

ПАЛЛАДІН М., ЄМЕЦЬ А.

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,
Україна, 04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького, 2а, ORCID: 0000-0001-6887-0705
m.a.palladin@gmail.com, yemets.alla@nas.gov.ua

ОСОБЛИВОСТІ ІЗОЛЮВАННЯ ЕКЗОСОМ З МІЦЕЛІЮ ТРУТОВИКА ЛАКОВАНОГО (*GANODERMA LUCIDUM* (CURTIS) P. KARST)

Мета. Застосувати запропоновані методи отримання екзосом та підібрати умови для ефективного ізолювання цих нановезикул з міцелію гриба трутовика лакового (*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.). Отримати екзосоми з клітин міцелію *G. lucidum* та провести їх морфометричний аналіз. **Методи.** Для отримання та аналізу ізолюваних екзосом з міцелію гриба трутовика лакового використовували мікробіологічні, мікроскопічні, седиментаційні та спектрофотометричні методи досліджень. **Результати.** Протестовано різні методи ізолювання екзосом та підібрано ефективний спосіб подрібнення, гомогенізації та очистки екзосом із міцелію *G. lucidum*, культивованого в умовах *in vitro*. Вперше проведено ізолювання та первинну ідентифікацію екзосом з міцелію *G. lucidum*. **Висновки.** Розроблений підхід для ізолювання екзосом з міцелію гриба *G. lucidum*, вирощеного у стаціонарних асептичних умовах *in vitro*, є важливим етапом для подальшого дослідження біологічної активності цих нановезикул та можливості їх практичного застосування.

Ключові слова: *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., міцелій, екзосоми, ізолювання.

Екзосоми – це мембранні структури, які мають розмір приблизно від 30 до 160 нм та секретуються клітинами прокаріотичних та еукаріотичних організмів. У період відкриття екзосом, їх сприймали лише як відходи життєдіяльності клітин, однак на сьогодні визначено, що основна функція екзосом це перенесення протеїнів, ліпідів та нуклеїнових кислот, що містяться у їх складі, між клітинами організму. Особливо важливим є здатність ефективного транспортування екзосомами РНК, оскільки їх мембрана захищає нуклеїнові кислоти від деградаційного впливу РНКаз (рибонуклеази). Тобто, біологічна цінність екзосом полягає у їх здатності опосередковувати міжклітинний зв'язок шляхом передачі інформації між клітинами, що викликає велику зацікавленість у більш ретельному дослідженні цих нановезикул [1] з метою, зокрема, розробки тест-систем на біологічні маркери пухлин, застосування у фармакології та косметології, а також можливості використання екзосом як агентів доставляння лікарських засобів до клітин-мішеней [2–4].

Вперше про екзосоми було повідомлено у 1983 р. і з того часу активно розвивалися методи їх отримання з клітин тварин, зокрема ссавців, та рослин [5], а також досліджували їх біологічну активність. Однак про ізолювання екзосом з клітин грибів стало відомо лише нещодавно [6], що також дало поштовх до використання їх як перспективних біологічних наноструктур. На сьогодні більшість досліджень, пов'язаних з вивченням екзосом з клітин грибів, проведено з використанням патогенних дріжджів з метою створення антигенних препаратів проти інфекційних захворювань спричинених ними, тоді як лікарські та їстівні гриби залишаються майже поза увагою [7].

Трутовик лакований (*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.) – лікарський гриб родини Ганодермові, відомий у традиційній азійській медицині під різними назвами, залежно від країни: Лінгжи (Lingzhi) у Китаї, Лінг Чи (Linh chi) у В'єтнамі та Йонг Джі (Yeong Ji) на Корейському півострові, але найпоширенішою є його японська назва – Рейші. У традиційній східній медицині *G. lucidum* використовується для лікування таких захворювань, як астма, бронхіт, артрит, гіпертонія, безсоння, діабет, запалення печінки, нефрит і рак [8]. Традиційне використання лікарських грибів привернуло увагу дослідників, які провели цінні дослідження їхніх біоактивних компонентів та їх впливу на організм людини. Доклінічні та клінічні дослідження виявили антипроліферативну, проапоптозну та антиміграційну дію на ракові клітини, а також антиангіогенну та імуномодельную активність [9, 10]. Ці дані створюють великий інтерес до вивчення біологічно активних речовин, що містяться у екзосомах цього гриба.

© ПАЛЛАДІН М., ЄМЕЦЬ А.

Тому, метою нашого дослідження було зробити підходи щодо ефективного ізолювання екзосом із міцелію лікарського гриба *G. lucidum*, вирощеного в умовах *in vitro*, для подальшого вивчення їх біологічної активності.

Матеріали і методи

Як об'єкт для ізолювання екзосом використовували міцелій гриба *G. lucidum* 1900 з Національної колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України. Культуру міцелію гриба вирощували асептично в чашках Петрі діаметром 90 мм, що містили агаризоване глюкозо-пептонно-дріжджове середовище (ГПД) (рН 6,0), до складу якого входило 20,0 г глюкози, 3,0 г дріжджового екстракту, 2,0 г пептону, 2,0 г дріжджового екстракту, 1,0 г KH_2PO_4 , 0,25 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та 20,0 г агару. Середовище стерилізували за допомогою автоклавування протягом 20 хв при 121°C та тиску у 1 атм. Після вирощування міцелію у термостаті протягом 7 днів за температури $26 \pm 2^\circ\text{C}$, з чашок Петрі вирізали диски міцелію діаметром 8 мм, переносили по три диски до конічних колб, що містили 50 мл рідкого стерильного середовища ГПД, та культивували у термостаті протягом 14 днів за температури $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Потім стерильний міцелій заморожували за температури -20°C для подальшого зберігання та використання. Далі вирощений міцелій рівномірно розподіляли по 16 г для випробування різних методів ізолювання екзосом та підбору найбільш ефективного підходу отримання цих нановезикул з *G. lucidum*.

Подрібнення і гомогенізацію вихідного матеріалу здійснювали трьома шляхами: за допомогою блендера, за використання кварцового піску та за використання рідкого азоту, з метою виявлення найбільш оптимального способу. Для подрібнення за допомогою блендера до 16 г міцелію гриба додавали 15 мл охолодженого до температури $+4^\circ\text{C}$ PBS-буфер (рН 7,4), після чого подрібнювали міцелій на максимальній потужності блендеру (15000 об/хв, 300 Вт) протягом 15 с з 3 імпульсами протягом 5 с. Отриманий зразок переносили у пробірку і додавали охолоджений PBS-буфер до фінального об'єму суміші 50 мл (зразок №1).

При подрібненні за допомогою кварцового піску до 16 г міцелію додавали 40 г кварцового піску та 15 мл охолодженого PBS-буфера (рН 7,4) та розтирали у ступці. Отриманий зразок переносили у пробірку і додавали охолоджений PBS-бу-

фер до фінального об'єму суміші 50 мл (зразок №2).

Для подрібнення за допомогою рідкого азоту, його поступово додавали до 16 г міцелію і розтирали у ступці. Щоб запобігти замороженню PBS-буфера, ступку та отриманий порошок залишали нагріватись до кімнатної температури. Після нагрівання ступки та отриманого порошку з міцелію гриба до кімнатної температури, в ступку додавали 15 мл охолодженого ($+4^\circ\text{C}$) PBS-буферу та переміщували. Отриманий зразок, аналогічно до зразків 1 і 2, переносили у пробірку і додавали охолоджений PBS-буфер до фінального об'єму суміші 50 мл (зразок №3).

Отримані зразки далі центрифугували на центрифугу Eppendorf 5810, охолодженій до температури $+4^\circ\text{C}$ за наступними циклами: 500g x 15 хв та 2000g x 20 хв. Після чого отриманий осад двічі відмивали за допомогою 30 мл PBS-буфера. Перше відмивання проводили при 2500g x 20 хв, а друге – при 3000g x 20 хв. Зразок №2 було додатково відмито ще один раз при 3000g x 20 хв.

Далі відмиті зразки центрифугували на ультрацентрифугу Beckman Coulter Optima L-90K, яка була охолоджена до температури $+4^\circ\text{C}$ за наступними циклами: 10,000g x 30 хв та 100,000g x 2 год. Отримані зразки осади з екзосомами промивали та ресуспендували у PBS-буфері з використанням вортексу та розділяли навпіл для подальшого аналізу методами лазерної кореляційної спектроскопії (ЛКС) та трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ).

Для методу трансмісійної електронної мікроскопії, зразки наносили на формварову, карбонізовану сітку розміром 200 mesh та негативно констрували 1 %-ним розчином уранілу ацетату. Для аналізу екзосом використовували електронний мікроскоп Hitachi H-600 при збільшенні 80 тисяч та прискорювальній напругі 76 КВТ.

За допомогою методу лазерної кореляційної спектроскопії визначали гідродинамічний радіус (розмір) отриманих екзосом та їх розподіл за розміром. Даний аналіз проводили на лазерному кореляційному спектрометрі Malvern Instruments ZetaSizer-3 з встановленим модулем кореляції Multi-8 computing correlator type 7032CE та гелій-неоновим лазером ЛГ-111 потужністю 25 мВт та довжиною хвилі 633 нм. Лазерне випромінювання реєстрували протягом 1 хв під кутом розсіювання 90° . Автокореляційну функцію обробляли за допомогою стандартної комп'ютерної програми PCS-Size mode v 1.61.

Результати та обговорення

У результаті проведеного дослідження нами протестовано різні методи ізолювання екзосом та підібрано ефективний спосіб подрібнення, гомогенізації та очистки екзосом із міцелію *G. lucidum*, культивованого в умовах *in vitro*. Оскільки первинний процес підготовки вихідного біоматеріалу передбачає його подрібнення і гомогенізацію, вибір способу підготовки зразків впливає на подальше ізолювання екзосом, зокрема на їх якісні і кількісні характеристики. Раніше було показано, що найоптимальнішим способом є подрібнення за допомогою блендера, зокрема в роботі [11] цей підхід використовували для подрібнення плодового тіла гриба шиїтаке. Слід зазначити, що даний метод є найшвидшим та найпростішим, а, отже, виявився найоптимальнішим у нашому дослідженні. Суттєвими перевагами цього методу також є отримання одразу рідких зразків, а також легкість ресуспендування осаду з екзосомами, отриманого після процедури ультрацентрифугування. У той час, як методи подрібнення у ступці за допомогою піску або рідкого азоту мають суттєві недоліки, зокрема, збільшенні часу для подрібнення вихідного матеріалу (міцелію), необхідності нагрівання отриманого зразку для гомогенізації за використання азоту та додаткового циклу відмивання для подрібнення з кварцовим піском. Додатково, суттєвими недоліками цих методів є отримання твердих, порошкоподібних зразків, а також важкість у їх врівноваженні при подальшому ультрацентрифугуванні.

Отже, у результаті проведення серії експериментів нами вперше було ізолювано та охарактеризовано екзосоми з міцелію гриба *G. lucidum*,

оскільки на сьогодні відомо, що їх ізолювали з плодових тіл гриба або з колонії дріжджів [11–14]. За допомогою методу трансмісійної електронної мікроскопії підтверджено наявність у зразках нанорозмірних везикул. Проведений аналіз за допомогою лазерної кореляційної спектроскопії та отримані первинні дані дозволили встановити розмір та розподіл за розміром отриманих нановезикул.

Результати проведеного аналізу наведено у таблиці.

З отриманих даних видно, що середній розмір ізолюваних нановезикул знаходиться у межах 45,6–50,2 нм для малих (Пік № 1) та 459,9–694,9 нм для великих (Пік №2) нановезикул, а дані розподілу за кількістю показав, що у всіх трьох зразках переважають нановезикули розмірам 29,6–33,6 нм, оскільки отримано всього один пік, що означає, що кількість великих нановезикул складає менше ніж 0,1 %.

Отримані нами результати корелюють з даними літературних джерел, згідно з якими розмір нановезикул отриманих з грибів лежить у межах від 30 до 600 нм [7], хоча і виходить за ці межі у двох зразках, що може бути пов'язаним з тим, що ці зразки потребують додаткової очистки або це може бути пов'язано з особливостями виду та/чи вихідного матеріалу (міцелій), використаного в нашому дослідженні. Площі піку вказують на кількість наявних нановезикул у зразках, з чого можна зробити висновок, що здебільшого, у отриманих після кожного способу подрібнення зразках переважають саме екзосоми малого розміру (їх середній розмір 47,2 нм).

Таблиця. Результати аналізу зразків ізолюваних екзосом з міцелію трутовика лакованого за допомогою лазерної кореляційної спектроскопії.

Зразок	Метод	Розподіл по об'єму				Розподіл за кількістю			
		№ піку	Площа піку, %	Середнє, нм	Ширина піку, нм	№ піку	Площа піку, %	Середнє значення, нм	Ширина піку, нм
Зразок № 1	Блендер	1	84,8	45,6	42,7	1	100	29,6	25,8
		2	15,2	452,9	455,6				
Зразок № 2	Азот	1	84,3	46,7	41,2	1	100	30	26,8
		2	15,7	632,7	788,6				
Зразок № 3	Пісок	1	81,1	50,2	49,9	1	100	33,6	33,0
		2	18,9	694,9	1204,6				

Висновки

Протестовано різні методи ізолювання екзосом та підібрано ефективний спосіб подрібнення, гомогенізації та очистки екзосом із міцелію *G. lucidum*, культивованого в умовах *in vitro*. Визначено найоптимальніший метод, що дало змогу вперше ізолювати нановезикули з міцелію грибів, зокрема *G. lucidum*, провести їх первинну

ідентифікацію та аналіз. Розроблений підхід для ізолювання екзосом з міцелію гриба *G. lucidum* є важливим етапом для подальшого дослідження біологічної активності цих нановезикул та можливості їх практичного застосування.

Роботу виконано частково за фінансової підтримки НАН України (бюджетна програма КПКВК 6541030, 2024–2028 рр., державний реєстраційний номер: 0124U002424).

References

- Rodrigues M. L., Nimrichter L. From fundamental biology to the search for innovation: The story of fungal extracellular vesicles, *Eur. J. Cell Biol.* 2022. Vol. 101 (2). 151205. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2022.151205>.
- Kalluri R., LeBleu V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020. Vol. 367 (6478). eaau6977. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>.
- Wang C., Li Z., Liu Y., Yuan L. Exosomes in atherosclerosis: performers, bystanders, biomarkers, and therapeutic targets. *Theranostics J.* 2021. Vol. 11 (8). P. 3996–4010. <https://doi.org/10.7150/thno.56035>.
- Yu D., Li Y., Wang M., Gu J., Xu W., Cai H., Fang X., Zhang X. Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy. *Mol. Cancer J.* 2022. Vol. 21 (1). 56. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01509-9>.
- Harding C. V., Heuser J. E., Stahl P. D. Exosomes: looking back three decades and into the future. *J. Cell Biol.* 2013. Vol. 200 (4). P. 367–371. <https://doi.org/10.1083/jcb.201212113>.
- Rodrigues M. L., Nimrichter L. From fundamental biology to the search for innovation: The story of fungal extracellular vesicles. *Eur. J. Cell Biol.* 2022. Vol. 101 (2). 151205. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2022.151205>.
- Liebana-Jordan M., Brotons B., Falcon-Perez J. M., Gonzalez E. Extracellular vesicles in the Fungi Kingdom. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22 (13). 7221. <https://doi.org/10.3390/ijms22137221>.
- Lee K. H., Morris-Natschke S. L., Yang X., Huang R., Zhou T., Wu S. F., Shi Q., Itokawa H. Recent progress of research on medicinal mushrooms, foods, and other herbal products used in traditional Chinese medicine. *J. Tradit. Complement Med.* 2012. Vol. 2 (2). P. 84–95.
- Sohretoglu D., Huang S. *Ganoderma lucidum* polysaccharides as an anti-cancer agent. *Med. Chem.* 2018. Vol. 18 (5). P. 667–674. <https://doi.org/10.2174/1871520617666171113121246>.
- Cancemi G., Caserta S., Gangemi S., Pioggia G., Allegra A. Exploring the therapeutic potential of *Ganoderma lucidum* in cancer. *J. Clin Med.* 2024. Vol. 13 (4). 1153. <https://doi.org/10.3390/jcm13041153>.
- Liu B., Lu Y., Chen X., Muthuraj P. G., Li X., Pattabiraman M., Zempleni J., Kachman S. D., Natarajan S. K., Yu J. Protective role of shiitake mushroom-derived exosome-like nanoparticles in D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced acute liver injury in mice. *Nutrients*. 2020. Vol. 12 (2). 477. <https://doi.org/10.3390/nu12020477>.
- Ikeda M. A. K., Campos R. M. S., Da Silva J. L., Ferreira K. S. Fungal extracellular vesicles: isolation, characterization, and the immune system response. *Microbiol. Res.* 2024. Vol. 15 (4). P. 2146–2161. <https://doi.org/10.3390/microbiolres15040144>.
- Piffer A. C., Reis F. C. G., Moyrand F., Montalvão B., Rodrigues M. L., Janbon G., Rizzo J. Protocol for separation of fungal extracellular vesicles using ultracentrifugation from solid medium cultures, *STAR Protocols*. 2024. Vol 5 (2). 103069. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2024.103069>.
- Yang X., Zong Z., Niu B., Chen H., Wu W., Fang X., Liu R., Gao H., Mu H. Shiitake mushroom-derived extracellular nanovesicles: Preparation, characterization, and inhibition of Caco-2 cells, *Food Chemistry*. 2025. Vol. 463 (3). 141339. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.141339>.

PALLADIN M., YEMETS A.

Institute of Food Biotechnology and Genomics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Baidy-Vyshnevetskoho str., 2a

FEATURES OF EXOSOM ISOLATION FROM TIN LACQUERED MYCELIUM (*GANODERMA LUCIDUM* (CURTIS) P. KARST.)

Aim. To apply the proposed methods for obtaining exosomes and select conditions for effective isolation of these nanovesicles from the mycelium of the fungus *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. To obtain exosomes from the cells of the mycelium of *G. lucidum* and to conduct their morphometric analysis. **Methods.** Microbiological, microscopic, sedimentation, and spectrophotometric research methods were used to obtain and analyze isolated exosomes from the mycelium of the *G. lucidum* fungus. **Results.** Various methods for isolating exosomes were tested and an effective method for grinding, homogenizing, and purifying exosomes from *G. lucidum* mycelium cultivated *in vitro* was selected. The isolation and primary identification of exosomes from *G. lucidum* mycelium was performed for the first time. **Conclusions.** The developed approach for isolating exosomes from the mycelium of the fungus *G. lucidum* grown under stationary aseptic conditions *in vitro* is an important step for further investigation the biological activity of these nanovesicles and the possibility of their practical application.

Keywords: *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., mycelium, exosomes, nanovesicles.