад одержаних субфракцій		Оцінка дії на клітини мишачого лейкозу лінії L1210
			Основні ідентифіковані речовини та їх кількість	У т. ч. стеаринової к-ти (у% до загальної маси)	
1	Гексан	247,0 мг	Понад 60 речовин, у т. ч. сесквітерпенові сполуки	?	Кількість мертвих клітин більше 60%, багатоядерних клітин немає
2	Хлороформ	55,5 мг	Пальмітинова к-та 1,79% Олеїнова кислота 2,83% (усього 6 речовин)	85,8	Кількість мертвих клітин більше 50%, багатоядерних клітин немає
3	Діетиловий ефір	16,5 мг	Містить понад 30 неідентифікованих речовин	?	Кількість мертвих клітин становить 30–40%, є невелика кількість багатоядерних клітин
4	Етилацетат	10,0 мг	Гліцерол 6,3% Пальмітинова к-та 1,03% (містить 5 речовин)	87,6	Кількість мертвих клітин становить 25–35%, є невелика кількість багатоядерних клітин
5	Бутанол	30,0 мг	Гліцерол 21,51% Гліцеролу триацетат 14,12% Гліцеролу α-моноацетат 3,34% (містить 4 речовини)	61,0	Кількість мертвих клітин незначна, є рештки зруйнованих клітин і багатоядерні клітини (містять 3–4 ядра)
6	Ізопропанол	20,0 мг	Гліцерол 40,2%	59,8	Кількість живих клітин — на рівні контролю, присутні великі агрегати аглютинованих клітин
7	Метанол	95,0 мг	Понад 30 неідентифікованих речовин	?	Кількість живих клітин — на рівні контролю
8	Дистильована вода	483,5 мг	Маніт 85,26%	14,7	Кількість живих клітин — на рівні контролю, є тенденція до стимуляції проліферації клітин
9	Нерозчинний залишок	3,5 мг	Аналіз не проводили		Аналіз не проводили
	Сума	961,0 мг			

Примітка. У таблицю не внесено речовини, ідентифікація яких за даними хімічних досліджень виявилася недостовірною.

виявляла і згодом її видаляли з метанольного екстракту шляхом виморожування (див. розділ «Матеріали і методи»).

Після виморожування стеаринової кислоти метанольний екстракт — темно-коричневу в'язку рідину — розділяли на 6 підфракцій за допомогою хроматографії на колонці із силікагелем Л 40/160 (Chemapol).

Одержані підфракції далі аналізували за допомогою ГРХ-мас-спектрометрії і досліджували їхню антипроліферативну активність. Отримані дані наведено в табл. 2.

Наступним етапом у дослідженні було розроблення методу очищення з підфракції 1.3 речовини, яку за допомогою мас-спектрометра було ідентифіковано як еудезма-5,11(13)-дієн-8,12-олід. Із цією речовиною ми й пов'язували основну цитотоксичну дію на клітини лінії L1210 мишачого лейкозу.

Відомо, що в коренях дев'ясилу міститься низка сполук, дуже близьких до цієї структури і відомих за тривіальною назвою як алантолактон та ізоалантолактон. Згідно з даними літератури, вони також справляють цитотоксичну дію [6]. Тому нами з кореня дев'ясилу було очищено кристалічну речовину, яка за даними мас-спектрометрії виявилася сумішшю алантолактону (42,5%) та ізоалантолактону (55,5%) із невеликою домішкою 4-α-епоксіалантолактону (0,32%), і її використали як контроль у цитологічних дослідженнях. Усього зі 150 г повітряно-сухих коренів дев'ясилу після трикратної перекристалізації з метанолу було одержано 0,708 г білої кристалічної речовини. Вона мала температуру плавлення +72–74 °С і під час хроматографії на силікагелі у системі петролейний ефір — етилацетат (5:1) після зрошування сумішшю 1%-й ванілін — сульфатна к-та — етанол (4:1) давала фіолетову пляму зі значенням Rf = 0,6. За даними літератури, це відповідає алантолактону [7].

Ідентифікація речовини з подібною структурою у базидіомах гриба *L. pergamenus*

Таблиця 2. **Якісний і кількісний склад підфракцій метанольного екстракту базидіом гриба *L. pergamenus* та загальна оцінка їхньої дії на клітини мишачого лейкозу**

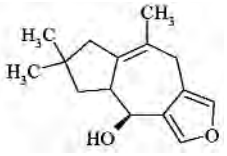
№ підфракції	Масова частка підфракції (%)	Хімічний склад одержаних підфракцій (основні речовини, ідентифіковані за допомогою мас-спектрометрії, і кількість виявлених речовин)	Загальна оцінка дії 1%-го розчину підфракції на клітини лінії L1210 мишачого лейкозу
1.1	0,07%	1. Біс (2-етилгексил) фталат — 50,6% 2. Діізобутилфталат — 4,4% 3. *2,2,4-триметилфуроазулен — 7,36%* 4. 2,6,10-триметил-1,5,9-ундекатрієн — 13,64% 5. Метилстеарат — 13,9%	Низька цитостатична дія у дозах вище 5 мкг/мл
1.2	0,6%	1. Біс (2-етилгексил) фталат — 1,1% 2. Олеїнова кислота — 10,4% 3. Метилстеарат — 15, 6% 4. Етилпальмітат — 3,2% 5. 9,12-октадекандієнової кислоти метиловий ефір — 6,8% 6. Стеаринова кислота — 62,9%	Низька цитостатична дія у дозах вище 5 мкг/мл
1.3	51,73%	1. Еудезма-5,11(13)-дієн-8,12-олід — 15,91% 2. 9-октадеканової кислоти 2,3-дигідропропіловий ефір — 43,1% 3. Нафто-(2,3-b) фуран 2,3Н-он — 2,95% 4. Стеаринової кислоти 2-гідрокси-1-метил-пропіловий ефір — 19,35% 5. 9,17-октадекадієналь — 2,16% Усього — 24 речовини	Найбільш виражена цитотоксична дія у дозі ≈ 2 мкг/мл
1.4	42,85%	Понад 60 речовин, у т. ч. сесквітерпенові сполуки	Активна фракція, цитотоксична дія якої більш виражена у разі розчинення в ДМСО, ніж в етанолі
1.5	2,24%	1. 3-етил-4-метилпентанол (листковий альдегід) — 25,6% 2. *n*-нонанал (пеларгонієвий альдегід) — 21,3% 3. 7-метокси-5-етокси-2,2-диметилхроманон — 53,1%	Цитотоксична дія виявляється за розчинення фракції у ДМСО
1.6	2,51%	1. Бета-нафтиламін — 35,7% 2. Ліноленової кислоти хлорид — 64,3%	Цитотоксична дія виявляється за розчинення фракції у ДМСО

Примітка. Курсивом у таблиці позначено речовини, ступінь імовірності правильної ідентифікації яких за допомогою мас-спектрометрії був нижчим за 50%.

полегшувалася тим, що в УФ-світлі за тонкошарової хроматографії на пластинках «Силуфол» вона має жовто-зелену флюоресценцію. За даними хроматографічних і спектрометричних досліджень (ТШХ на силікагелі, мас-спектрометрія і ЯМР-спектрометрія), чистота одержаної речовини становила близько 98%. Ця світло-жовта олієподібна речовина застигає у тверду масу при температурі −17(±1) °С і розчиняється в метанолі, етанолі, гексані, ацетоні, диметилсульфоксиді, але нерозчинна у воді.

У ЯМР-спектрі отриманої сполуки виявлено характерний субспектр важкодиференційованих аліфатичних протонів у ділянці слабкого магнітного поля за 1,29–2,40 м. ч. Сигнали метильних груп утворюють шестипротонний синглет за 1,29 м. ч. і трипротонний — за 1,34 м. ч. Характерним є сигнал вторинної гідроксильної групи у вигляді однопротонного дублета за 4,20 м. ч. Протони анельованого фуранового циклу утворюють двопротонний широкий синглет за 5,39 м. ч. ЯМР ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] 1,29с (6H, 2·CH_3); 1,34с (3H, CH_3); 1,63–1,69м, 2,00–2,10м, 2,36–2,40м (8H, 3·CH_2, 2·CH); 4,20д (1H, OH); 5,39шс (2H =CH).

Дані мас-спектроскопії і ЯМР ^{1}H-аналізу дають підстави припустити, що одержана речовина є 6,6,8-триметил-4,4a,5,6,7,9-гексагідро-2-оксациклопента[f]азулен-4-олом, або 3,14,15-триметилфуранолактаран-8-олом із такою структурою:



Біотестування триметилфуранолактарану, одержаного з гриба *Lactarius pergamenus*, проведене паралельно із тестуванням алантолактолактону з *Inula helenium* на мишачих лейкозних клітинах лінії L1210, показало, що біологічна дія триметилфуранолактарану з *L. pergamenus* виявляється починаючи з 8-ї год від додавання його до клітин у дозі 5 мкг/мл. Через 24 год його дія посилюється і виявляється вже в дозі 0,5 мкг/мл. При цьому спостерігається суттєве зростання відсотка трипанпозитивних клітин, що досягає ~80% за дії цього чинника в дозі 10 мкг/мл на 2-гу год або в дозі 5 мкг/мл — на 8-му год експерименту.

Загалом вплив сесквітерпену з гриба *L. pergamenus* упродовж перших 5 діб у діапазоні концентрацій 0,5–5,0 мкг/мл можна класифікувати як цитостатичний. У вищих концентраціях і за більшої тривалості дії переважає токсичний ефект, що призводить до повного відмирання клітин у популяції (рис. 1).

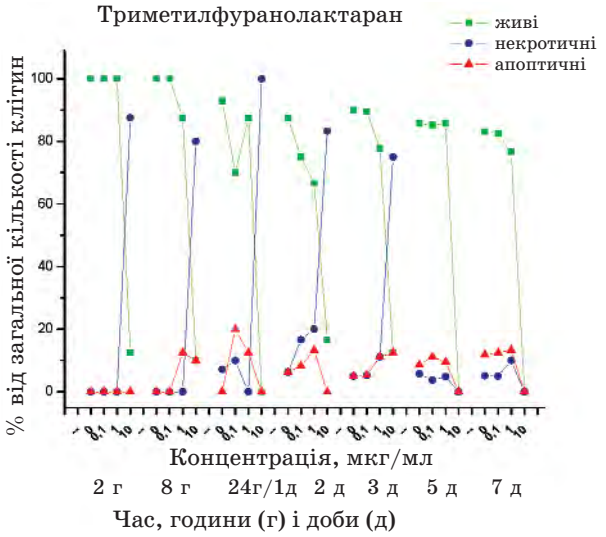


Рис. 1. **Дія триметилфуранолактарану із базидіом гриба *Lactarius pergamenus* на клітини лінії L1210 мишачого лейкозу**

Алантолактон із *Inula helenium* починає діяти на 4-ту год від початку експерименту (мінімальна діюча концентрація — 0,1 мкг/мл). На 24-ту год його токсичний ефект досягає максимуму (мінімальна діюча концентрація — 0,05 мкг/мл) і на 5-ту добу спостерігається майже повна елімінація клітин із популяції (рис. 2).

Таким чином, нами проведено дослідження антипроліферативної дії різних підфракцій метанольного екстракту базидіом грибів *L. pergamenus* щодо клітин мишачого лейкозу лінії L1210. Найвищу антипроліфе-

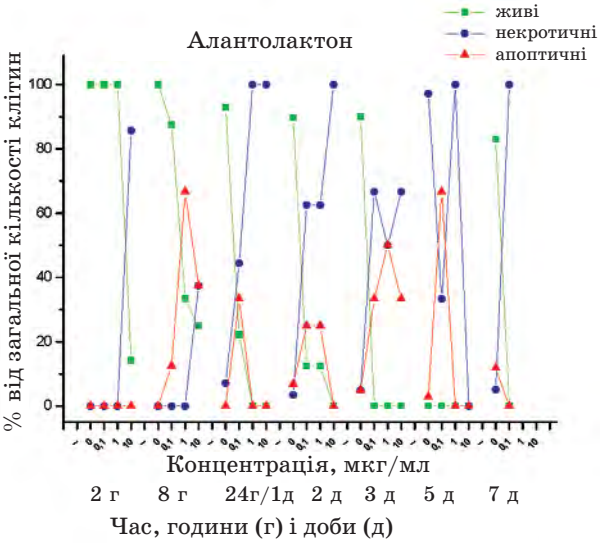


Рис. 2. **Дія алантолактону із кореневища дев'ясилу на клітини лінії L1210 мишачого лейкозу**

ративну активність виявлено у підфракцій, які містять сесквітерпени, зокрема у речовини із жовто-зеленою флуоресценцією. Цю речовину ідентифіковано як 3,14,15-триметилфуранолактаран-8-ол. Вона дуже близька або ідентична за структурою до речовини, одержаної екстракцією гарячим метанолом із морфологічно подібного виду гриба *L. vellereus* [8, 9]. Слід відзначити, що у вегетуючих базидіомах *L. vellereus* міститься нестійка на повітрі речовина з пекучим смаком (стеарилвелютинал), яка в процесі екстракції метанолом та контакту з киснем повітря відщеплює стеаринову кислоту та перетворюється на триметилфуранолактаран [9, 10]. Остання вже є достатньо стійкою під час зберігання, не має пекучого смаку і структурно дуже близька або ідентична речовині, одержаній нами. Стеарилвелютинал значною мірою відповідальний за те, що молоді вегетуючі базидіоми майже не ушкоджуються мікроорганізмами, личинками комах та тваринами, але через його виняткову нестійкість він не має широкої перспективи застосування в медицині. Триметилфуранолактаран, який можна одержати з базидіом *L. pergamenus* без особливих технологічних складнощів, як виявилось у результаті поставленого експерименту, також виявляє сильну біологічну дію.

Незважаючи на слабшу цитотоксичну дію триметилфуранолактарану із гриба *L. pergamenus* порівняно з алантолактоном із кореневища дев'ясилу *Inula helenium*, він є більш ефективним цитостатиком. Ці дані можуть становити певний інтерес для подальших досліджень сесквітерпенових сполук, що містяться в базидіомах грибів роду *Lactarius*, на предмет їхньої антинеопластичної дії.

Отже, в підсумку можна зазначити, що метанольний екстракт, одержаний із висушених базидіом гриба *Lactarius pergamenus*, характеризується високим вмістом стеаринової кислоти, основну масу якої можна видалити шляхом виморожування.

Наступне послідовне оброблення отриманого метанольного екстракту гексаном і хлороформом призводить до екстрагування речовин, що мають антипроліферативну активність. Цитостатична дія метанольного екстракту пов'язана в основному з наявністю сесквітерпенів, однак вищі жирні кислоти та їхні ефіри також можуть відігравати важливу роль у цитотоксичному ефекті цього екстракту.

Нами вперше досліджено дію окремих фракцій метанольного екстракту та очищеного триметилфуранолактарану із гриба *L. pergamenus* на клітини мишачого лейкозу лінії L1210. Виявлено, що її токсичний ефект у декілька разів слабший порівняно з таким ефектом алантолактону з кореневища дев'ясилу *Inula helenium*. Водночас триметилфуранолактаран є більш ефективним цитостатиком, ніж алантолактон. Подальше дослідження сесквітерпенових сполук базидіом грибів роду *Lactarius* може бути перспективним на предмет виявлення їхньої антинеопластичної дії.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Vidari G., Vita-Finzi P.* Sesquiterpenes and other secondary metabolites of genus Lactarius (Basidiomycetes): Chemistry and biological activity // Stud. Nat. Prod. Chem. — 1995. — V. 17. — P. 153–206.
2. *Anke H., Bergendorff O., Sterner O.* Assays of the biological activities of guaiane sesquiterpenoids isolated from the fruit bodies of edible lactarius species // Food Chem. Toxicol. — 1989. — V. 27, N 6. — P. 393–397.
3. *Dulger B. Yilmaz F., Gucin F.* Antimicrobial activity of some *Lactarius* species // Pharmac. Biol. — 2002. — V. 40, N 4. — P. 304–306.
4. *Панчак Л. В., Цивінська М. В., Антонюк В. О., Стойка Р. С.* Аналіз хімічного складу вимороженого метанольного екстракту із базидіом справжніх грибів // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 5. — С. 90–96.
5. *Ключівська О. Ю., Панчак Л. В., Цивінська М. В. та ін.* Дослідження антипроліферативної активності сесквітерпенового лактону з плодових тіл *Lactarius pergamenus* // Матеріали X Укр. біохім. з'їзду. — Укр. біохім. журн. — 2010. — Т. 82, № 4. — С. 262–263.
6. *Konishi T., Shimada Y., Nagao T. et al.* Antiproliferative Sesquiterpene Lactones from the Roots of *Inula helenium* // Biol. Pharm. Bull. — 2002. — V. 25, N 10. — P. 1370–1372.
7. *Li Tong, Huanli Xu, Rezengcaidan Y. et al.* A rapid identification of *Radix inulae* and its active component alantolactone in the Tibetan medicine Manuxitang // BioScience Trends. — 2008. — V. 2, N 2. — P. 64–67.
8. *Sterner O., Bergman R., Kesler E. et al.* Velutinal esters of *Lactarius vellereus* and *L. necator*. The preparation of free velutinal // Tetrahedron Lett. — 1983. — V. 24, N 13. — P. 1415–1418.
9. *Kamo T., Matsue M., Kashiwabara M., Hirota M.* 1,2-Dehydrolactarolide A, a New Plant Growth Regulatory Lactarane Sesquiterpene from *Lactarius vellereus* // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 2006. — V. 70, N 9. — P. 2307–2309.
10. *Hansson T., Pang Z., Sterner O.* The Conversion of [12-$^2H_3$]-Labelled Velutinal in Injured Fruit Bodies of *Lactarius vellereus*. Further Insight into the Biosynthesis of the russulaceae Sesquiterpenes //Acta Chem. Scand. — 1993. — V. 47. — P. 403–405.

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ФРАКЦИЙ МЕТАНОЛЬНОГО ЭКСТРАКТА БАЗИДИОМ *Lactarius pergamenus* (Fr.)Fr

Л. В. Панчак[1]
О. Ю. Ключивская[2]
М. В. Цивинская[3, 4]
Р. С. Стойка[2, 3]
Р. Б. Лесик[1]
В. О. Антонюк[1, 2]

[1]Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого
[2]Институт биологии клетки НАН Украины, Львов
[3]Львовский национальный университет им. Ивана Франко
[4]Научно-исследовательский экспертно-криминалистический центр при ГУМВД Украины во Львовской области

E-mail: antonyuk@meduniv.lviv.ua

В работе описана методика разделения метанольного экстракта из базидиом гриба *Lactarius pergamenus* с помощью экстракции органическими растворителями и хроматографии на колонке с силикагелем. Идентификацию веществ в полученных фракциях осуществляли с помощью масс-спектрометрии. Антипролиферативную активность определяли с использованием культуры мышиных лейкозных клеток линии L1210. Обнаружено, что наивысшей антипролиферативной активностью обладает фракция, содержащая вещество с желто-зеленой флуоресценцией в УФ-свете, которое было идентифицировано как 3,14,15-триметилфуранолактаран-8-ол. Также заметную роль в цитотоксическом эффекте играют сопутствующие высшие жирные кислоты и их эфиры. Токсическое действие триметилфуранолактарана из *L. pergamenus* на культуру клеток линии L1210 мышиного лейкоза в несколько раз слабее по сравнению с таким эффектом алантолактона из корневищ *Inula helenium*. Однако триметилфуранолактаран является более эффективным цитостатиком по сравнению с алантолактоном. Сесквитерпеновые соединения, содержащиеся в плодовых телах грибов рода *Lactarius*, могут быть перспективными антипролиферативными агентами.

Ключевые слова: *Lactarius pergamenus*, метанольная экстракция, масс-спектрометрия, 3,14,15-триметилфуранолактаран-8-ол, цитотоксическое действие, лейкозные клетки линии L1210.

THE CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF FRACTIONS OF THE METHANOL EXTRACT FROM THE BASIDIOMES OF *Lactarius pergamenus* (Fr.)Fr

L. V. Panchak[1]
O. Yu. Klyuchivska[2]
M. V. Tsivinska[3, 4]
R. S. Stoika[2, 3]
R. B. Lesyk[1]
V. O. Antonyuk[1, 2]

[1]Danylo Halytsky Lviv National Medical University
[2]Institute of Cell Biology of National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv
[3]Ivan Franko Lviv National University
[4]Scientific and Research Criminal Expertise Centre of Ministry of Internal Affairs of Ukraine in Lviv region

E-mail: antonyuk@meduniv.lviv.ua

The method of fractionation of the methanol extract from basidiomes of *Lactarius pergamenus* mushroom by the organic solvents and chromatography on the silica gel column is described. Identification of substance in the obtained fractions was carried out by mass-spectrometry. Antiproliferative activity was defined in the culture of murine leukemia cells of L1210 line. It was found that the fraction containing a substance with yellow-green fluorescence under UV light possessed the highest antiproliferative activity. This substance was identified as 3,14,15-trimethylfuranolactarane-8-ol. Concomitant higher fatty acids and their ethers also play a noticeable role in cytotoxic effect. The toxic effect of trimethylfuranolactaran of *L. pergamenus* towards the cultured murine leukemia cells of L1210 line was many times weaker as compared to such effect of the alantolactone of the *Inula helenium* rhizomes. However, trimethylfuranolactaran is more effective cytostatic as compared to alantolactone. Thus, the sesquiterpen substances of fruit bodies of *Lactarius* mushrooms be perspective antiproliferative agents.

Key words: *Lactarius pergamenus*, methanol extraction, mass-spectrometry, 3,14,15-trimethylfuranolactarane-8-ol, cytotoxic effect, murine leukemia cells of L1210 line.