

UNIwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii
Dyscyplina naukowa: Technologia Żywności i Żywienia

Klaudia Małgorzata Słyszcz

Rozprawa doktorska

**Naturalne produkty pochodzenia roślinnego i grzybowego jako źródło związków
bioaktywnych o potencjale chemoprewencyjnym wobec raka jelita grubego**

***Natural products of plant and fungal origin as a source of bioactive compounds with
chemopreventive potential against colorectal cancer***

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Biotechnologii,
Mikrobiologii i Żywienia Człowieka

Promotor: prof. dr hab. Adam Waśko

Lublin, 2026

*Składam serdeczne podziękowania
Panu Profesorowi dr hab. Adamowi Waśko
za opiekę naukową, poświęcony czas oraz niezliczoną ilość cennych rad.
Dziękuję za zaufanie, wyrozumiałość oraz wsparcie.*

*Dziękuję również
wszystkim **Współautorom** oraz **Osobom**, z którymi miałam przyjemność współpracować, za
inspirujące dyskusje, pomoc i życzliwość na każdym etapie prowadzonych badań*

oraz

***Pracownikom i Doktorantom**
Katedry Biotechnologii,
Mikrobiologii i Żywienia Człowieka
za okazaną pomoc i przyjazną atmosferę sprzyjającą pracy naukowej.*

*Pragnę serdecznie podziękować mojej **Rodzinie i Bliskim** za nieustające wsparcie oraz
wiarę we mnie przez cały okres realizacji badań i przygotowywania niniejszej rozprawy.
To dzięki Wam mogłam pokonywać kolejne wyzwania i z wytrwałością dążyć do
wyznaczonego celu.*

*Szczególne podziękowania kieruję do mojego **Synka**. Tobie dedykuję tę pracę – za
uśmiech, który dodawał mi sił, i za to, że każdego dnia byłeś moją największą motywacją.*

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem

i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 8.09.2026 r. Podpis promotora [podpis]

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/Promotorów/Promotera-pomoeniezego* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD/pendrive wersją elektroniczną.

Data 8.09.2026 r. Podpis autora Klaudia Styszyk

* niepotrzebne skreślić

WYKAZ PRAC NAUKOWYCH WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU

1. Kowalik, K.; Polak-Berecka, M.; Predecka-Wróbel, M.; Pigoń-Zajac, D.; Niedźwiedź, I.; Sz wajgier, D.; Baranowska-Wójcik, E.; Waśko, A. Biological Activity of an *Epilobium angustifolium* L. (Fireweed) Infusion after *In Vitro* Digestion. *Molecules* **2022**, *27*, 1006. <https://doi.org/10.3390/molecules27031006>

Liczba punktów MEiN: 140, IF: 4,6

Publikacja została opublikowana pod panińskim nazwiskiem autorki, obowiązującym przed zawarciem związku małżeńskiego.

Autorka rozprawy doktorskiej odpowiadała za opracowanie koncepcji badań i metodologii; przeprowadzenie części doświadczalnej; opracowanie i analizę otrzymanych wyników; analizę statystyczną wyników; zebranie literatury naukowej; przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, współredagowanie jego treści oraz przygotowanie finalnej wersji pracy; współpracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

2. Słysz yk, K.; Siwulski, M.; Wiater, A.; Tomczyk, M.; Waśko, A. Biofortification of Mushrooms: A Promising Approach. *Molecules* **2024**, *29*, 4740. <https://doi.org/10.3390/molecules29194740>

Liczba punktów MEiN: 140, IF: 4,6

Autorka rozprawy doktorskiej odpowiadała za współtworzenie koncepcji publikacji przeglądowej; zebranie literatury naukowej; analizę i interpretację danych z piśmiennictwa; przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, współredagowanie jego treści oraz przygotowanie finalnej wersji pracy; współpracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

3. Słysz yk, K.; Siwulski, M.; Frąszczak, B.; Wiater, A.; Waśko, A. Comparative Iron Biofortification in *Her icium erinaceus*: A Study of Different Ionic Forms and Their Uptake Efficiency. *Food Chem.* **2026**, *498*, 147238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.147238>

Liczba punktów MEiN: 200, IF: 10,4

Autorka rozprawy doktorskiej odpowiadała za opracowanie koncepcji badań i metodologii, przeprowadzenie części doświadczalnej, opracowanie i analizę otrzymanych wyników; zebranie literatury naukowej; przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, współredagowanie jego treści oraz przygotowanie finalnej wersji pracy; pełnienie roli autora korespondencyjnego; współpracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

4. Słyszczak, K.; Rachwał, K.; Baranowska-Wójcik, E.; Szwał, D.; Sadurski, J.; Waśko, A. Impact of Iron Speciation on the Cytotoxicity and Gene Expression Profile of Biofortified *Hericium erinaceus* in Human Colorectal Adenocarcinoma. *Molecules* **2026**, *31*, 2295. <https://doi.org/10.3390/molecules31132295>

Liczba punktów MEiN: 140, IF: 5,1

Autorka rozprawy doktorskiej odpowiadała za opracowanie koncepcji badań i metodologii; przeprowadzenie części doświadczalnej; opracowanie i analizę otrzymanych wyników; analizę statystyczną wyników; zebranie literatury naukowej; przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, współredagowanie jego treści oraz przygotowanie finalnej wersji pracy; współpracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Sumaryczna liczba punktów MEiN zgodnie z rokiem wydania publikacji: 620 pkt MEiN,
sumaryczny Impact Factor: 24,7

Spis treści

1. Streszczenie	9
2. Summary	10
3. Wprowadzenie teoretyczne	11
3.1 Rak jelita grubego jako współczesny problem zdrowotny	11
3.2 Żywność funkcjonalna jako narzędzie chemoprewencji raka jelita grubego...	16
3.2.1 Wierzbówka kiprzyca jako źródło związków bioaktywnych.....	22
3.2.2 Soplówka jeżowata jako źródło związków o charakterze prozdrowotnym ..	24
3.3 Biofortyfikacja jako innowacyjna strategia wzbogacania żywności funkcjonalnej	26
4. Hipotezy i cele badawcze	30
5. Materiały i metody	32
5.1 Wierzbówka kiprzyca.....	35
5.1.1 Materiał roślinny	35
5.1.2 Sztuczne trawienie <i>in vitro</i>	35
5.1.3 Analiza jakościowa i ilościowa próbek metodą HPLC-ESI-QTOF-MS/MS	36
5.1.4 Hodowle komórkowe	37
5.1.5 Metoda MTT	37
5.1.6 Metoda wychwytu czerwieni obojętnej (test NR).....	38
5.1.7 Barwienie metodą May-Grünwald-Giemsa	38
5.1.8 Metoda ECIS (Electric Cell-Substrate Impedance Sensing).....	39
5.2 Soplówka jeżowata.....	39
5.2.1 Biofortyfikacja	40
5.2.2 Nietargetowane profilowanie metabolomiczne metodą chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS)	41
5.2.3 Oznaczanie zawartości pierwiastków metodą ICP-OES.....	41
5.2.4 Pomiary spektroskopowe metodą FTIR.....	42

5.2.5 Obrazowanie próbek za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM).....	42
5.2.6 Sztuczne trawienie <i>in vitro</i>	43
5.2.7 Metoda DPPH	43
5.2.8 Hodowle komórkowe	44
5.2.9 Metoda MTT	44
5.2.10 Barwienie metodą May-Grünwald-Giemsa	44
5.2.11 Ekspresja genów związanych z rakiem jelita grubego.....	45
5.3 Analizy statystyczne.....	47
6. Omówienie wyników i dyskusja.....	49
6.1 Wierzbówka kiprzyca.....	49
6.1.1 Profil związków bioaktywnych w ekstrakcie.....	49
6.1.2 Badanie wpływu na żywotność i proliferację komórek	51
6.1.2.1 Metoda MTT	51
6.1.2.2 Metoda wychwytu czerwieni obojętnej (test NR).....	53
6.1.3 Ocena zmian morfologicznych komórek	55
6.1.4 Metoda ECIS (Electric Cell-Substrate Impedance Sensing).....	57
6.2 Soplówka jeżowata.....	59
6.2.1 Morfologia i biomasa owocników	59
6.2.2 Metabolom	61
6.2.3 Zawartość wybranych pierwiastków	63
6.2.4 Charakterystyka chemiczna próbek metodą FTIR.....	65
6.2.5 Mapowanie rozkładu pierwiastków metodą EDS	67
6.2.6 Badanie wpływu na żywotność komórek metodą MTT	67
6.2.7 Ocena aktywności przeciwutleniającej metodą DPPH	70
6.2.8 Ocena zmian morfologicznych komórek	74
6.2.9 Ekspresja genów związanych z rakiem jelita grubego.....	77

7. Wnioski	82
8. Bibliografia	84
9. Załączniki.....	97

1. Streszczenie

Rak jelita grubego należy do najczęściej diagnozowanych nowotworów złośliwych na świecie. Pomimo postępów w rozwoju terapii raka jelita grubego skuteczność leczenia zaawansowanych postaci choroby nadal pozostaje ograniczona. Wyzwaniem stanowią także działania niepożądane chemioterapii oraz rozwój chemiooporności, która może zmniejszać efektywność terapii. Rozwój raka jelita grubego jest procesem wieloczynnikowym, zależnym zarówno od predyspozycji genetycznych, jak i czynników środowiskowych. Możliwość modyfikacji części z nich sprawia, że coraz większe zainteresowanie budzi chemoprewencja wykorzystująca naturalne związki bioaktywne obecne w produktach roślinnych i grzybowych. Szczególną uwagę zwraca się na żywność funkcjonalną, której składniki mogą mieć wpływ na proces karcynogenezy. W związku z tym przedmiotem niniejszej pracy była ocena potencjału chemoprewencyjnego naturalnych produktów pochodzenia roślinnego i grzybowego po trawieniu *in vitro* wobec komórkowych modeli raka jelita grubego oraz określenie wpływu biofortyfikacji na właściwości biologiczne grzybów. Badania obejmowały ekstrakt z wierzbówki kiprzycy (*Epilobium angustifolium* L.) oraz ekstrakty z biofortyfikowanej soplówki jeżowatej (*Hericium erinaceus* (Bull.) Pers.). Uzyskane wyniki wykazały, że ekstrakt z *E. angustifolium* zachowuje aktywność biologiczną po procesie trawienia *in vitro* oraz charakteryzuje się zdolnością do ograniczania proliferacji komórek raka jelita grubego. Wykazano również, że proces biofortyfikacji istotnie wpływa na skład metabolomiczny owocników *H. erinaceus*, a zastosowana forma chemiczna żelaza determinuje ich właściwości biologiczne. Spośród analizowanych wariantów najwyższą aktywnością przeciwnowotworową cechowały się ekstrakty z soplówki jeżowatej biofortyfikowanej FeHBED.

Przeprowadzone badania potwierdziły postawioną hipotezę badawczą, wskazując, że naturalne produkty pochodzenia roślinnego i grzybowego stanowią cenne źródło związków bioaktywnych o potencjale chemoprewencyjnym wobec raka jelita grubego. Uzyskane dane wskazują, że wybrane ekstrakty roślinne i grzybowe mogą stanowić źródło związków o obiecującej aktywności biologicznej w komórkowych modelach raka jelita grubego, jednak potwierdzenie ich potencjalnego znaczenia chemoprewencyjnego wymaga dalszych badań.

Słowa kluczowe: wierzbówka kiprzyca, soplówka jeżowata, rak jelita grubego, biofortyfikacja, żywność funkcjonalna

2. Summary

Colorectal cancer is one of the most frequently diagnosed malignancies worldwide. Despite significant advances in the treatment of colorectal cancer, the effectiveness of therapy for advanced stages of the disease remains limited. Furthermore, adverse effects associated with chemotherapy and the development of chemoresistance continue to reduce therapeutic efficacy. Colorectal carcinogenesis is a multifactorial process influenced by both genetic predisposition and environmental factors. Since some of these factors can be modified, increasing attention has been focused on chemoprevention based on natural bioactive compounds present in natural products of plant and mushroom origin. Particular interest has been directed toward functional foods, whose constituents may influence the process of carcinogenesis. Therefore, the aim of this dissertation was to evaluate the chemopreventive potential of natural products derived from plants and mushrooms after *in vitro* digestion using cellular models of colorectal cancer and to determine the effect of biofortification on the biological properties of mushrooms. The study included an extract of fireweed (*Epilobium angustifolium* L.) and extracts of biofortified lion's mane mushroom (*Hericium erinaceus* (Bull.) Pers.). The obtained results demonstrated that the *E. angustifolium* extract retained its biological activity after *in vitro* digestion and exhibited the ability to inhibit the proliferation of colorectal cancer cells. It was also demonstrated that the biofortification process significantly affected the metabolomic profile of *H. erinaceus* fruiting bodies and that the chemical form of iron determined their biological properties. Among the tested variants, extracts from *H. erinaceus* biofortified with FeHBED exhibited the highest anticancer activity.

The conducted studies confirmed the proposed research hypothesis, indicating that natural plant- and mushroom-derived products constitute a valuable source of bioactive compounds with chemopreventive potential against colorectal cancer. The obtained findings suggest that the selected plant and mushroom extracts may serve as a source of compounds with promising biological activity in cellular models of colorectal cancer; however, further studies are required to confirm their chemopreventive potential.

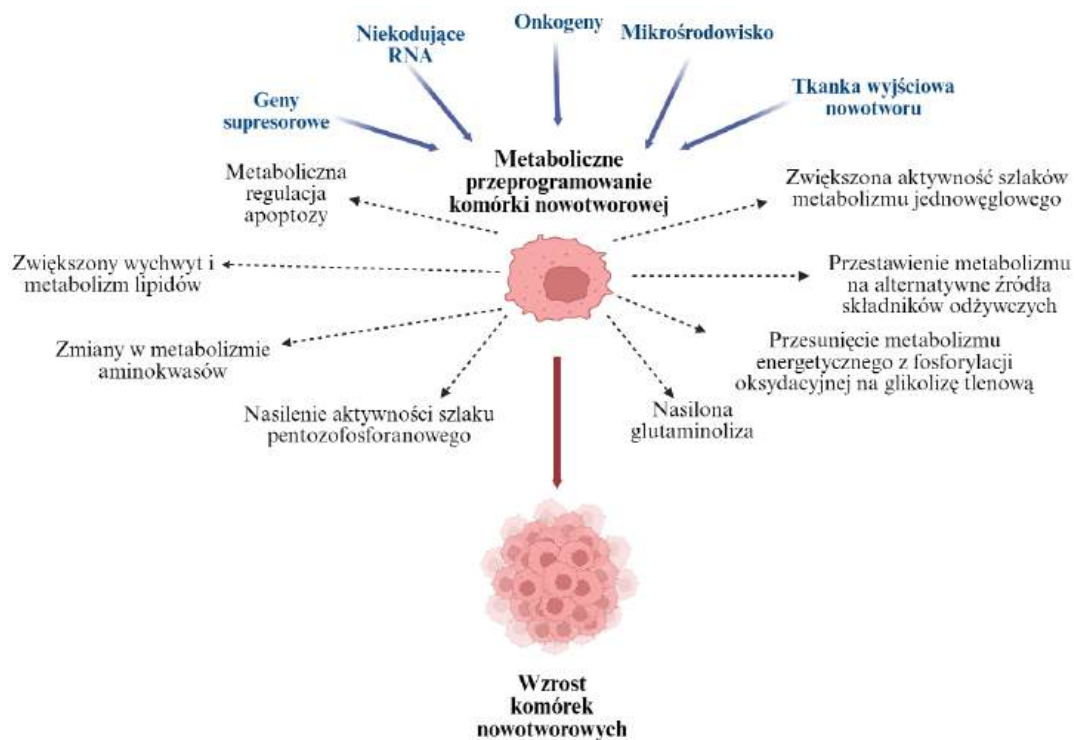
Keywords: *Epilobium angustifolium*, *Hericium erinaceus*, colon cancer, biofortification, functional foods

3. Wprowadzenie teoretyczne

3.1 Rak jelita grubego jako współczesny problem zdrowotny

Według najnowszych danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) odnotowano znaczny wzrost liczby nowotworów złośliwych. Stanowią one obecnie drugą najczęstszą przyczynę zgonów na świecie i są jednym z największych wyzwań zdrowotnych XXI wieku. Większość definicji raka zasadniczo zgadza się z obecną definicją amerykańskiego Narodowego Instytutu Raka (NCI) z 2023 roku, która mówi że rak to choroba, w której niektóre komórki organizmu rosną w sposób niekontrolowany i rozprzestrzeniają się na inne części ciała. WHO definiuje to pojęcie nieco szerzej określając raka jako ogólne określenie obejmujące grupę chorób, które mogą dotknąć dowolną część ciała. Jedną z charakterystycznych cech raka jest gwałtowne powstawanie nieprawidłowych komórek, które rozrastają się poza swoje naturalne granice, a następnie mogą atakować sąsiednie części ciała i rozprzestrzeniać się na inne narządy. Przerzuty są główną przyczyną zgonów[1].

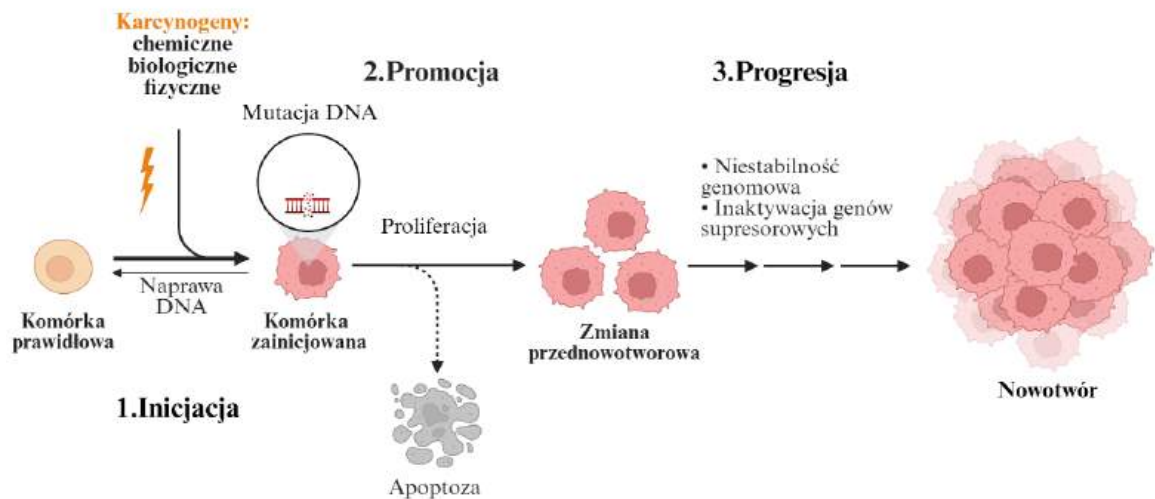
Komórki nowotworowe cechują się nieograniczoną zdolnością do replikacji, brakiem wrażliwości na sygnały anty-wzrostowe, unikaniem apoptozy, ciągłą angiogenezą, inwazją tkanek i przerzutami, utrzymywaniem sygnalizacji proliferacyjnej, ucieczką spod nadzoru immunologicznego[2]. By móc uzyskać energię i materiały niezbędne do nabycia tych cech, komórki te muszą przejść przeprogramowanie szlaków metabolicznych[3].



Rycina. 1. Główne aspekty metabolicznego przeprogramowania komórek nowotworowych.

Najlepszym przykładem zmienności metabolicznej są różne etapy przerzutów. W trakcie procesu przerzutowania komórki nowotworowe migrują do odległych narządów i kolonizują nowe środowisko tkankowe. Na każdym z tych etapów są narażone na zmienne warunki mikrośrodowiska, generujące odmienne wyzwania metaboliczne[4].

Karcynogeneza to wieloetapowy proces prowadzący do transformacji komórek prawidłowych w komórki nowotworowe poprzez powstanie różnych zmian genetycznych i epigenetycznych[5].



Rycina 2. Etapy karcynogenezy

Rak jelita grubego (RJG) jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów złośliwych i stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego w skali globalnej. RJG występuje w jelicie grubym lub odbytnicy. Rozwija się na skutek niekontrolowanej proliferacji komórek nabłonka gruczołowego jelita grubego. Ze względu na etiopatogenezę wyróżnia się trzy główne typy: sporadyczny, dziedziczny oraz związany z przewlekłym stanem zapalnym jelita grubego[6].

W rozwoju raka jelita grubego kluczową rolę odgrywają trzy główne mechanizmy molekularne: fenotyp metylatora wysp CpG (CIMP), niestabilność chromosomalna (CIN) oraz niestabilność mikrosatelitarna (MSI). CIMP jest to mechanizm epigenetyczny prowadzący do wyciszenia ekspresji genów poprzez nadmierną metylację wysp CpG w regionach promotorowych genów. CIN wiąże się z zaburzeniami struktury i liczby chromosomów powstających podczas podziałów komórkowych. Natomiast MSI jest konsekwencją zaburzeń w systemie naprawy błędnie sparowanych zasad DNA. Mechanizmy te często ze sobą współwystępują. Silną zależność obserwuje się pomiędzy MSI i CIMP, gdyż hipermetylacja może przyczyniać się do wyciszenia genów naprawy DNA co w konsekwencji może doprowadzić do niestabilności mikrosatelitarnej[7]. Istotnym czynnikiem napędzającym progresję RJG jest deregulacja szlaku sygnałowego Ras/Raf/MEK/MAPK/ERK. Szlak ten stanowi jeden z głównych mechanizmów kontrolujących proliferację komórkową i cykl komórkowy. Mutacje somatyczne w genie RAS inicjują efekt domina, rozpoczynając się od aktywacji RAS, która następnie aktywuje RAF, a następnie fosforylację MEK, co kończy się aktywacją MAPK/ERK[8].

Według danych GLOBOCAN w 2024 r. na całym świecie odnotowano około 20,6 mln nowych przypadków i 9,8 mln zgonów z powodu nowotworów, z czego rak jelita grubego przyczynił się do ponad 2 mln zachorowań i 0,92 mln zgonów. Zachorowalność i umieralność różni się pomiędzy regionami świata, co jest związane ze statusem społeczno-ekonomicznym kraju. W 2024 r. RJG był trzecim najczęściej rozpoznawanym nowotworem złośliwym oraz drugą najczęstszą przyczyną zgonów z powodu nowotworów na świecie. Nowotwór ten częściej występuje wśród mężczyzn niż kobiet i jest ponad cztery razy częstszy w krajach o wysokich dochodach niż w krajach o niskich dochodach. Prognozuje się, że starzenie się społeczeństwa będzie napędzać dalszy wzrost globalnego obciążenia nowotworami, a roczna liczba nowych przypadków ma osiągnąć około 34,4 miliona do 2050 roku, co stanowi wzrost o 67%[9].

Stopień zaawansowania raka jelita grubego określany jest za pomocą klasyfikacji TNM, która wyróżnia cztery stadia. Litera T pochodzi od słowa tumor i określa wielkość guza. Litera N pochodzi od słowa nodus i ocenia stan węzłów chłonnych. Litera M pochodzi od słowa metastases i określa brak lub obecność przerzutów[10]. Wczesne wykrycie raka jelita grubego istotnie poprawia rokowanie. Pięcioletnie przeżycie względne u chorych ze stadium I wynosi około 95%, natomiast w stadium II około 85%. W stadium III odsetek 5-letnich przeżyć spada do około 68%, a w stadium IV, charakteryzującym się obecnością przerzutów odległych, wynosi około 12% [11].

Czynniki ryzyka RJG można podzielić na dwie grupy. Są to czynniki niemodyfikowalne, takie jak płeć, wiek czy też wywiad rodzinny, na które nie mamy wpływu oraz czynniki modyfikowalne związane z indywidualnymi nawykami i stylem życia. Zmieniając te czynniki jesteśmy w stanie wpłynąć na zmniejszenie ryzyka wystąpienia raka jelita grubego. Większość nowotworów złośliwych jelita grubego występuje po 50. roku życia. Ryzyko zachorowania na raka jelita grubego dotyczy obu płci, jednak większą zapadalność obserwuje się wśród mężczyzn. Wśród ras to populacja afroamerykańska ma najwyższe wskaźniki zapadalności i śmiertelności[12]. Badania epidemiologiczne wykazały, że otyłość, brak aktywności fizycznej, nadmierne spożycie alkoholu, palenie tytoniu, dieta uboga w błonnik i bogata w tłuszcze, spożywanie czerwonego oraz przetworzonego mięsa, cukrzyca i insulinooporność[13], osobista lub rodzinna historia RJG, długotrwała zapalna choroba jelit (IBD), rodzinna polipowatość gruczolakowata (FAP), dziedziczny rak jelita grubego bez polipowatości (HNPCC), zespół Lynch oraz zespół polipowatości młodzieńczej oraz zespoły polipowatości niedziedzicznej zwiększają ryzyko zachorowania na raka jelita grubego[14].

Kolejnym niedawno odkrytym czynnikiem mogącym uczestniczyć na każdym etapie karcynogenezy jest nasz mikrobiom jelita grubego. Badania konsekwentnie wskazują na kilka drobnoustrojów, które wpływają na karcynogenezę: enzym *E. coli* produkujący kolibaktynę inicjuje karcynogenezę poprzez wywoływanie uszkodzeń DNA[15], enterotoksyczne szczepy *Bacteroides fragilis* sprzyjają powstawaniu raka bezpośrednio, poprzez działanie toksyny BFT oraz pośrednio, poprzez indukcję odpowiedzi zapalnej zależnej od interleukiny 17[16]. *Fusobacterium nucleatum* przyczynia się do progresji nowotworu poprzez działanie swoich adhezyn Fap2 oraz FadA. Białka te nasilają proliferację komórek nowotworowych, wspomagają unikanie odpowiedzi przeciwnowotworowej gospodarza oraz zwiększają ich zdolność do inwazji[17].

Dobór metody leczenia RJG zależy przede wszystkim od stopnia zaawansowania choroby. Chirurgia, w połączeniu z chemioterapią i radioterapią, jest obecnie podstawą leczenia raka jelita grubego[18]. Poważnym ograniczeniem skuteczności terapii raka jelita grubego jest rozwój oporności na chemioterapię. Mimo że nowe schematy leczenia przyczyniły się do wydłużenia przeżycia pacjentów, z czasem u większości rozwija się lekooporność, co mocno wpływa na skuteczność terapii przeciwnowotworowej i stanowi jedną z głównych przyczyn niepowodzenia leczenia[19]. Ze względu na powyższy problem powstają nowoczesne strategie leczenia raka jelita grubego, w tym terapia celowana, immunoterapia czy terapia genowa. Działanie terapii celowanej opiera się na hamowaniu określonych szlaków molekularnych zaangażowanych w rozwój nowotworu. Do najczęściej stosowanych leków należą cetuksymab, skierowany przeciwko EGFR, oraz bewacyzumab, hamujący angiogenezę[20]. Immunoterapia znajduje zastosowanie głównie u chorych z nowotworami o wysokiej niestabilności mikrosatelitarnej (MSI-H) lub deficycie systemu naprawy błędnie sparowanych zasad DNA (dMMR), Natomiast u pacjentów z nowotworami stabilnymi mikrosatelitarnie (MSS) i z zachowaną funkcją systemu naprawy błędnie sparowanych zasad DNA (pMMR) skuteczność immunoterapii jest ograniczona[21]. Obejmuje ona przeciwciała monoklonalne, inhibitory punktów kontrolnych układu odpornościowego w tym niwolumab i ipilimumab, które poprzez aktywację limfocytów T wzmacniają odpowiedź przeciwnowotworową organizmu. Terapia genowa w raku jelita grubego znajduje zastosowanie ze względu na mutacje genetyczne, ale aktualnie pozostaje na etapie intensywnych badań klinicznych. Celem terapii genowej jest modyfikacja nieprawidłowych genów oraz zahamowanie procesów sprzyjających wzrostowi guza[22]. [23].

Dlatego tak istotna jest profilaktyka pierwotna i wtórna raka jelita grubego[24]. Profilaktyka pierwotna opiera się przede wszystkim na modyfikacji środowiskowych czynników ryzyka, takich jak sposób odżywiania, aktywność fizyczna czy inne elementy stylu życia, które mogą wpływać na ryzyko rozwoju nowotworu. Z kolei powolny rozwój raka jelita grubego umożliwia skuteczne prowadzenie badań przesiewowych stanowiących podstawę profilaktyki wtórnej. Do najważniejszych metod wczesnego wykrywania zmian przednowotworowych i nowotworów we wczesnym stadium należą kolonoskopia, sigmoidoskopia oraz badanie kału na obecność krwi utajonej[25]. Rozwój raka jelita grubego jest procesem wieloczynnikowym, zależnym zarówno od predyspozycji genetycznych, jak i czynników środowiskowych. Możliwość modyfikacji części z nich sprawia, że coraz większe zainteresowanie budzi chemoprewencja wykorzystująca naturalne związki bioaktywne obecne w produktach roślinnych i grzybowych. Szczególną uwagę zwraca się na żywność funkcjonalną, której składniki mogą wpływać na proliferację komórek nowotworowych, stres oksydacyjny, stan zapalny oraz ekspresję genów zaangażowanych w proces karcynogenezy. W związku z tym przedmiotem niniejszej pracy była ocena potencjału chemoprewencyjnego naturalnych produktów pochodzenia roślinnego i grzybowego po trawieniu *in vitro* wobec komórkowych modeli raka jelita grubego oraz określenie wpływu biofortyfikacji na właściwości biologiczne grzybów.

3.2 Żywność funkcjonalna jako narzędzie chemoprewencji raka jelita grubego

Pomimo postępów w rozwoju terapii raka jelita grubego skuteczność leczenia zaawansowanych postaci choroby nadal pozostaje ograniczona. Wyzwanie stanowią także działania niepożądane chemioterapii oraz rozwój chemiooporności, która może zmniejszać efektywność terapii. Chociaż badania przesiewowe przyczyniły się do obniżenia zapadalności na raka jelita grubego, coraz większą uwagę poświęca się działaniom profilaktycznym. Jedną z obiecujących strategii zapobiegania rozwojowi tego nowotworu jest chemoprewencja, która wykorzystuje naturalne lub syntetyczne związki chemiczne mające na celu zapobieganie, opóźnienie lub odwrócenie procesu karcynogenezy dzięki działaniu we wczesnym stadium choroby[26]. Jej celem jest zmniejszenie ryzyka rozwoju nowotworów złośliwych poprzez hamowanie procesów odpowiedzialnych za transformację nowotworową oraz progresję choroby. Działanie to opiera się na modulacji mechanizmów molekularnych i komórkowych zaangażowanych w kolejne etapy kancerogenezy poprzez regulację zaburzonej aktywności białek. Środek chemoprewencyjny powinien być

bezpieczny, dobrze tolerowany, łatwy w podaniu, łatwo dostępny, niedrogi oraz powinien być dostosowany do osób z wysokim, umiarkowanym lub średnim ryzykiem rozwoju RJG. Są to wymagania wyjściowe, które muszą zostać spełnione zanim badania kliniczne będą mogły rozpocząć ocenę skuteczności. Chociaż znalezienie środka chemoprewencyjnego spełniającego te kryteria jest trudne, możliwość zmniejszenia zachorowalności i śmiertelności na raka jelita grubego sprawia, że chemoprewencja jest przedsięwzięciem wartym dalszych badań[27]. Na etapie inicjacji działają związki blokujące nazywane czynnikami blokującymi działającymi na różne sposoby, takie jak obniżanie poziomu reaktywnych form tlenu, indukcja szlaków naprawy genomu, obniżanie metabolicznej aktywacji prokarcynogenów w karcynogeny, modulację modyfikacji epigenetycznych. Na etapie promocji działają czynniki supresyjne, które mogą hamować szlaki sygnałowe stymulujące przeżycie i proliferację komórek[28]. W zależności od momentu interwencji w proces nowotworzenia wyróżnia się trzy rodzaje chemoprewencji: pierwotną, wtórną oraz trzeciorzędową. Chemoprewencja pierwotna ma na celu zapobieganie powstawania nowotworów u osób należących do grup podwyższonego ryzyka zachorowania. Chemoprewencja wtórna polega na hamowaniu transformacji nowotworu łagodnego w złośliwy. Natomiast chemoprewencja trzeciorzędowa ma na celu zmniejszenie ryzyka nawrotu choroby po zakończonym leczeniu[29]. W chemoprewencji raka jelita grubego wykorzystuje się zarówno środki farmakologiczne, jak i składniki diety oraz naturalne związki bioaktywne. Do najlepiej poznanych środków farmakologicznych należą aspiryna, celekoksyb i sulindak, których działanie opiera się głównie na hamowaniu cyklooksygenazy (COX) i ograniczaniu procesów zapalnych związanych z kancerogenezą, metformina, która aktywuje AMPK, zmniejsza ekspresję cykliny D1 oraz zahamuje fosforylację białka RB[30]. Składniki żywności oraz suplementy, które są istotne w profilaktyce RJG to witamina D, wapń, witamina C czy foliany. Związki te mogą wpływać na regulację odpowiedzi immunologicznej, ochronę materiału genetycznego przed uszkodzeniami, utrzymanie prawidłowej funkcji nabłonka jelitowego oraz zmniejszenie stanu zapalnego[31]. W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się na rolę związków bioaktywnych żywności mogących wpływać na różne procesy związane z nowotworzeniem, wykazując tym samym działanie chemoprewencyjne. Szczególne znaczenie przypisuje się żywności funkcjonalnej, która oprócz dostarczania podstawowych składników odżywczych, ma właściwości prozdrowotne i zapobiega chorobom poprzez działanie immunomodulacyjne, antyoksydacyjne czy przeciwzapalne[32].

Wiele roślinnych związków bioaktywnych, takich jak flawonoidy, saponiny, polifenole, alkaloidy, polisacharydy, karotenoidy obecne w owocach, warzywa i produktach roślinnych wykazuje właściwości przeciwnowotworowe, dzięki czemu mogą one być wykorzystane jako środki chemoprewencyjne[33]. Ich działanie opiera się na zdolności do modulowania licznych procesów molekularnych zaangażowanych w kancerogenezę, takich jak apoptoza, proliferacja, angiogeneza, stan zapalny, czy stres oksydacyjny. Badania wskazują, że regularne spożywanie żywności bogatej w te związki może przyczyniać się do zmniejszenia ryzyka rozwoju raka jelita grubego [34]. Poniższa tabela zawiera zestawienie wybranych związków pochodzenia roślinnego oraz ich mechanizmów działania w chemoprewencji raka jelita grubego.

Tabela 1. Związki pochodzenia roślinnego oraz mechanizmy działania w chemoprewencji raka jelita grubego[35].

Roślina	Związki bioaktywne	Mechanizm działania
<i>Pisum sativum</i>	Związki fenolowe	Hamuje proliferację komórek raka jelita grubego oraz wykazuje zależną od stężenia aktywność cytotoksyczną.
<i>Terminalia ferdinandiana</i>	Kwas elagowy	Zmniejsza stres oksydacyjny dzięki właściwościom przeciwutleniającym i wychwytywaniu wolnych rodników.
<i>Camellia sinensis</i>	Katechiny	Aktywuje szlaki PI3K/AKT, JAK/STAT i MAPK, indukuje apoptozę (kaspazy 3,7,8,9) oraz hamuje ekspresję VEGF i ERK1/2.
<i>Morus alba</i>	Flawanoidy	Indukuje zatrzymanie cyklu komórkowego oraz apoptozę komórek nowotworowych.
<i>Curcuma longa</i>	Kurkumina	Hamuje proliferację poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego (G1 i G2/M), moduluje szlak NF-κB oraz

		indukuje stres oksydacyjny i apoptozę.
<i>Annona muricata</i>	Alkaloidy	Powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1, zwiększa produkcję ROS, zaburza potencjał błony mitochondrialnej, uwalnia cytochrom c i aktywuje kaspazy.
<i>Moringa oleifera</i>	Eugenol	Indukuje apoptozę poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M; mechanizm związany jest również z generacją ROS.
<i>Salvia officinalis</i>	Kwas rozmarynowy	Hamuje proliferację poprzez zahamowanie fosforylacji ERK oraz szlaku MAPK/ERK (związanego z KRAS).
<i>Vitis vinifera</i>	Kwas oleanolowy	Hamuje proliferację oraz indukuje apoptozę komórek HCT116.
<i>Olea europaea</i>	Kwercetyna	Hamuje proliferację, zatrzymuje cykl komórkowy w fazie S oraz ogranicza migrację i inwazyjność komórek nowotworowych.

Zastosowanie związków bioaktywnych pochodzenia roślinnego wiąże się z pewnymi ograniczeniami, które mogą wpływać na ich skuteczność i wykorzystanie kliniczne. Głównym problemem jest ich biodostępność. Związki bioaktywne pochodzenia roślinnego często wykazują ograniczoną skuteczność jako pojedyncze substancje. Dlatego są stosowane w połączeniu z lekami przeciwnowotworowymi, co zwiększa ich efektywność, ale utrudnia ocenę ich samodzielnego działania. Złożona budowa chemiczna może ograniczać ich właściwości farmakokinetyczne. W rezultacie, mimo wysokiej aktywności biologicznej, ich zastosowanie kliniczne bywa utrudnione[36].

Grzyby lecznicze i jadalne również są uznawane za cenne źródło substancji wykazujących aktywność przeciwnowotworową. Są na ogół niskokaloryczne, zawierają mało lipidów i cholesterolu, a dużo białka i niezbędnych witamin i minerałów, takich jak wapń, fosfor, magnez, potas. Są również dobrym źródłem pierwiastków śladowych, głównie żelaza, cynku, seleniu, miedzi, molibdenu[37]. Bioaktywne cząsteczki można podzielić na związki o dużej masie cząsteczkowej i związki o małej masie cząsteczkowej. Główne substancje biologicznie czynne znajdujące się w grzybach to polisacharydy, glikoproteiny, seskwiterpeny i triterpenoidy, które determinują ich działanie immunomodulujące i przeciwnowotworowe poprzez różne mechanizmy, w tym działanie antyoksydacyjne, zatrzymanie cyklu komórkowego, działanie przeciwzapalne, działanie antyproliferacyjne, działanie cytotoksyczne i indukcję apoptozy[38]. Grzyby zawierają również naturalne antybiotyki, statyny i przeciwutleniacze, w tym związki fenolowe, flawonoidy, karotenoidy i tokoferole[39]. Do tej pory na świecie zidentyfikowano 140 000 gatunków grzybów. Szacuje się jednak, że ich całkowita liczba wynosi od 2,2 do 3,8 miliona . Około 2000 gatunków to grzyby jadalne. Obecnie około 200 gatunków grzybów zebranych ze stanowisk naturalnych jest wykorzystywanych do celów kulinarnych i leczniczych[40]. Grzyby mają wiele właściwości prozdrowotnych, np. działanie antyoksydacyjne (*Armillaria mellea*, *Leccinum aurantiacum*, *Suillus luteus*, *Xerocomus badius*), działanie przeciwnowotworowe (*Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus*), działanie przeciwdrobnoustrojowe (*B. edulis*, *C. cibarius*, *L. deliciosus*), działanie przeciwzapalne (*B. edulis*, *Morchella esculenta*), działanie hipoglikemiczne (*B. edulis* , *C. cibarius*), działanie neuroprotekcyjne (*C. cibarius* , *Tricholoma equestre*) i działanie przeciwwirusowe (*B. edulis*)[41].

Tabela 2. Związki pochodzenia grzybowego oraz mechanizmy działania w chemoprewencji raka jelita grubego[42].

Gatunki grzybów	Związki bioaktywne	Mechanizm działania
<i>Agaricus bisporus</i>	Polisacharydy, kwas galusowy, fenole, flawonoidy, tokoferole	Wychwytywanie anionorodników ponadtlenkowych, hamowanie peroksydacji lipidów.
<i>Boletus edulis</i>	Fenole	Potencjał redukujący, hamowanie peroksydacji lipidów.

<i>Flammulina velutipes</i>	Polisacharydy, flammulina	fenole,	Hamowanie lipidów, rodników hamowanie wybielania β -karotenem.	peroksydacji wychwytywanie hydroksylowych, β -karotenem.
<i>Lentinus edodes</i>	Polisacharydy, chitozan, lentinan, mannoglukan	fenole, glukan,	Wychwytywanie hydroksylowych, zapobieganie lipidów.	rodników peroksydacji
<i>Pleurotus ostreatus</i>	β -karoten, flawonoidy, fenole	tokoferol,	Wychwytywanie anionorodników ponadtlennych i hydroksylowych oraz zapobieganie peroksydacji lipidów.	
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Fenole		Usuwanie wolnych rodników i zapobieganie peroksydacji lipidów.	
<i>Russula delica</i>	Katechina, fenole, tokoferole		Chelatowanie jonów żelazawych, hamowanie odbarwiania β -karotenu, usuwanie rodników hydroksylowych i ponadtlennych.	
<i>Lignosus rhinoceros</i>	Polisacharydowo-białkowe związki fenolowe		Właściwości przeciwutleniające związane z neutralizacją anionorodnika ponadtlennego.	
<i>Morchella esculenta</i>	Fenole, polisacharyd, glukan, galaktomannan, heteroglikan		Wychwytywanie rodników hydroksylowych, hamowanie peroksydacji lipidów.	
<i>Calvatia gigantean</i>	Wielonienasycone tłuszczone, związki fenolowe	kwasy kalwacyna,	Potencjał antyoksydacyjny.	

Pomimo obiecujących wyników badań, wykorzystanie grzybów w chemoprewencji wiąże się z pewnymi ograniczeniami. Należą do nich przede wszystkim zbyt mała liczba badań klinicznych, zmienność składu bioaktywnego, a także niepełne poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za ich działanie przeciwnowotworowe. Dodatkowym wyzwaniem pozostaje ocena bezpieczeństwa, standaryzacja preparatów i potencjalnych interakcji z lekami oraz opracowanie skutecznych systemów dostarczania związków aktywnych[43].

3.2.1 Wierzbówka kiprzyca jako źródło związków bioaktywnych

Wierzbówka kiprzyca (*Epilobium angustifolium* L., syn. *Chamaenerion angustifolium* (L.) Scop.) jest rośliną należącą do rodziny *Onagraceae*, która obejmuje ponad 200 gatunków. *Epilobium angustifolium* rośnie w Azji, Europie i Ameryce Północnej [44]. Gatunek ten jest szeroko wykorzystywany w medycynie tradycyjnej. Zewnętrznie jako środek o działaniu przeciwzapalnym, antyseptycznym oraz wspomagającym gojenie ran. Wewnętrznie wykorzystuje się ją w leczeniu oraz chorób przewodu pokarmowego[45] oraz chorób gruczołu krokowego[46]. W ostatnich latach, obok tradycyjnych zastosowań, coraz większe zainteresowanie budzi potencjał biologiczny wierzbówki kiprzycy w badaniach nad nowotworami przewodu pokarmowego, w tym rakiem jelita grubego.



Rycina 3. Wierzbówka kiprzyca

Skład chemiczny obejmuje szeroką gamę związków polifenolowych, flawonoidów i kwasów fenolowych. W skład głównych kwasów fenolowych wchodzi kwas kawowy, kwas elagowy, kwas galusowy, natomiast dominującymi flawonoidami są kemferol, kwercetyna, mirycetyna[47,48]. Enoteina B jest jednym z najważniejszych związków biologicznie aktywnych obecnych w gatunkach rodzaju *Epilobium*. Wykazuje działanie antyandrogenne, antyproliferacyjne, przeciwnowotworowe, antyoksydacyjne, przeciwzapalne i immunomodulacyjne. Działa przeciwbakteryjnie przeciwko *Helicobacter pylori*, aktywuje komórki NK i limfocyty T, osłabia neurozapalenie w odpowiedzi na leczenie LPS, hamuje produkcję IL-1 β i IL-6 przez aktywowane komórki dendrytyczne i zmniejsza wydzielanie antygeny swoistego dla prostaty w komórkach LNCaP[49]. Kwercetyna wyróżnia się ze względu na dobrze udokumentowane właściwości antyoksydacyjne, które wynikają z jej zdolności do zapobiegania peroksydacji lipidów i neutralizacji wolnych rodników. Oprócz tego kwercetyna wykazała znaczący potencjał przeciwzapalny poprzez modulację kluczowych szlaków zapalnych[50]. Kemferol wykazuje silne działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. Oprócz działania przeciwdrobnoustrojowego, kemferol wykazuje właściwości przeciwzapalne poprzez hamowanie aktywacji NF- κ B i zmniejszenie ekspresji COX-2[51]. Kwas elagowy cechuje się właściwościami przeciwnowotworowymi. Zakłóca on sygnalizację komórek nowotworowych, oddziałując na wiele szlaków molekularnych, hamując w ten sposób angiogenezę i proliferację komórek. Posiada także zdolność do zwiększania aktywności enzymów detoksykacyjnych i ułatwiania naprawy DNA [52]. Kwas ursolowy działa jako silny inhibitor cytokin i enzymów zapalnych, wykazuje też aktywność przeciwdrobnoustrojową[53]. Ekstrakty z gatunków należących do rodzaju *Epilobium* wykazują wielokierunkowe działanie prozdrowotne i terapeutyczne, w tym działanie przeciwdrobnoustrojowe, antyoksydacyjne, przeciwgrzybicze, antyandrogenne, przeciwnowotworowe, antyproliferacyjne, przeciwzapalne i immunomodulacyjne[54]. Oprócz preparatów leczniczych i nutraceutyków, najczęściej stosowaną formą wykorzystania tej rośliny jest napar wodny[55]. Ze względu na obecność licznych związków bioaktywnych wierzbowka kiprzyca stanowi interesujący obiekt badań nad chemoprewencją raka jelita grubego.

Pomimo dobrze udokumentowanego składu fitochemicznego i szerokiego spektrum aktywności biologicznej, liczba badań oceniających wpływ ekstraktów z wierzbowki kiprzycy na komórki raka jelita grubego nadal pozostaje ograniczona, co uzasadnia potrzebę dalszych badań nad jej właściwościami biologicznymi po trawieniu *in vitro* w modelach komórkowych. Dotychczasowe wyniki wskazują jednak, że ekstrakty te mogą wykazywać

aktywność biologiczną o potencjalnym znaczeniu przeciwnowotworowym[56]. Zuzino i wsp. badali wpływ suplementu zielonego zawierającego ekstrakty z rodzaju *Epilobium*, *Urtica dioica* oraz *Evernia prunastri* na komórki raka jelita grubego C26, zarówno w monoterapii, jak i w połączeniu z chemioterapią. Badania te potwierdzają, że ekstrakty te mogą wpływać na wzrost komórek jelita grubego *in vitro*, ekspresję E-kadheryny i reorganizację cytoszkieletu[57]. Uogintaite i wsp. badali wpływ wodnych ekstraktów z wierzbówki kiprzycy oraz oenoteiny B na komórki Caco-2, wykazując istotne zmniejszenie ich żywotności oraz zaburzenie funkcji mitochondriów[54]. Perużyńska i wsp. wykazali przeciwnowotworowe działanie etanolowego ekstraktu z *Epilobium angustifolium* wobec komórek HT-29. Ponadto wykorzystane membrany bakteryjnej celulozy skutecznie uwalniały związki bioaktywne, wywołując zależną od dawki i czasu cytotoksyczność[58].

3.2.2 Soplówka jeżowata jako źródło związków o charakterze prozdrowotnym

Soplówka jeżowata (*Hericium erinaceus* (Bull.) Persi.)) należy do rodziny Hericiaceae. Występuje na całej półkuli północnej. W środowisku naturalnym *H. erinaceus* rośnie w martwym drewnie lub w twardzieli żywych drzew, a także na dużą skalę w uprawach sztucznych przy użyciu niedrogich podłoży[59].



Rycina 4. Soplówka jeżowata

Chiny są największym producentem tego grzyba, który jest uprawiany w celu uzyskania owocników, jak i związków bioaktywnych. Ze względu na bogaty skład metabolitów bioaktywnych *H. erinaceus* jest przedmiotem intensywnych badań dotyczących zarówno jego właściwości prozdrowotnych oraz potencjalnym zastosowaniem

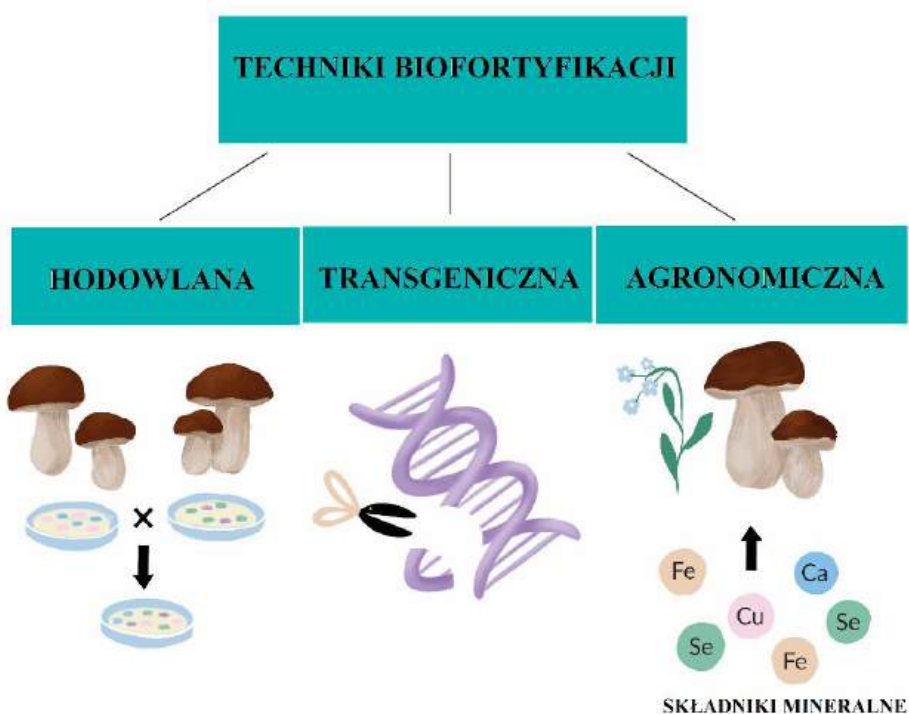
w chemoprewencji nowotworów[60]. *Hericium erinaceus* wytwarza co najmniej 70 różnych bioaktywnych metabolitów, w tym β -glukany, alkaloidy, hericenony, erinacyny, sterole oraz lotne związki aromatyczne[61]. Spośród nich szczególne zainteresowanie budzą erinacyny i hericenony[62]. Cechują się one właściwościami neuroprotekcijnymi, a także aktywnością przeciwnowotworową[63,64]. Ze względu na swój skład *H. erinaceus* ma wiele właściwości prozdrowotnych, w tym działanie przeciwutleniające, przeciwdepresyjne, przeciwnowotworowe, przeciwstarzeniowe, przeciwbakteryjne, przeciwzapalne oraz wzmacniające odporność[65]. Szczególne zainteresowanie w ostatnich latach budzi jednak potencjał przeciwnowotworowy *H. erinaceus*, zwłaszcza w odniesieniu do raka jelita grubego. Aktywność związków fenolowych i flawonoidów zależy od stadium wzrostu tego grzyba. Związki te przyczyniają się do zmniejszenia stresu oksydacyjnego i procesów zapalnych, które odgrywają ważną rolę w rozwoju chorób przewlekłych [66]. Badania wykazały wpływ na poprawę zdrowia jelit i zmniejszenie stanu zapalnego, dzięki zwiększeniu różnorodności mikroflory jelitowej oraz liczby bakterii wytwarzających krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe[67]. Właściwości te, w połączeniu z aktywnością przeciwutleniającą i przeciwzapalną, stanowią przesłanki do badania *H. erinaceus* jako potencjalnego czynnika chemoprewencyjnego raka jelita grubego.

Dotychczasowe wyniki wskazują, że związki bioaktywne mogą modulować proliferację, apoptozę oraz szlaki sygnałowe odpowiedzialne za przeżycie komórek nowotworowych. Tung i wsp. wykazali, że erinacyna S hamuje wzrost opornych na chemioterapię komórek raka jelita grubego. Mechanizm działania obejmował aktywację szlaków proapoptotycznych związanych z TRAIL, TNFR1 i DR5 oraz hamowanie szlaku CXCR4/PI3K/Akt/HIF-1 odpowiedzialnego za przeżywalność komórek nowotworowych. Dodatkowo związek ten ograniczał wzrost guzów w modelu zwierzęcym[68].

Lee i wsp. badali wpływ erinacyny A na komórki raka jelita grubego DLD-1. Wykazano, że erinacyna A indukowała apoptozę komórek nowotworowych. Dochodziło do tego poprzez hamowanie ekspresji białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-XL, aktywację szlaków apoptotycznych związanych Fas i FasL oraz aktywację JNK, NF- κ B i p300, prowadząc do zwiększonej ekspresji genów proapoptotycznych[69].

3.3 Biofortyfikacja jako innowacyjna strategia wzbogacania żywności funkcjonalnej

Biofortyfikacja to proces polegający na zwiększaniu zawartości wybranych składników mineralnych w roślinach lub grzybach, prowadzący do poprawy ich wartości odżywczej. Biofortyfikacja może zwiększyć biodostępność poprzez zmianę form chemicznych na takie, które są łatwiej wchłaniane przez organizm, interakcję z innymi składnikami odżywczymi, które mogą synergistycznie promować wchłanianie innych, zwiększenie stężenia składników odżywczych oraz zwiększenie zawartości substancji wspomagających wchłanianie[70]. Istnieją trzy techniki biofortyfikacji.



Rycina 5. Główne techniki stosowane w biofortyfikacji

Technika hodowlana polega na krzyżowaniu i selekcji różnych odmian w celu uzyskania pożądanych właściwości, takich jak wyższa zawartość mikroelementów. Procedura ta jest wykonywana przez pewien czas, a potomstwo jest badane pod kątem określonych cech. Biofortyfikowane uprawy obejmują ryż bogaty w cynk oraz selen, bataty bogate w jod i witaminę A oraz fasolę bogatą w żelazo. Metoda ta ma swoje ograniczenia,

ponieważ ze względu na pracochłonność i długotrwałość procesu wyprodukowanie plonu o wysokiej zawartości składników odżywczych może zająć kilka lat[71].

Technika transgeniczna umożliwia bardziej precyzyjne i efektywne zwiększanie zawartości wybranych składników odżywczych niż techniki hodowlane. Można to zrobić poprzez zwiększenie ekspresji już obecnych genów, które biorą udział w produkcji składników odżywczych lub poprzez wprowadzenie dodatkowych genów odpowiedzialnych za wyższy poziom witamin lub minerałów. Stanowi ona efektywne narzędzie zwiększania zawartości mikroelementów, zwłaszcza w uprawach o ograniczonej zmienności genetycznej[72].

Technika agronomiczna to proces wzbogacania roślin i grzybów w składniki odżywcze poprzez odpowiednie praktyki nawożenia oraz modyfikację składu gleby lub podłoża hodowlanego. Jest to najszybszy i najtańszy sposób, ale stanowi rozwiązanie krótkoterminowe. Opiera się na stosowaniu nawozów organicznych i nieorganicznych lub bionawozów. Na końcowe stężenie mikroelementów ma wpływ źródło użytego nawozu, jego dawka i etap aplikacji. Interakcje między składnikami odżywczymi mogą wpływać na skuteczność tej metody. Mogą one mieć charakter synergistyczny lub antagonistyczny, wpływając na ich pobieranie i biodostępność[73].

Biofortyfikacja stanowi doskonały sposób na produkcję tzw. żywności funkcjonalnej. Może przyczynić się do zapobiegania chorobom i korzystnie wpłynąć na zdrowie. Ludzie potrzebują co najmniej 22 pierwiastków do prawidłowego rozwoju. Na całym świecie około 2 miliardy ludzi cierpi na niedobór niezbędnych składników odżywczych. WHO prowadzi programy mające na celu zwalczanie niedoborów minerałów, które są bezpośrednią przyczyną dysfunkcji organizmu[74]. Ukryty głód (ang. hidden hunger) oznacza niedobór mikroelementów i witamin, występujący pomimo dostarczania organizmowi odpowiedniej ilości energii. Może on prowadzić do poważnych chorób, takich jak zahamowanie wzrostu, zwiększone ryzyko zachorowalności i powikłań okołoporodowych oraz upośledzenie umysłowe. Ponadto może zaostrzać choroby przewlekłe, znacząco wpływając na jakość życia[75]. WHO uznała anemię za najczęstszy niedobór żywieniowy na świecie, dotyczący 30% populacji. Szacuje się, że na anemię cierpi 800 milionów dzieci i kobiet na całym świecie[76].

Do roślin wykorzystywanych w procesie biofortyfikacji należą ryż, ziemniaki, marchew, pomidory, pszenica oraz sałata. Z kolei popularnym gatunkiem grzybów stosowanym w biofortyfikacji są grzyby z rodzaju *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. Biofortyfikacja nie powinna prowadzić do zmniejszenia plonów lub jakości roślin[73]. Grzyby są coraz

częściej brane pod uwagę w kontekście biofortyfikacji ze względu na niską zawartość energii i tłuszczu, ale wysoką zawartość białka, węglowodanów, błonnika pokarmowego oraz ich zdolność do akumulacji różnych pierwiastków takich jak selen, lit, żelazo, cynk, miedź, magnez i mangan[77].

Głównym wyzwaniem w hodowli grzybów jest właściwy dobór stężenia i formy pierwiastka dodawanego do pożywki. Dlatego każdy przypadek należy traktować indywidualnie[76]. Najtrudniejszym i najbardziej czasochłonnym zadaniem jest optymalizacja procesu biofortyfikacji, ponieważ biodostępność pierwiastków w grzybach zależy nie tylko od ich stężenia i formy chemicznej, ale również od rodzaju zastosowanego podłoża, co może mieć wpływ na rozwój i wygląd grzybni. Może to prowadzić do wyższych kosztów uprawy, spadku atrakcyjności produktu końcowego i obniżenia wartości rynkowej[78].

W biofortyfikacji grzybów wykorzystuje się dwa procesy fermentacyjne, w tym fermentację w stanie stałym (SSF) i fermentację zanurzeniową (SmF). W SSF grzyby rosną na podłożu stałym, co pozwala na bardziej naturalny sposób wzrostu. W SmF natomiast grzyby rosną w podłożu płynnym, co pozwala na szybszy wzrost i łatwiejszą kontrolę warunków fermentacji. Jednak formy pierwiastkowe mogą być mniej biodostępne, a stężenia minerałów są czasami niższe w porównaniu z SSF[79].

Zapotrzebowanie na żywność bogatą w składniki odżywcze rośnie wraz ze wzrostem populacji świata, co sprawia, że biofortyfikacja staje się coraz ważniejszym obszarem badań. Naukowcy starają się tworzyć nowe uprawy o wyższej zawartości niezbędnych witamin i minerałów. Wraz z postępem badań w tej dziedzinie prawdopodobnie powstanie coraz więcej odmian upraw bogatych w składniki odżywcze, które mogą pomóc w walce z globalnym głodem[80].

Mimo rosnącej liczby doniesień dotyczących właściwości biologicznych związków bioaktywnych pochodzenia roślinnego i grzybowego, nadal istnieje szereg istotnych luk w wiedzy. Większość dotychczasowych badań koncentrowała się na ocenie aktywności biologicznej ekstraktów lub wyizolowanych związków bez uwzględnienia procesu trawienia *in vitro*, który pozwala lepiej odzwierciedlić warunki panujące w przewodzie pokarmowym człowieka. Ograniczona jest również liczba badań dotyczących wpływu biofortyfikacji mineralnej grzybów na skład metabolomiczny oraz aktywność biologiczną uzyskanych ekstraktów. Niewiele prac porównuje różne formy chemiczne żelaza stosowane w procesie biofortyfikacji oraz ich wpływ na właściwości przeciwnowotworowe ekstraktów.

W szczególności brakuje badań integrujących wpływ trawienia *in vitro*, biofortyfikacji mineralnej oraz zmian ekspresji genów związanych z proliferacją, migracją i przeżyciem komórek raka jelita grubego w ramach jednego, spójnego modelu eksperymentalnego. W związku z powyższym podjęto badania mające na celu ocenę potencjału chemoprewencyjnego ekstraktów roślinnych i grzybowych po trawieniu *in vitro* oraz określenie wpływu biofortyfikacji grzybów różnymi formami żelaza na ich właściwości biologiczne i odpowiedź molekularną komórek raka jelita grubego.

4. Hipotezy i cele badawcze

W związku z wyżej opisanym problemem badawczym, sformułowano następującą hipotezę badawczą oraz hipotezy szczegółowe.

Hipoteza badawcza:

1. Naturalne produkty roślinne i grzybowe zawierają związki bioaktywne, które po trawieniu *in vitro* mogą zachowywać część aktywności biologicznej i wywoływać korzystne efekty w komórkowych modelach raka jelita grubego.

Przyjęto następujące hipotezy szczegółowe:

1. Biologicznie aktywne składniki obecne w badanych produktach odpowiadają za aktywność przeciwnowotworową.

Wskaźnik weryfikacyjny: identyfikacja i analiza jakościowo-ilościowa związków bioaktywnych.

2. Badane ekstrakty mogą zachowywać mierzalną aktywność biologiczną po trawieniu *in vitro*.

Wskaźnik weryfikacyjny: żywotność i proliferacja komórek, zmiany morfologiczne oraz właściwości bariery nabłonkowej.

3. Biofortyfikacja grzybów wpływa na ich profil metabolomiczny.

Wskaźnik weryfikacyjny: porównanie profilu metabolitów po procesie biofortyfikacji trzema różnymi formami żelaza.

4. Forma chemiczna żelaza zastosowanego w procesie biofortyfikacji wpływa na skład chemiczny i aktywność biologiczną grzybów.

Wskaźnik weryfikacyjny: zawartość żelaza i pozostałych pierwiastków, mapowanie rozkładu pierwiastków, analiza widm FTIR, analiza profilu metabolomicznego, aktywność przeciwutleniająca oraz aktywność biologiczna oceniona w modelach komórkowych.

5. Wybrane warianty biofortyfikacji grzybów mogą zwiększać ich aktywność biologiczną wobec komórek raka jelita grubego w porównaniu z ekstraktami niebiofortyfikowanymi.

Wskaźnik weryfikacyjny: porównanie wyników cytotoksyczności, aktywności przeciwutleniającej, zmian morfologicznych oraz ekspresji genów. pomiędzy ekstraktami biofortyfikowanymi i niebiofortyfikowanymi.

6. Badane ekstrakty modulują ekspresję genów odpowiedzialnych za proliferację, migrację i przeżycie komórek raka jelita grubego.

Wskaźnik weryfikacyjny: zmiany ekspresji mRNA dla genów związanych z proliferacją, migracją, apoptozą i odpowiedzią na stres.

Aby zweryfikować hipotezy sformułowano następujący cel główny i cele szczegółowe.

Cel główny:

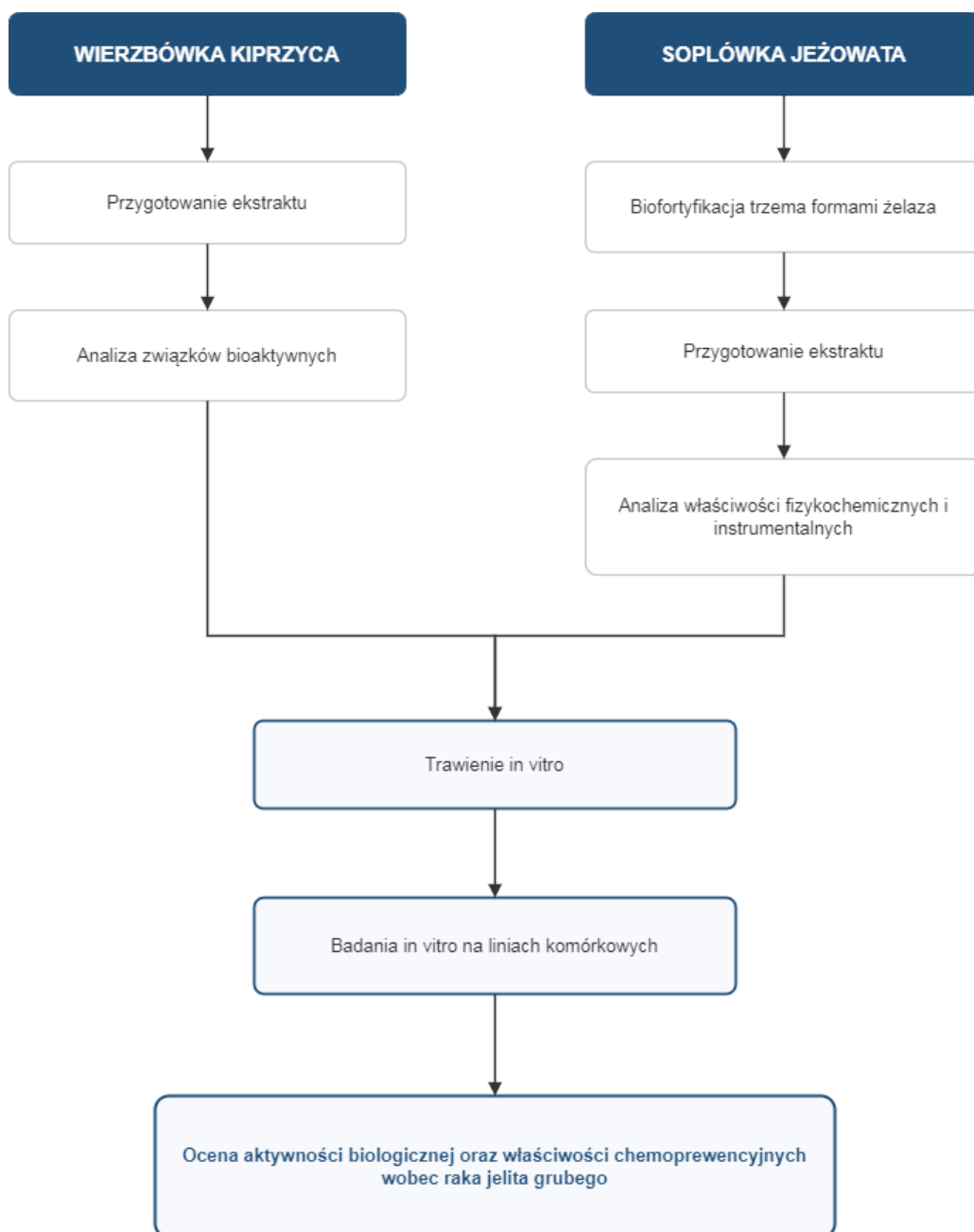
Ocena potencjału chemoprewencyjnego naturalnych produktów pochodzenia roślinnego i grzybowego po trawieniu *in vitro* wobec komórkowych modeli raka jelita grubego oraz określenie wpływu biofortyfikacji na właściwości biologiczne grzybów.

Cele szczegółowe:

1. Określenie składu związków bioaktywnych w badanych produktach.
2. Ocena wpływu trawienia *in vitro* na aktywność biologiczną ekstraktów.
3. Ocena aktywności przeciwnowotworowej badanych ekstraktów wobec komórek raka jelita grubego.
4. Ocena wpływu biofortyfikacji na profil metabolomiczny grzybów.
5. Ocena wpływu formy chemicznej żelaza zastosowanej w biofortyfikacji na aktywność biologiczną grzybów.
6. Ocena wpływu biofortyfikowanych ekstraktów na ekspresję wybranych genów związanych z rozwojem raka jelita grubego.

5. Materiały i metody

Badania będące podstawą naukową niniejszej rozprawy obejmują doświadczenia laboratoryjne prowadzone w latach 2019-2026, w Katedrze Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Umożliwiły one weryfikację sformułowanych wcześniej hipotez badawczych. Ogólny plan badawczy przedstawiono na rycinie 6.



Rycina 6. Plan badawczy

Przeprowadzone badania miały charakter wieloetapowy. W celu uporządkowania przebiegu badań przygotowano zestawienie przedstawiające poszczególne etapy eksperymentów wraz

z materiałem badawczym, zastosowanymi kontrolami, liczbą powtórzeń biologicznych i technicznych oraz ocenianymi parametrami.

Tabela 3. Zestawienie projektu badawczego wraz z zastosowanymi metodami i głównymi parametrami eksperymentów.

Etap badania	Materiał badawczy	Kontrola	Powtórzenia biologiczne	Powtórzenia techniczne	Badany parametr
Biofortyfikacja grzybów	H.E	H.E nie poddana biofortyfikacji	3	1	Otrzymanie grzybów biofortyfikowanych różnymi formami żelaza
Przygotowanie ekstraktów	E.A; H.A	-	1	1	Uzyskanie ekstraktów do dalszych analiz
HPLC-ESI-QTOF-MS/MS	Ekstrakt z E.A	-	2	2	Identyfikacja i analiza jakościowo-ilościowa związków bioaktywnych
LC-MS/MS	Owocniki H.E	H.E nie poddana biofortyfikacji	1	2	Profil metabolomiczny
ICP-OES	Owocniki H.E	H.E nie poddana biofortyfikacji	1	2	Oznaczenie zawartość Fe i pozostałych pierwiastków
FTIR	Owocniki H.E	H.E nie poddana biofortyfikacji	1	2	Identyfikacja grup funkcyjnych
SEM/EDS	Owocniki H.E	H.E nie poddana biofortyfikacji	1	2	Mapowanie rozkładu pierwiastków
Trawienie <i>in vitro</i>	E.A; H.A	Próba ślepa	2	2	Uzyskanie ekstraktów po trawieniu <i>in vitro</i>

DPPH	Ekstrakty z H.E po biofortyfikacji trzema formami żelaza	Trolox / próba ślepa/ H.E nie poddana biofortyfikacji	1	4	Aktywność przeciwutleniająca
MTT	Ekstrakty z E.A i H.E po biofortyfikacji trzema formami żelaza	H.E nie poddane biofortyfikacji, komórki nieeksponowane na działanie ekstraktów , ekstrakt bez komórek	1	6	Żywotność komórek oraz aktywność metaboliczna mitochondriów
NR	Ekstrakt z E.A	Komórki nieeksponowane na działanie ekstraktów	1	6	Integralność błon lizosomalnych (żywotność komórek)
Barwienie May– Grünwald– Giemsa	Ekstrakty z E.A i H.E po biofortyfikacji trzema formami żelaza	H.E nie poddane biofortyfikacji, komórki nieeksponowane na działanie ekstraktów	1	3	Zmiany morfologii komórek
ECIS	Ekstrakt z E.A	Komórki nieeksponowane na działanie ekstraktu	1	3	Integralność bariery nabłonkowej i właściwości adhezyjne komórek
RT-qPCR	Ekstrakty z H.E po	Komórki nieeksponowane	4*	1	Ekspresja genów związanych z

biofortyfikacji	wane na	proliferacją,
FeHHED	działanie	migracją i
	ekstraktu	przeżyciem
		komórek

* Liczba powtórzeń biologicznych zgodnie z opisem procedury izolacji RNA i przygotowania materiału do analizy RT-qPCR. Skróty użyte w tabeli: E.A- *Epilobium angustifolium*; H.E- *Herichium erinaceus*.

5.1 Wierzbówka kiprzyca

Szczegółowe metodyki (przygotowane zgodnie z wymogami czasopism) doświadczeń związanych z badaniem ekstraktu z wierzbówki kiprzycy przedstawiono w publikacji I: „*Biological Activity of an Epilobium angustifolium L. (Fireweed) Infusion after In Vitro Digestion*”.

5.1.1 Materiał roślinny

Materiał roślinny do badań pozyskano z firmy zielarskiej Polskie Zioła (Piaski Wielkie, Polska). Ekstrakcję wodą destylowaną wykonano jednokrotnie w kontrolowanych warunkach, w temperaturze 90°C z użyciem ultradźwięków przez 10 min przy stosunku surowca roślinnego do rozpuszczalnika wynoszącym 1:10 (m/v). Następnie napary przefiltrowano i po schłodzeniu poddano trawieniu *in vitro*.

5.1.2 Sztuczne trawienie *in vitro*

Do badanej próbki dodano wodę destylowaną i poddano symulowanemu trawieniu żołądkowo-jelitowemu *in vitro*. W fazie żołądkowej pH próbki obniżono do 1,7 za pomocą roztworu HCl (5 mol/l), dodano pepsynę, a następnie próbkę inkubowano przez 20 minut w temperaturze 37°C przy mieszaniu z prędkością 20 obr./min. Po zakończeniu fazy żołądkowej aktywność pepsyny zatrzymano poprzez dodanie NaHCO₃ i podniesienie pH do 7,5. Następnie do próbki dodano roztwór Gibsona, sole żółciowe oraz pankreatynę, uzyskując warunki odpowiadające fazie jelita cienkiego. Próbkę inkubowano przez 3 godziny przy utrzymaniu pH na poziomie 6,5 za pomocą sterylnych roztworów NaOH i HCl. Proces trawienia prowadzono w warunkach beztlenowych poprzez przepuszczanie CO₂ przez roztwory. Równolegle przygotowano próbę ślepą, poddawaną identycznym warunkom trawienia, lecz bez dodatku badanego materiału. Strawione próbki odwirowano (10 700× g przez 30 min w temperaturze 4°C) i zamrożono w temperaturze 80°C na 24 h. Następnie przeprowadzono liofilizację w liofilizatorze Labconco (Labconco, Kansas City, MO, USA). Eksperyment wykonano w dwóch niezależnych powtórzeniach biologicznych. Z każdego powtórzenia biologicznego pobrano po dwie próbki do analizy, co dało łącznie cztery powtórzenia. Wszystkie etapy trawienia wykonywano w identycznych warunkach, z

wykorzystaniem świeżo przygotowanych roztworów, co zapewniało powtarzalność procedury. W trakcie eksperymentów nie odnotowano nieprawidłowości wymagających wykluczenia próbek z dalszych analiz.

5.1.3 Analiza jakościowa i ilościowa próbek metodą HPLC-ESI-QTOF-MS/MS

Do analizy próbek wykorzystano wysokosprawny chromatograf cieczowy (seria 1200, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA) sprzężony ze spektrometrem mas QTOF-MS/MS (seria 6500) ze źródłem jonizacji elektrorozpyłowej. Chromatograf składał się z pompy binarnej (G1312C), degazera (G1322A), autosamplera (G1329B), detektora PDA (G1315D) oraz spektrometru mas QTOF-MS/MS (G6530B). Analizę przeprowadzono w trybie jonizacji dodatniej i ujemnej na kolumnie chromatograficznej Zorbax Eclipse Plus RP-18 (wymiary: 150 mm, 2,1 mm, $dp = 3,5 \mu m$) firmy Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornia, USA). Składniki ekstraktu rozdzielano w gradiencie acetonitrylu z 0,1% kwasem mrówkowym (B) w 0,1% kwasie mrówkowym w wodzie: 0 min 1% B; 5 min 20% B; 26 min 32% B; 32 min 95% B; 36 min 95% B; 37 min 1% B. Pozostałe warunki chromatograficzne były następujące: szybkość przepływu 0,2 mL/min, objętość wtrysku 10 μl , temperatura 25 °C, długość przebiegu 45 min. Dla spektrometru masowego przyjęto następujące warunki: napięcie kapilary 3500 V, temperatury gazu i gazu osłonowego 350 i 325 °C, przepływ gazu i gazu osłonowego 12 l/min dla każdego, ciśnienie nebulizatora 35 psig, napięcie skimmera 65 V, napięcie fragmentora 120 V, energie CID 10 i 20 V, napięcie dyszy 1000 V. Sygnały m/z rejestrowano w zakresie 50–1200 u. Do rejestrowania i przetwarzania danych spektrometrycznych użyto oprogramowania Mass Hunter Workstation (wersja B.08.00, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA). Analizy chromatograficzne wykonano w dwóch niezależnych powtórzeniach biologicznych, z których każde analizowano w dwóch powtórzeniach technicznych. Przed rozpoczęciem analiz sprawdzano stabilność układu chromatograficznego oraz prawidłowość pracy spektrometru mas zgodnie z procedurami producenta. Wszystkie próbki analizowano w identycznych warunkach. Do dalszej analizy kwalifikowano chromatogramy o prawidłowym przebiegu rozdziału i stabilnym sygnale, natomiast próbki wykazujące nieprawidłowy przebieg chromatografii, niestabilność sygnału lub zakłócenia uniemożliwiające jednoznaczną identyfikację związków wykluczano z dalszej analizy.

5.1.4 Hodowle komórkowe

Linia komórkowa ludzkiego gruczolaka jelita grubego HT-29 i linia komórkowa ludzkiego nabłonka jelita grubego CCD 841 CoTr zostały zakupione w American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Wszystkie doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem komórek między 5 a 15 pasażem. Przed rozpoczęciem doświadczeń potwierdzono brak zakażenia mykoplazmą. Komórki HT-29 hodowano w podłożu RPMI 1640 z 10% lub 2% FBS (surowica płodowa bydlęca). Komórki CCD841 CoTr hodowano w mieszanych podłożach: RPMI 1640 i Dulbecco (DMEM) (1:1), z 10% lub 2% dodatkiem FBS. Wszystkie podłoża uzupełniono penicyliną (100 U/mL) i streptomycyną (100 mg/mL). Komórki hodowano w standardowych warunkach: temperatura 37°C (HT-29), 34°C (CCD 841 CoTr) i 5% CO₂. Komórki CaCo-2 zakupiono w firmie ATCC (ATCC HTB-37™, Manassas, VA, USA) i hodowano zgodnie z instrukcją producenta w podłożu DMEM, uzupełnionym 20% FBS oraz antybiotykami – 100 IU/mL streptomycyny/penicyliny/amfoterycyny B. Proces prowadzono w inkubatorze Galaxy 170R w temperaturze 37°C, w kontrolowanych warunkach hodowli, przy stałej wilgotności oraz atmosferze zawierającej 5% CO₂.

5.1.5 Metoda MTT

Do określenia żywotności i proliferacji komórek zastosowano test MTT. W metodzie tej wykorzystywany jest żółty barwnik MTT [bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazoliowy], który pod wpływem reduktazy mitochondrialnej jest przekształcany w nierozpuszczalny purpurowy formazan. Komórki wysiano na 96-dołkowe płytki o gęstości 1×10^5 komórek /mL. Po 24- godzinnej inkubacji usunięto pożywkę i do komórek dodano odpowiednie stężenia ekstraktu z wierzbowki kiprzycy (25, 50, 100, 150, 200 i 250 µg/mL) w 2% pożywce. Po upływie 24 h do komórek dodano roztwór MTT (5 mg/mL w PBS) na 3 godziny. Następnie do wszystkich dołków dodano roztwór SDS (10% SDS w 0,01N HCl), aby zatrzymać reakcję i rozpuścić powstałe kryształy formazanu. Następnego dnia oznaczano spektrofotometrycznie absorbancję przy $\lambda = 570$ nm za pomocą czytnika mikropłetek Varioskan™ LUX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Ilość utworzonego formazanu była wprost proporcjonalna do liczby żywych, nieuszkodzonych komórek. Aby oznaczyć stopień proliferacji eksperyment przeprowadzono dokładnie tak, jak opisano powyżej. Jedyne dwie różnice dotyczyły liczby użytych komórek (5×10^4 komórek /mL) oraz czasu inkubacji komórek z ekstraktem, który trwał 96 h. Każde stężenie ekstraktu oraz próbę kontrolną analizowano w sześciu powtórzeniach ($n = 6$). Wyniki

przedstawiono jako średnią z uzyskanych oznaczeń. Do analizy uwzględniano wyłącznie dołki z prawidłową morfologią i adhezją komórek oraz bez widocznych oznak zanieczyszczenia hodowli.

5.1.6 Metoda wychwytu czerwieni obojętnej (test NR)

Metodę NR zastosowano do określenia żywotności komórek. Test opiera się na akumulacji NR w lizosomach żywych komórek. Proces ten odbywa się za pomocą transportu biernego. Martwe i uszkodzone komórki nie wiążą barwnika. Komórki wysiano na 96-dołkowe płytki o gęstości 1×10^5 komórek /mL. Po 24- godzinnej inkubacji usunięto pożywkę i do komórek dodano odpowiednie stężenia ekstraktu z wierzbówki kiprzycy (25, 50, 100, 150, 200 i 250 $\mu\text{g/mL}$) w 2% pożywce. Umieszczono płytkę w inkubatorze na 24h. Po tym czasie dodano do każdego dołka po 100 μL roztworu NR i umieszczono płytkę na 3h w inkubatorze. Następnie usunięto NR i dodano po 200 μL utrwalacza (0,5% r-r formaliny w 1% r-rze CaCl_2) i inkubowano 2 minuty w temperaturze pokojowej. Następnie przeprowadzono ekstrakcję w temperaturze pokojowej przez 20 minut, dodając lodowaty kwas octowy (1% w 50% etanolu) i oznaczano spektrofotometrycznie absorbancję przy $\lambda = 550 \text{ nm}$ za pomocą czytnika mikropłytek Varioskan™ LUX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Ilość zaabsorbowanego barwnika, odczytywana spektrofotometrycznie, była wprost proporcjonalna do liczby żywych, nieuszkodzonych komórek. Każde stężenie ekstraktu oraz próbę kontrolną analizowano w sześciu powtórzeniach ($n = 6$). Wyniki przedstawiono jako średnią z uzyskanych oznaczeń. Do analizy uwzględniano wyłącznie dołki z prawidłową morfologią i adhezją komórek oraz bez widocznych oznak zanieczyszczenia hodowli.

5.1.7 Barwienie metodą May-Grünwald-Giemsa

Metodę zastosowano do oceny liczby i morfologii hodowanych komórek oraz zmian tych parametrów pod wpływem badanego ekstraktu. Barwienie przeprowadzono na płytkach 24-dołkowych (1×10^5 komórek/mL). Po 24-godzinnej inkubacji usunięto pożywkę hodowlaną i do komórek dodano odpowiednie stężenia ekstraktu z wierzbówki kiprzycy (25, 50, 100, 150, 200 i 250 $\mu\text{g/mL}$) w 2% medium. Następnego dnia pożywkę usunięto, a komórki barwiono barwnikiem May-Grünwald przez 3 minuty. Następnie dodano wodę dejonizowaną, po czym płyn usunięto. W kolejnym etapie komórki barwiono barwnikiem Giemsa (rozcieńczenie 1:20) przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie usunięto barwnik, a studzienki przepłukano wodą dejonizowaną i pozostawiono do wyschnięcia. Zdjęcia wykonano za pomocą mikroskopu Motic® ^{AE31} Elite (Motic Scientific,

Richmond, BC, Kanada). Każde stężenie ekstraktu oraz próbę kontrolną analizowano w trzech powtórzeniach ($n = 3$). Wszystkie etapy barwienia przeprowadzano zgodnie z jednakowym protokołem, z zachowaniem tych samych czasów inkubacji oraz stężeń odczynników. Z dalszej analizy wykluczono próbki wykazujące uszkodzenie warstwy komórkowej, nierównomierne wybarwienie lub artefakty uniemożliwiające wiarygodną ocenę mikroskopową.

5.1.8 Metoda ECIS (Electric Cell-Substrate Impedance Sensing)

Pomiary impedancji, rezystancji i pojemności elektrycznej przeprowadzono z wykorzystaniem systemu ECIS Z θ (Applied Biophysics Ltd., Troy, NJ, USA). System składa się z dwóch oddzielnych jednostek: stacji dokującej umieszczonej wewnątrz inkubatora, oraz jednostki sterującej Z theta, umieszczonej na zewnątrz inkubatora. Elektrody pomiarowe ECIS umieszczono w stacji dokującej w inkubatorze (Galaxy 170R) w kontrolowanych warunkach temperatury (37 °C) i nasycenia dwutlenkiem węgla (5% CO₂). Po 24-godzinnej stabilizacji w pożywce DMEM płytki zaszczerpiono zawiesziną komórek o stężeniu $1,2 \times 10^5$ komórek/mL (600 μ l/dolek). Następnie do hodowli dodano badany ekstrakt w zakresie stężeń 25, 50, 100, 150, 200 i 250 μ g/mL. Płytki hodowlane umieszczono z powrotem w inkubatorze i rozpoczęto pomiary w czasie rzeczywistym. Zastosowano domyślne, optymalne częstotliwości: rezystancja (R) 4000 Hz, impedancja (Z) 32 000 Hz i pojemność elektryczna (C) 64 000 Hz. Zmiany rejestrowano jako sygnały impedancji, a uzyskane dane przetwarzano za pomocą oprogramowania ECIS. Wygenerowane dane przedstawiały zależność impedancji/rezystancji/pojemności od czasu. Każde stężenie ekstraktu oraz próbę kontrolną analizowano w trzech powtórzeniach. Przed rozpoczęciem pomiarów sprawdzano stabilność sygnału bazowego oraz prawidłowe przyleganie komórek do elektrod. Wszystkie pomiary prowadzono w identycznych warunkach hodowli. Z dalszej analizy wykluczano pomiary, w których stwierdzono niestabilny sygnał bazowy, nieprawidłowy wzrost komórek lub uszkodzenie elektrody pomiarowej.

5.2 Soplówka jeżowata

Szczegółowe metodyki (przygotowane zgodnie z wymogami czasopism) doświadczeń związanych z badaniem ekstraktu z soplówki jeżowatej przedstawiono w publikacji III i IV: „*Comparative Iron biofortification in Hericium erinaceus: A study of different ionic forms and their uptake efficiency*” i „*Impact of Iron Speciation on the Cytotoxicity and Gene*

5.2.1 Biofortyfikacja

W niniejszym badaniu wykorzystano szczep *Hericium erinaceus* HE-17. Inokulum zaszczipiające pozyskano z Kolekcji Grzybów Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Podłoże hodowlane składało się z mieszaniny trocin bukowych i dębowych (3:1, v/v), wzbogaconej otrębami pszennymi (20%), mąką kukurydzianą (5%), śrutą sojową (5%) oraz gipsem (1%). Podłoże nawilżano do wilgotności 60% roztworami zawierającymi różne formy żelaza: chlorek żelaza(III) sześciowodny ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), siarczan żelaza(II) siedmiowodny ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) oraz kompleks potasowo-żelazowy bis(2-hydroksybenzyl)etylenodiaminodioctanu (FeHBED) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Stężenie żelaza w każdym z zastosowanych roztworów wynosiło 10 mM. Próbę kontrolną stanowiło podłoże bez dodatku żelaza. Przygotowane podłoża pakowano do worków polipropylenowych z mikrofiltrem, po 1 kg do każdego worka. Po sterylizacji prowadzonej w temperaturze 121°C przez 60 minut podłoże schładzano do 25°C. Następnie do każdego worka wprowadzano 15 g inokulum w postaci grzybni hodowanej na ziarnie pszenicy. Inkubację prowadzono w temperaturze 25°C i przy wilgotności względnej powietrza wynoszącej 80–85% do momentu całkowitego przerośnięcia podłoża przez grzybnię. Następnie worki przenoszono do pomieszczenia hodowlanego. W fazie owocnikowania utrzymywano wilgotność względną powietrza na poziomie 90–95% oraz temperaturę $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Hodowlę dodatkowo doświetlano światłem fluorescencyjnym o natężeniu 500 lx przez 12 godzin na dobę. Pomieszczenie hodowlane było wentylowane w sposób zapewniający utrzymanie stężenia CO_2 poniżej 1000 ppm. Owocniki zbierano po osiągnięciu pełnej dojrzałości. Bezpośrednio po zbiorze owocniki poddawano suszeniu w temperaturze 40°C do momentu uzyskania stałej masy. Wysuszony materiał przechowywano w próżniowo zamkniętych workach foliowych. Każdy wariant doświadczenia prowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych, przy czym jednostkę biologiczną stanowił jeden worek uprawowy. Z każdego worka pobierano jeden owocnik w stadium dojrzałości fizjologicznej, odpowiadającym rozpoczęciu wysiewu zarodników. Następnie owocniki uzyskane z trzech powtórzeń biologicznych łączono w jedną próbkę zbiorczą, która była wykorzystywana do dalszych analiz. Nie analizowano zmienności pomiędzy poszczególnymi powtórzeniami biologicznymi.

5.2.2 Nietargetowane profilowanie metabolomiczne metodą chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS)

Do 100 mg liofilizatu owocników dodawano 900 μ L mieszaniny metanolu, wody i acetonitrylu w stosunku objętościowym 50:25:25 (v/v/v), zawierającej deuterowane wzorce wewnętrzne. Próbkę wytrząsano przez 30 minut z prędkością 2000 obr./min w temperaturze 4°C w celu ekstrakcji metabolitów i wytrącenia białek. Następnie próbki wirowano przez 4 minuty przy 4000 obr./min i 4°C. Po odwirowaniu 300 μ L supernatantu przenoszono do fiolek chromatograficznych i analizowano tego samego dnia metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS). Próbkę kontroli jakości (QC) przygotowano poprzez zmieszanie wszystkich próbek badanych w równych proporcjach, a następnie poddano je identycznej procedurze przygotowania jak próbki analityczne.

Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu cieczowego ExionLC wyposażonego w pompę binarną, autosampler i termostat kolumnowy, sprzężonego ze spektrometrem mas Triple TOF 6600+ (Sciex, Framingham, MA, USA). Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie Phenomenex Luna® Omega Polar C18 (150 $\times$ 2,1 mm; 1,6 μ m) z zastosowaniem elucji gradientowej przez 45 min. Fazę ruchomą stanowiły: woda z 10 mM octanem amonu (faza A) oraz acetonitryl z 0,1% kwasem mrówkowym (faza B). Objętość wstrzykiwanej próbki wynosiła 2 μ L, temperatura kolumny 20°C, a przepływ fazy ruchomej 0,2 mL/min. Analizy prowadzono w trybie jonizacji dodatniej i ujemnej, a dane spektralne rejestrowano w trybie SWATH. Do analizy zakwalifikowano metabolity o intensywności sygnału przekraczającej próg detekcji oraz spełniające kryteria dopasowania do biblioteki producenta (błąd masy < 5 ppm oraz potwierdzone fragmenty MS/MS) (n = 115). Istotnie zmienione metabolity (n = 28) wytypowano na podstawie wartości VIP > 1,0 oraz p < 0,05. Próbkę wzbogacano deuterowanymi wzorcami wewnętrznymi w zakresie stężeń mikromolowych w celu korekcji efektów matrycowych oraz zapewnienia dokładności oznaczeń ilościowych.

5.2.3 Oznaczanie zawartości pierwiastków metodą ICP-OES

Stężenia jonów metali oznaczano metodą optycznej spektrometrii emisyjnej z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (ICP-OES; 720 ES, Varian, Australia). System wprowadzania próbki składał się z nebulizatora Conikal®, cyklonowej komory rozpylającej oraz trzykanałowej pompy perystaltycznej. Oznaczenia prowadzono przy następujących parametrach pracy aparatu: moc 1200 W, przepływ gazu plazmowego (argon) 15 L/min,

przepływ gazu pomocniczego (argon) 2,25 dm³/min, przepływ gazu rozpylającego (argon) 0,2 dm³/min oraz prędkość pompy 12 obr./min. Do oznaczeń wykorzystano następujące długości fal analitycznych: Ca(II) – 393,366 nm, Mg(II) – 280,270 nm, Zn(II) – 213,857 nm, Fe(III) – 259,940 nm, K(I) – 769,897 nm, Na(I) – 589,592 nm, Cu(II) – 327,395 nm oraz Mn(II) – 257,610 nm. Aparat ICP-OES kalibrowano z wykorzystaniem standardów ICP dla oznaczanych jonów.

5.2.4 Pomiary spektroskopowe metodą FTIR

Widma FTIR rejestrowano przy użyciu spektrometru IRSpirit wyposażonego w poziomą przystawkę ATR (PIKE Technologies, Japonia) z kryształem ZnSe o geometrii 45°, umożliwiającą wielokrotne wewnętrzne odbicia wiązki promieniowania podczas pomiaru. Próbkę przygotowano zgodnie z wcześniej opisaną procedurą. Dla każdej próbki wykonano 40 skanów w zakresie liczb falowych 450–3800 cm⁻¹, a uzyskane dane uśredniano automatycznie przy użyciu oprogramowania LabSolutions. Dla każdej próbki przeprowadzono trzy niezależne pomiary przy rozdzielczości spektralnej 2 cm⁻¹. Kryształ ATR utrzymywano w czystości poprzez płukanie rozpuszczalnikami o wysokiej czystości dostarczonymi przez firmę Merck KGaA. Otrzymane widma analizowano i opracowywano z wykorzystaniem oprogramowania Grams AI (wersja 9.3, ThermoGalactic Industries, Waltham, MA, USA) oraz OriginPro 2021b (wersja SR1 9.8.5.204, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

5.2.5 Obrazowanie próbek za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM)

Próbki rozdrabniano na drobny proszek przy użyciu młótarza agatowego. Otrzymany proszek mieszano z 99,8% etanolem (POCH) do uzyskania zawiesiny, którą następnie homogenizowano ultradźwiękowo przez 10 s. Zawiesinę nanoszono na miedziane siatki mikroskopowe (200 mesh) pokryte błoną Formvar typu „lacey”, stabilizowaną warstwą węgla (Ted Pella), a następnie pozostawiano do całkowitego odparowania rozpuszczalnika. Następnie próbki umieszczano w specjalnym uchwycie i przenoszono do mikroskopu elektronowego. Obserwacje prowadzono z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego Titan G2 60–300 kV (FEI Company). Mapowanie próbek, obejmujące określenie rozmieszczenia pierwiastków, wykonywano w trybie STEM, rejestrując widma EDS dla każdego punktu odpowiadającego pikselom mapy. Uzyskane mapy przedstawiano w postaci matrycy pikseli, gdzie kolor odpowiadał oznaczanemu pierwiastkowi, a intensywność barwy odzwierciedlała jego udział w próbce.

5.2.6 Sztuczne trawienie *in vitro*

Do badanej próbki dodano wodę destylowaną i poddano symulowanemu trawieniu żołądkowo-jelitowemu *in vitro*. W fazie żołądkowej pH próbki obniżono do 1,7 za pomocą roztworu HCl (5 mol/L), dodano pepsynę, a następnie próbkę inkubowano przez 20 minut w temperaturze 37°C przy mieszaniu z prędkością 20 obr./min. Po zakończeniu fazy żołądkowej aktywność pepsyny zatrzymano poprzez dodanie NaHCO₃ i podniesienie pH do 7,5. Następnie do próbki dodano roztwór Gibsona, sole żółciowe oraz pankreatynę, uzyskując warunki odpowiadające fazie jelita cienkiego. Próbkę inkubowano przez 3 godziny przy utrzymaniu pH na poziomie 6,5 za pomocą sterylnych roztworów NaOH i HCl. Proces trawienia prowadzono w warunkach beztlenowych poprzez przepuszczanie CO₂ przez roztwory. Równolegle przygotowano próbę ślepą, poddawaną identycznym warunkom trawienia, lecz bez dodatku badanego materiału. Strawione próbki odwirowano (10 700× g przez 30 min w temperaturze 4°C) i zamrożono w temperaturze 80°C na 24 h. Następnie przeprowadzono liofilizację w liofilizatorze Labconco (Labconco, Kansas City, MO, USA). Eksperyment wykonano w dwóch niezależnych powtórzeniach biologicznych. Z każdego powtórzenia biologicznego pobrano po dwie próbki do analizy, co dało łącznie cztery powtórzenia. Wszystkie etapy trawienia wykonywano w identycznych warunkach, z wykorzystaniem świeżo przygotowanych roztworów, co zapewniało powtarzalność procedury. W trakcie eksperymentów nie odnotowano nieprawidłowości wymagających wykluczenia próbek z dalszych analiz.

5.2.7 Metoda DPPH

Metoda ta opiera się na ocenie zdolności przeciwutleniaczy do neutralizacji stabilnego rodnika DPPH. W wyniku przekazania atomu wodoru do wolnego rodnika DPPH powstaje odpowiadająca mu hydrazyna, czemu towarzyszy spadek absorbancji oraz zmiana barwy roztworu z fioletowej na żółtą. Analizę przeprowadzono na płytkach 96-dołkowych. Metanolowe roztwory badanych próbek oraz Troloxu przygotowano w odpowiednich rozcieńczeniach. Wszystkie warianty biofortyfikacji oceniano w stężeniach 50, 100, 200, 400 oraz 600 µg/mL. Trolox zastosowano jako kontrolę pozytywną, natomiast metanol wykorzystano jako kontrolę negatywną. Następnie do każdego dołka dodano 100 µL odpowiedniego rozcieńczenia próbki, Troloxu lub metanolu, a następnie 100 µL roztworu DPPH przygotowanego w metanolu o stężeniu 0,2 mg/mL. Po 10-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej absorbancję mierzono przy długości fali 515 nm za pomocą wielofunkcyjnego czytnika mikropłytek Varioskan™ LUX (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA). Każde stężenie ekstraktu oraz próbę kontrolną analizowano w czterech powtórzeniach ($n = 4$). Wyniki przedstawiono jako średnią z uzyskanych oznaczeń.

5.2.8 Hodowle komórkowe

Linia komórkowa ludzkiego gruczolakoraka jelita grubego HT-29 została zakupiona w American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Wszystkie doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem komórek między 5 a 15 pasażem. Przed rozpoczęciem doświadczeń potwierdzono brak zakażenia mykoplazmą. Komórki hodowano w podłożu RPMI 1640 suplementowanym 10% lub 2% FBS z dodatkiem antybiotyków: penicylina (100 U/mL) i streptomycyna (100 mg/mL). Komórki hodowano w standardowych warunkach: temperatura 37°C i 5% CO₂.

5.2.9 Metoda MTT

Test MTT zastosowano do oceny żywotności komórek. W komórkach aktywnych metabolicznie żółta sól tetrazoliowa (MTT) jest redukowana przez dehydrogenazę bursztynianową do nierozpuszczalnych fioletowych kryształów formazanu, co powoduje widoczną zmianę barwy z żółtej na fioletową. Komórki wysiano na 96-dółkowe płytki o gęstości 1×10^5 komórek /mL. Po 24 godzinach podłoże hodowlane usunięto i zastąpiono świeżym podłożem zawierającym odpowiednie stężenia ekstraktu z *Hericium erinaceus* poddanego trawieniu *in vitro*. Wszystkie warianty biofortyfikacji oceniano w stężeniach 50, 100, 200, 400 oraz 600 µg/mL. Po 24-godzinnej inkubacji, w obecności lub przy braku badanego ekstraktu, dodano roztwór MTT (5 mg/mL w PBS), a następnie płytki inkubowano przez kolejne 3 godziny w celu umożliwienia powstania formazanu. Reakcję zatrzymywano poprzez dodanie 10% SDS przygotowanego w 0,01 N HCl w celu rozpuszczenia kryształów. Po całonocnej inkubacji (24 h) absorbancję mierzono przy długości fali 570 nm za pomocą wielofunkcyjnego czytnika mikropłytek Varioskan™ LUX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Uzyskane wartości absorbancji, odpowiadające intensywności fioletowego zabarwienia, były wprost proporcjonalne do liczby żywych komórek. Każde stężenie ekstraktu oraz próbę kontrolną analizowano w sześciu powtórzeniach ($n = 6$). Wyniki przedstawiono jako średnią z uzyskanych oznaczeń. Do analizy uwzględniano wyłącznie dołki z prawidłową morfologią i adhezją komórek oraz bez widocznych oznak zanieczyszczenia hodowli.

5.2.10 Barwienie metodą May-Grünwald-Giemsa

Metodę zastosowano do oceny liczby i morfologii hodowanych komórek oraz zmian tych parametrów pod wpływem badanych ekstraktów. Komórki wysiano na płytki 24-

dołkowe o gęstości 5×10^5 komórek/mL (1 ml na dołek). Po 24-godzinnej inkubacji w obecności lub przy braku badanych ekstraktów podłoże hodowlane ostrożnie usuwano, a następnie komórki poddano barwieniu. Wszystkie warianty biofortyfikacji oceniano w stężeniach 50, 100, 200, 400 oraz 600 $\mu\text{g/mL}$. Do każdego dołka dodano 1 ml roztworu May-Grünwald i inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 1 ml wody dejonizowanej, a po kolejnych 3 minutach roztwór barwiący usuwano. Dołki delikatnie przepłukano wodą dejonizowaną, po czym komórki barwiono roztworem Giemsy rozcieńczonym w stosunku 1:20 przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu barwienia barwnik usunięto, dołki ponownie przepłukano 1 mL wody dejonizowanej i pozostawiano do wyschnięcia na powietrzu. Morfologię komórek dokumentowano przy użyciu mikroskopu KEYENCE VHX-X1. Każde stężenie ekstraktu oraz próbę kontrolną analizowano w trzech powtórzeniach ($n = 3$). Wszystkie etapy barwienia przeprowadzano zgodnie z jednakowym protokołem, z zachowaniem tych samych czasów inkubacji oraz stężeń odczynników. Z dalszej analizy wykluczano próbki wykazujące uszkodzenie warstwy komórkowej, nierównomierne wybarwienie lub artefakty uniemożliwiające wiarygodną ocenę mikroskopową.

5.2.11 Ekspresja genów związanych z rakiem jelita grubego

Całkowite RNA zostało wyizolowane z komórek HT-29 hodowanych w podłożu RPMI suplementowanym 2% FBS, a także z komórek hodowanych w tym samym podłożu z dodatkiem ekstraktu z *Hericium erinaceus* biofortyfikowanego FeHBED o stężeniu 600 $\mu\text{g/mL}$. Po trypsynizacji komórki przemyto buforem fosforanowym (PBS) i przechowywano w temperaturze -70°C do czasu dalszych eksperymentów. Do izolacji RNA użyty został zestaw GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific). Izolacja przebiegła zgodnie z instrukcją producenta. W skrócie, 5×10^6 komórek lizowano w 600 μL buforu lizującego zawierającego β -merkaptotanol. Próbki krótko mieszano, po czym dodano 360 μL etanolu. Następnie lizaty nanoszono na kolumny do oczyszczania RNA i wirowano przy $12\,000 \times g$. Po kolejnych etapach płukania z wykorzystaniem dołączonych buforów płuczających RNA eluowano wodą wolną od nukleaz. Pozostałości genomowego DNA zostały usunięte poprzez trawienie DNazą I (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska), stosując 1 U enzymu na 1 μg RNA. Reakcję prowadzono przez 30 minut w temperaturze 37°C , a następnie zatrzymano przez dodanie EDTA do końcowego stężenia 5 mM. DNazę inaktywowano poprzez inkubację w temperaturze 75°C przez 10 minut. Stężenie oraz czystość RNA oceniano spektrofotometrycznie przy użyciu aparatu NanoDrop 2000. Oczyszczone RNA

wykorzystano następnie do syntezy komplementarnego DNA (cDNA), które syntetyzowano z 1 µg całkowitego RNA przy użyciu zestawu RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific), zgodnie z instrukcją producenta. Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono w temperaturze 42°C przez 60 minut, a następnie reakcję zatrzymywano poprzez ogrzewanie próbek w temperaturze 70°C przez 5 minut. Otrzymane cDNA zostało bezpośrednio wykorzystane jako matryca w ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (qPCR). Analizę względnej ekspresji mRNA przeprowadzono metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem systemu StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)[81]. Reakcje amplifikacji wykonano z użyciem mieszaniny TaqMan™ Fast Advanced Master Mix oraz gotowej płytki TaqMan™ Array Plate (Human Molecular Mechanisms of Cancer). Zestaw obejmował 92 testy skierowane przeciwko genom zaangażowanym w molekularne mechanizmy nowotworzenia, a także trzy potencjalne geny referencyjne. Warunki reakcji PCR były następujące: wstępna inkubacja w temperaturze 50°C przez 2 minuty, aktywacja enzymu w temperaturze 95°C przez 20 sekund, a następnie 40 cykli obejmujących denaturację w temperaturze 95°C przez 1 sekundę oraz etap przyłączania starterów i elongacji w temperaturze 60°C przez 20 sekund.

Spośród trzech genów referencyjnych (GAPDH, HPRT1 i GUSB) jako najbardziej odpowiedni wybrano GUSB, ze względu na najmniejszą zmienność pomiędzy badanymi wariantami, potwierdzoną najniższymi wartościami odchylenia standardowego Ct. W pierwszym etapie wyznaczono wartości ΔCt jako różnicę pomiędzy wartością Ct genu badanego, a wartością Ct genu referencyjnego. Następnie obliczono wartości $\Delta\Delta Ct$ jako różnicę pomiędzy wartością ΔCt próbki eksperymentalnej i wartością ΔCt próbki kontrolnej. Na podstawie uzyskanych wartości $\Delta\Delta Ct$ obliczano względną zmianę poziomu ekspresji genów (fold change, FC) zgodnie ze wzorem $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Dodatkowo obliczono wartości $\log_2 FC$. Dodatnie wartości $\log_2 FC$ wskazywały na zwiększoną ekspresję genu, wartości ujemne na obniżoną ekspresję względem próby kontrolnej.

Reakcje przeprowadzono z wykorzystaniem testów TaqMan™ dostarczonych przez producenta, dla których wydajność amplifikacji została zweryfikowana w procesie walidacji zestawu. Do dalszej analizy kwalifikowano wyłącznie reakcje wykazujące prawidłowy przebieg amplifikacji zgodnie z oceną oprogramowania StepOne Software oraz wartości Ct mieszczące się w zakresie oznaczalności metody. Całkowite RNA wyizolowano z czterech niezależnych próbek biologicznych. Do analizy ekspresji genów metodą qPCR wybrano jedną próbkę kontrolną oraz jedną próbkę po ekspozycji na ekstrakt z *Hericium erinaceus* biofortyfikowanego FeHBED, na podstawie oceny jakości i stężenia wyizolowanego RNA.

5.3 Analizy statystyczne

Wyniki uzyskane w trakcie eksperymentów w I publikacji badawczej „*Biological Activity of an Epilobium angustifolium L. (Fireweed) Infusion after In Vitro Digestion*” zestawiono w programie MS Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem programu STATISTICA 13.3. Pierwszym krokiem była weryfikacja założenia dotyczącego normalności rozkładu danych oraz jednorodności wariancji. Do oceny różnic pomiędzy badanymi grupami zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), a następnie test post hoc Dunnetta, porównując wszystkie grupy eksperymentalne z grupą kontrolną. Istotność statystyczną oceniano na podstawie wartości p . Za istotne statystycznie w porównaniu z kontrolą uznawano wyniki oznaczone jako: * $p < 0,01$, ** $p < 0,005$ oraz *** $p < 0,001$.

Analizę statystyczną wyników uzyskanych w trakcie eksperymentów w III publikacji badawczej: „*Comparative Iron biofortification in Hericium erinaceus: A study of different ionic forms and their uptake efficiency*” wykonano w programie STATISTICA 14.2, przyjmując poziom istotności statystycznej $p < 0,05$. Pierwszym krokiem była weryfikacja założenia dotyczącego normalności rozkładu danych oraz jednorodności wariancji. Różnice pomiędzy grupami oceniano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), a następnie testu post hoc Tukeya (HSD), który zastosowano do identyfikacji istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi wariantami. W analizie danych metabolomicznych, obejmującej jednoczesne porównanie wielu metabolitów, zastosowano korektę wielokrotnego testowania metodą Benjamini–Hochberga (FDR), przyjmując skorygowaną wartość $p < 0,05$ jako próg istotności statystycznej [82].

Analizę statystyczną wyników uzyskanych w trakcie eksperymentów w IV publikacji badawczej: „*Impact of Iron Speciation on the Cytotoxicity and Gene Expression Profile of Biofortified Hericium erinaceus in Human Colorectal Adenocarcinoma*” przeprowadzono w środowisku programistycznym Python. Przetwarzanie i przygotowanie danych wykonano z wykorzystaniem biblioteki Pandas. Krzywą wzorcową Troloxu dopasowano metodą regresji liniowej z zastosowaniem metody najmniejszych kwadratów (OLS, ordinary least squares) zaimplementowanej w pakiecie statsmodels. Istotność modelu kalibracyjnego oceniano na podstawie współczynnika determinacji (R^2), wartości p oraz błędu standardowego współczynnika kierunkowego. Zdolność antyoksydacyjną wyrażoną jako równoważnik Troloxu (TEAC, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) dla analizowanych próbek obliczano poprzez podstawienie średnich wartości absorbancji do równania regresji

liniowej krzywej kalibracyjnej. Odchylenie standardowe wartości TEAC wyznaczano metodą propagacji błędów dla funkcji liniowej zgodnie ze wzorem:

$$SD_{TEAC} = \frac{SD_{abs}}{|a|}$$

gdzie a oznacza współczynnik kierunkowy krzywej kalibracyjnej.

Różnice pomiędzy grupami oceniano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), wykorzystując model liniowy dopasowany metodą OLS w pakiecie statsmodels, po uprzedniej weryfikacji założeń dotyczących normalności rozkładu danych oraz jednorodności wariancji. Istotność wpływu badanego czynnika oceniano przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Porównania post hoc przeprowadzono z zastosowaniem testu HSD w celu identyfikacji par grup różniących się istotnie statystycznie. Eksperymenty wykonane w niezależnych powtórzeniach przedstawiono jako średnią $\pm$ odchylenie standardowe (SD) uzyskane dla tych niezależnych doświadczeń. Analiza ekspresji genów metodą qPCR miała charakter eksploracyjny. Ze względu na analizę pojedynczej próbki biologicznej w każdej z badanych grup nie wykonywano testów statystycznych ani korekty wielokrotnego testowania. Wyniki przedstawiono jako względną zmianę ekspresji genów obliczoną metodą $2^{-\Delta\Delta Ct}$ oraz jako wartości $\log_2 FC$.

Wizualizacje danych przygotowano z wykorzystaniem biblioteki Matplotlib, natomiast wykresy statystyczne opracowano przy użyciu biblioteki Seaborn. Skrypt analityczny uruchamiano z poziomu wiersza poleceń z wykorzystaniem modułu Argparse.

6. Omówienie wyników i dyskusja

6.1 Wierzbówka kiprzyca

6.1.1 Profil związków bioaktywnych w ekstrakcie

Przeprowadzono jakościową i ilościową analizę składników aktywnych zawartych w ekstrakcie z wierzbówki kiprzycy. Ilości poszczególnych związków określono poprzez porównanie zmierzonych powierzchni pików chromatograficznych z powierzchniami odpowiednich wzorców. Zidentyfikowano dwadzieścia sześć związków z grupy kwasów fenolowych, flawonoidów, kwasów organicznych oraz pochodnych estrowych glukozydów. Osiem związków wymienionych w poniższej tabeli było obecnych w znaczących ilościach. Wszystkie należą do grupy polifenoli o szerokim spektrum działania przeciwnowotworowego.

Tabela 4. Zawartość poszczególnych związków ($\mu\text{g/mL}$) w ekstrakcie z *E. angustifolium* L. poddanym trawieniu *in vitro*. Oznaczenia przeprowadzono z wykorzystaniem wysokorozdzielczego spektrometru mas sprzężonego z wysokosprawnym chromatografem cieczowym (HPLC-ESI-Q-TOF-MS).

Nazwa substancji	Zawartość w $\mu\text{g/mL}$ po trawieniu <i>in vitro</i>
Glukuronid kwercetyny	593,0
Guajaweryna (arabinofuranozyd kwercetyny)	212,7
Afzelina	148,2
Kwas neochlorogenowy	37,3
Glukozyd kemferolu	24,9
Kwas chlorogenowy	20,8
Izokwercetyna	15,6
Galusan hiperozydu	15,5

Tabela 5 przedstawia zawartość procentową poszczególnych związków w ekstrakcie z *Epilobium angustifolium* L. przed i po trawieniu *in vitro*. Analiza wykazała wyraźny spadek zawartości wszystkich oznaczonych związków, co wskazuje na istotny wpływ procesu trawienia *in vitro* na zawartość związków obecnych w ekstrakcie.

Tabela 5. Procentowa zawartość poszczególnych związków w ekstrakcie z *E. angustifolium* L. przed i po trawieniu *in vitro*. Oznaczenia wykonano przy użyciu wysokorozdzielczego spektrometru mas sprzężonego z wysokosprawnym chromatografem cieczowym (HPLC-ESI-Q-TOF-MS). SD – odchylenie standardowe; RSD – względne odchylenie standardowe wyników wyrażone w procentach.

Nazwa substancji	Przed trawieniem	SD	RSD	Po trawieniu	SD	RSD
Glukuronid kwercetyny	4,75316	0.09163	1.9	0,06274	0.00058	0.9
Guajaweryna (arabinofuranozyd kwercetyny)	0,71688	0.01206	1.7	0,02349	0.00004	0.2
Afzelina	1,11672	0.03015	2.7	0,02849	0.00062	2.2
Kwas neochlorogenowy	0,28796	0.00434	1.5	0,00370	0.00012	3.4
Glukozyd kemferolu	0,59884	0.06533	10.9	0,00252	0.00007	2.8
Kwas chlorogenowy	0,09889	0.00279	2.8	0,00239	0.00009	3.8
Izokwercetyna	0,44318	0.01478	3.3	0,00149	0.00013	8.8
Galusan hiperozydu	1,48623	0.02287	1.5	0,00236	0.00008	3.6

W badanym ekstrakcie nie stwierdziliśmy jednak obecności oenoteiny B, która jest charakterystycznym związkiem występującym w wierzbówce kiprzycy. Prawdopodobnie wynikało to z zastosowania ekstrakcji wodnej zamiast ekstrakcji z użyciem rozpuszczalników organicznych. Porównując te wyniki z naszymi poprzednimi badaniami, w których określiliśmy zawartość związków fenolowych w wodnym ekstrakcie przed trawieniem *in vitro*, odkryliśmy, że nastąpił spadek całkowitej zawartości tych związków po symulacji trawienia[83]. Podobnie, Dacrema i wsp. odnotowali spadek zawartości poszczególnych związków polifenolowych po trawieniu *in vitro*[84]. Ogółem w ekstraktach *E. angustifolium* odnotowano ponad 250 metabolitów wtórnych, zwłaszcza flawonoidów, elagotanin i kwasów fenolowych. Wierzbówka kiprzyca zawiera również lignany, triterpenoidy, steroidy, kwasy tłuszczowe, olejki eteryczne i alkaloidy[85]. To właśnie te związki odpowiadają za korzystne działanie *E. angustifolium*[86].

Liczne badania *in vivo* i *in vitro* wykazały, że kwercetyna wykazuje korzystne właściwości farmakologiczne, w tym działanie przeciwwirusowe, przeciwutleniające, przeciwnowotworowe, przeciwstarzeniowe i przeciwzapalne[87]. Mechanizm działania przeciwnowotworowego kwercetyny polega głównie na hamowaniu proliferacji komórek nowotworowych, indukowaniu apoptozy, indukowaniu autofagii komórek nowotworowych,

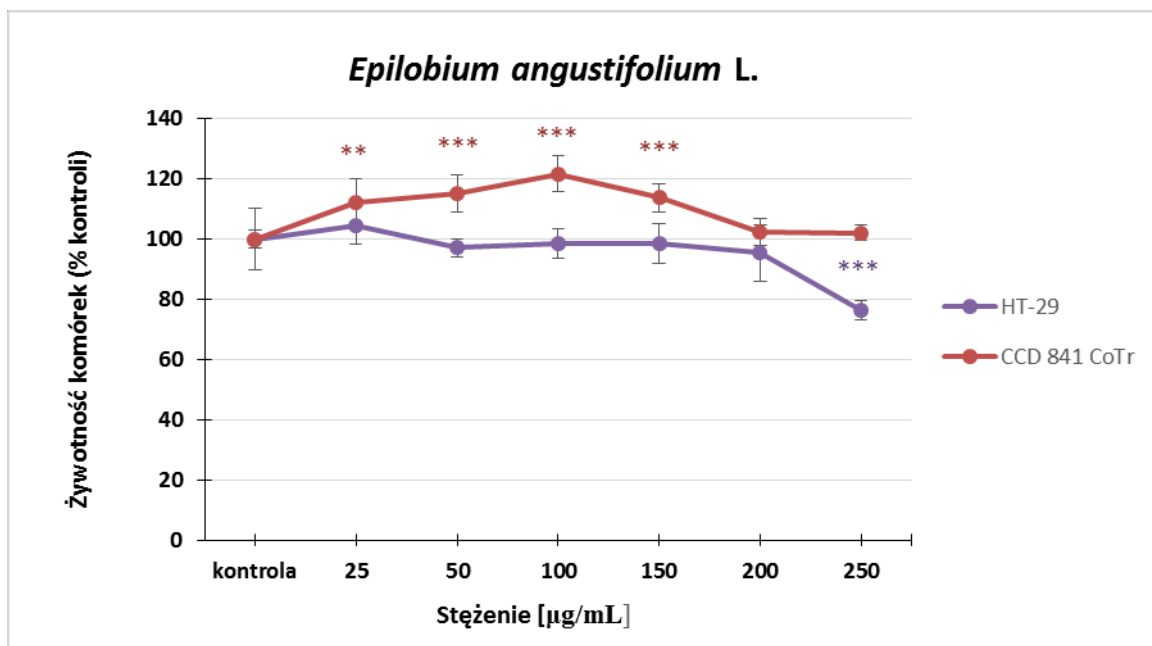
regulacji szlaków sygnałowych, hamowaniu inwazji i przerzutów, zwiększaniu wrażliwości na chemioterapię i odwracaniu lekooporności. Kwercetyna jest idealnym narzędziem terapeutycznym do chemoprewencji raka, w szczególności aktywując apoptozę komórek nowotworowych bez hamowania wzrostu komórek normalnych[88]. Kemferol to flawonoid, który również badano pod kątem jego potencjalnej roli zapobiegawczej w różnych chorobach, takich jak cukrzyca, otyłość, zapalenie stawów, osteoporoza i choroby skóry. Ponadto jego rola hepatoprotekcyjna, kardioprotekcyjna, neuroprotekcjna i gastroprotekcjna została potwierdzona dzięki właściwościom antyoksydacyjnym i przeciwzapalnym[51]. Kemferol ma potencjalne właściwości przeciwnowotworowe poprzez działanie na różne szlaki, takie jak hamowanie apoptozy, autofagii, zatrzymanie cyklu komórkowego. Związek ten zmniejsza żywotność, proliferację, a także migrację i inwazję komórek. Ponadto kemferol, w połączeniu z innymi związkami naturalnymi lub lekami, hamuje procesy chorobowe poprzez synergistyczne zwiększanie skuteczności leków, zmniejszanie żywotności komórek i modulację szlaków sygnalizacji komórkowej. Wykazano, że kemferol wykazuje zdolność do ograniczania oporności na antybiotyki u różnych patogenów poprzez zwiększenie skuteczności terapii przeciwbakteryjnej[89].

6.1.2 Badanie wpływu na żywotność i proliferację komórek

6.1.2.1 Metoda MTT

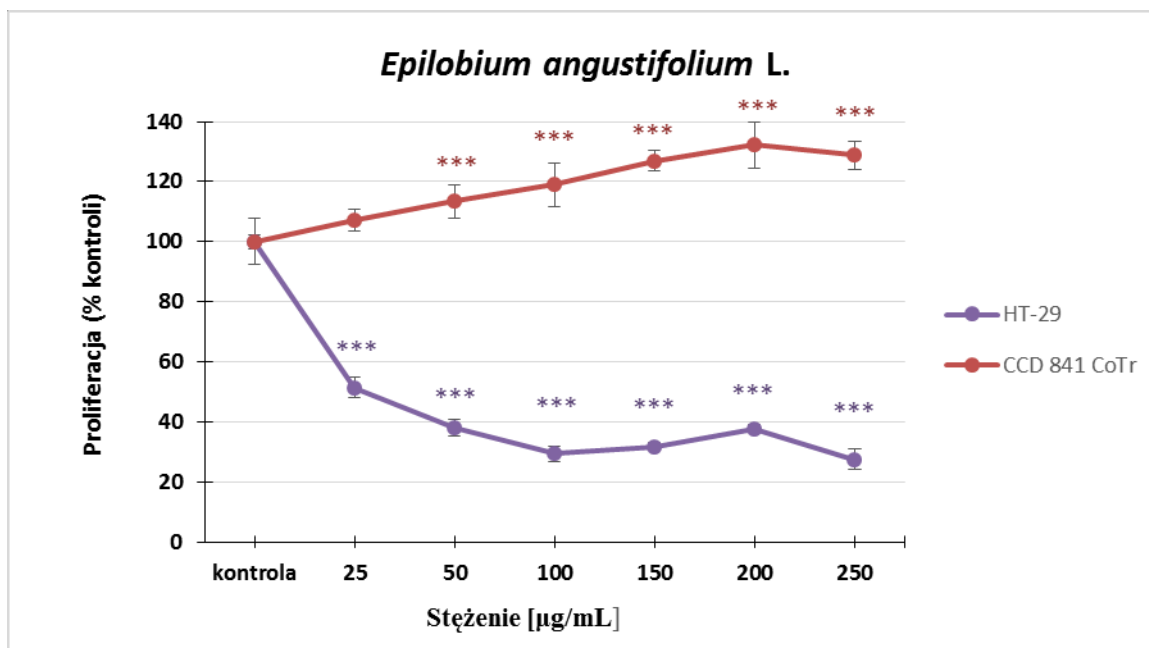
W doświadczeniu zbadano wpływ na zmiany żywotności i proliferacji komórek wodnego ekstraktu z wierzbówki kiprzycy na nowotworową (HT-29) oraz prawidłową linię komórkową (CCD 841 CoTr) w zakresie stężeń 25, 50, 100, 150, 200 i 250 µg/mL. W przypadku komórek CCD 841 CoTr zaobserwowano wzrost żywotności w zakresie stężeń 25–150 µg/ml, przy czym najwyższą wartość odnotowano dla stężenia 100 µg/mL. Dalsze zwiększanie stężenia ekstraktu do 200 i 250 µg/mL skutkowało obniżeniem żywotności komórek do poziomu porównywalnego z kontrolą. Zaobserwowany wzrost żywotności może wskazywać na zwiększoną aktywność metaboliczną komórek pod wpływem badanych stężeń. Wynik ten sugeruje brak działania cytotoksycznego oraz może świadczyć o stymulującym wpływie ekstraktu na metabolizm komórkowy.

W przypadku komórek HT-29 nie zaobserwowano istotnych zmian żywotności w zakresie stężeń 25–200 µg/mL w porównaniu z kontrolą. Jedynie przy najwyższym stężeniu ekstraktu stwierdzono wyraźny spadek żywotności komórek, wynoszący około 75% wartości kontrolnej.



Rycina 7. Wpływ ekstraktu z *Epilobium angustifolium* L. na żywotność komórek HT-29 i CCD 841 CoTr. Wyniki przedstawiono w porównaniu do kontroli (100% żywotności). * $p < 0,01$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$; jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA), test Dunnetta.

Analiza proliferacji komórek wykazała odmienną odpowiedź komórek nowotworowych HT-29 i prawidłowych komórek CCD 841 CoTr na działanie ekstraktu z wierzbówki kiprzycy. Różnice istotne statystycznie zaobserwowano dla obu linii komórkowych. Efekt był zależny od dawki. W przypadku komórek HT-29 zaobserwowano istotne zmniejszenie proliferacji już przy najniższym stężeniu. Wraz ze wzrostem stężenia efekt antyproliferacyjny utrzymywał się na zbliżonym poziomie, a proliferacja komórek wynosiła około 30–40% w porównaniu do kontroli. Odmienną zależność stwierdzono dla komórek CCD 841 CoTr, ponieważ ekstrakt z wierzbówki kiprzycy stymulował podziały prawidłowej linii komórkowej. Wraz ze wzrostem stężenia obserwowano wzrost proliferacji, osiągając poziom około 130% względem kontroli (stężenia 150–250 µg/mL).



Rycina 8. Wpływ ekstraktu z *Epilobium angustifolium* L. na proliferację komórek HT-29 i CCD 841 CoTr. Wyniki przedstawiono w porównaniu do kontroli (100% żywotności). * $p < 0,01$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$; jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA), test Dunnetta.

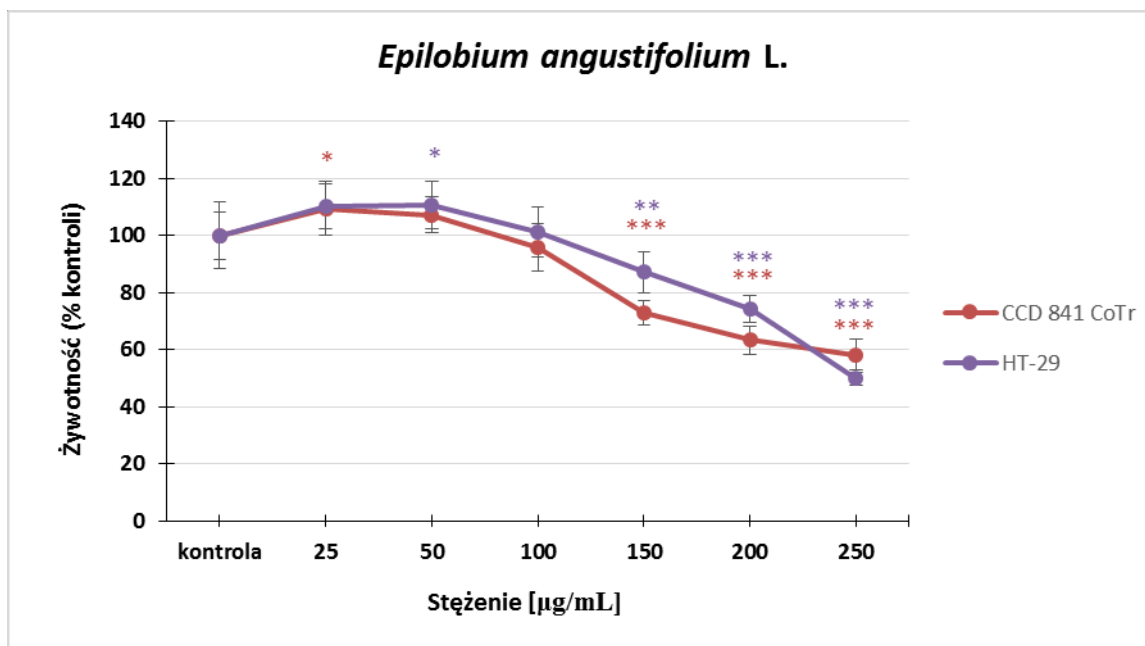
Uzyskane wyniki wskazują, że ekstrakt z wierzbówki kiprzycy wykazuje odmienne działanie wobec komórek prawidłowych i nowotworowych. W przypadku komórek HT-29 zaobserwowano wyraźne zahamowanie ich proliferacji. Sugeruje to, że ekstrakt nie powoduje bezpośredniej śmierci komórek nowotworowych, lecz ogranicza ich zdolność do podziałów. Natomiast w przypadku komórek CCD 841 CoTr wyniki testu żywotności, jak i proliferacji wskazują na korzystny wpływ ekstraktu. Wzrost żywotności i proliferacji tych komórek może świadczyć o stymulacji ich aktywności metabolicznej. Zdolności te mogą być związane z obecnością związków polifenolowych, którym przypisuje się działanie przeciwnowotworowe oraz ochronne wobec komórek prawidłowych.

6.1.2.2 Metoda wychwytu czerwieni obojętnej (test NR)

W doświadczeniu zbadano wpływ na zmiany żywotności komórek wodnego ekstraktu z wierzbówki kiprzycy na nowotworową (HT-29) oraz prawidłową linię komórkową (CCD 841 CoTr) w zakresie stężeń 25, 50, 100, 150, 200 i 250 µg/mL. Efekt działania ekstraktu był zależny od dawki dla obu linii. Żywotność komórek zmniejszyła się w ten sam sposób w komórkach HT-29 i CCD CoTr 841. Statystycznie istotne różnice w spadku żywotności można było zaobserwować przy stężeniu 150 µg/mL. Końcowe stężenie ekstraktu spowodowało spadek liczby żywych komórek do około 50% w porównaniu do kontroli w

przypadku obu linii. Uzyskane wyniki wskazują, że badany ekstrakt wykazuje działanie cytotoksyczne zarówno wobec komórek nowotworowych, jak i prawidłowych. W związku z tym na podstawie testu NR nie można jednoznacznie potwierdzić selektywnego działania przeciwnowotworowego ekstraktu.

Metody zastosowane do oceny cytotoksyczności wykazują różnice w wynikach. W metodzie NR spadek żywotności komórek obserwowano przy niższych stężeniach ekstraktu niż w teście MTT. Może to być spowodowane różnymi mechanizmami działania obu metod, ponieważ MTT ocenia aktywność dehydrogenaz mitochondrialnych, odzwierciedlając zachowaną aktywność metaboliczną komórek, natomiast test NR określa zdolność żywych komórek do wychwytywania i akumulacji czerwieni obojętnej w lizosomach, która zależy od prawidłowego funkcjonowania lizosomów oraz zachowania integralności błon komórkowych. Zaburzenia funkcji lizosomów mogą pojawiać się na wcześniejszym etapie uszkodzenia komórki niż spadek aktywności mitochondrialnej. W rezultacie komórki mogą wykazywać zmniejszoną zdolność do akumulacji czerwieni obojętnej, mimo zachowanej jeszcze aktywności metabolicznej ocenianej testem MTT. Uzyskane wyniki mogą wskazywać, że ekstrakt w pierwszej kolejności wpływa na integralność błon komórkowych i funkcjonowanie lizosomów, podczas gdy aktywność mitochondrialna pozostaje jeszcze zachowana. Różnice pomiędzy wynikami nie są spowodowane bezpośrednim oddziaływaniem ekstraktu z odczynnikami MTT, ponieważ w doświadczeniu uwzględniono kontrolę samego ekstraktu, a uzyskane wartości zostały skorygowane przez odjęcie tła.

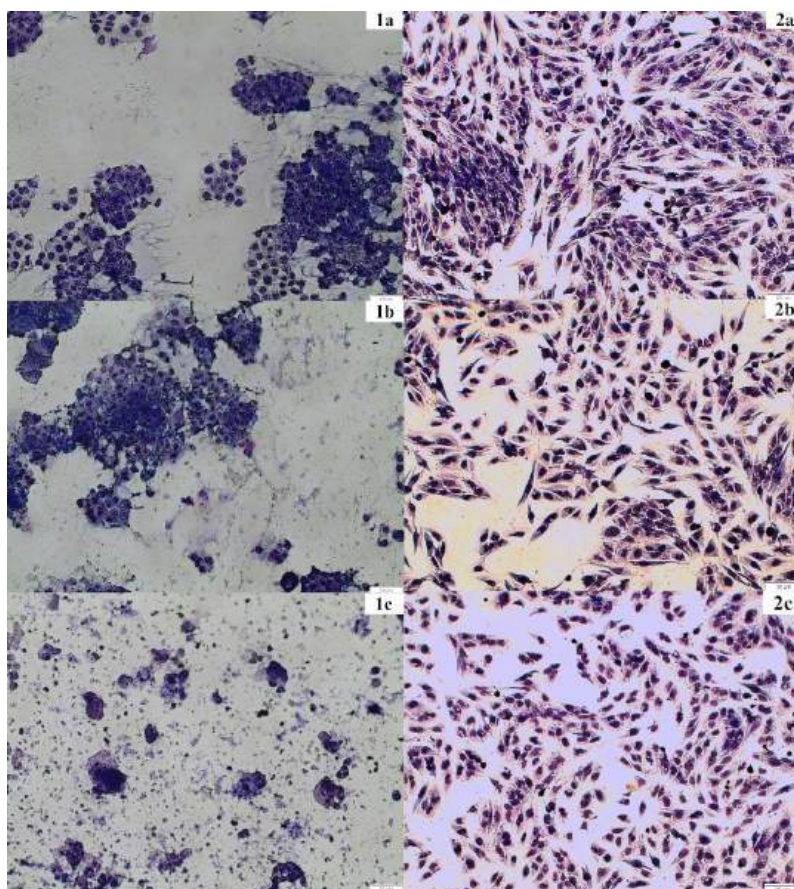


Rycina 9. Wpływ ekstraktu z *Epilobium angustifolium* L. na żywotność komórek HT-29 i CCD 841 CoTr. Wyniki przedstawiono w porównaniu do kontroli (100% żywotności). * $p < 0,01$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$; jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA), test Dunnetta.

6.1.3 Ocena zmian morfologicznych komórek

W celu potwierdzenia wyników uzyskanych w testach cytotoksyczności przeprowadzono ocenę zmian morfologicznych komórek. W badaniu komórki prawidłowej linii CCD 841 CoTr oraz nowotworowej linii HT-29 poddano inkubacji z ekstraktem z wierzbówki kiprzycy w stężeniach 100 i 250 µg/mL. Wybór stężeń 100 i 250 µg/mL był podyktowany wynikami wcześniejszych badań cytotoksyczności. Stężenie 100 µg/mL wybrano jako najniższe, przy którym obserwowano wyraźny wpływ ekstraktu na badane komórki, natomiast stężenie 250 µg/mL odpowiadało najwyższemu badanemu stężeniu, przy którym efekt działania ekstraktu był najbardziej nasilony. W przypadku linii HT-29 zarówno w kontroli, jak i w stężeniu 100 µg/mL obserwowano liczne komórki tworzące monowarstwę, z wyraźnie widoczną cytoplazmą oraz jądrami komórkowymi. Natomiast stężenia 250 µg/mL liczba komórek uległa znacznemu zmniejszeniu, a ciągłość monowarstwy została zaburzona. Dodatkowo zaobserwowano zmiany morfologiczne komórek, co utrudniało rozróżnienie struktur komórkowych. W przypadku komórek CCD 841 CoTr morfologia komórek po inkubacji z ekstraktem była zbliżona do obserwowanej w grupie kontrolnej. Nie zaobserwowano wyraźnych zmian świadczących o uszkodzeniu komórek. Widoczne były charakterystyczne komórki o wrzecionowatym kształcie, z dobrze

rozdzielalną cytoplazmą i jądrami komórkowymi. Przy wyższym stężeniu ekstraktu zaobserwowano jednak zmniejszenie liczby komórek.



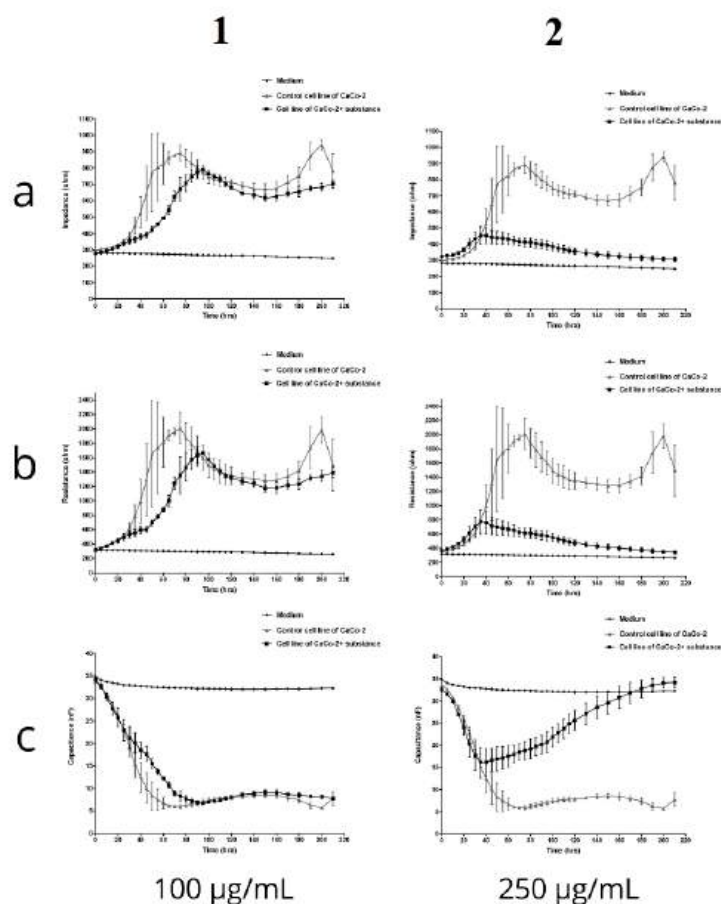
Rycina 10. Zmiany morfologii oraz liczby komórek HT-29 i CCD 841 CoTr pod wpływem ekstraktu z wierzbowki kiprzycy. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego MOTIC serii AE31E przy powiększeniu 100×. a1 – kontrola, HT-29; a2 – 100 µg/mL, HT-29; a3 – 250 µg/mL, HT-29; b1 – kontrola, CCD 841 CoTr; b2– 100 µg/mL, CCD 841 CoTr; b3 – 250 µg/mL, CCD 841 CoTr.

Dotychczas przeprowadzono stosunkowo niewiele badań oceniających przeciwnowotworową aktywność ekstraktów z gatunków rodzaju *Epilobium* z wykorzystaniem linii komórkowych. Dostępne doniesienia wskazują jednak, że ekstrakty te wykazują potencjał antyproliferacyjny i proapoptotyczny wobec wybranych typów nowotworów. Hatefi Kia i wsp. (2020) wykazali, że ekstrakt metanolowy z *Epilobium parviflorum* zmniejszał żywotność komórek MCF-7 w sposób zależny od dawki [90]. Aydin Akbudak i wsp. (2021) ocenili przeciwnowotworową aktywność wodnych i etanolowych ekstraktów z *Epilobium parviflorum* wobec komórek linii HT-29. Oba rodzaje ekstraktów zmniejszały żywotność komórek. Analiza ekspresji genów wykazała zwiększoną ekspresję genów związanych z apoptozą. Natomiast takie same stężenia ekstraktów nie wywierały istotnego działania cytotoksycznego na prawidłowe ludzkie fibroblasty linii BJ[91].

Stolarczyk i wsp. (2013) zaobserwowali, że ekstrakty z gatunków rodzaju *Epilobium*, a także ich metabolity, w tym urolityny, hamują proliferację hormonozależnych komórek raka prostaty linii LNCaP oraz ograniczają wydzielanie PSA[92]. Perużyńska i wsp. (2023) ocenili właściwości antyproliferacyjne ekstraktu etanolowego z *E. angustifolium* wobec normalnych ludzkich fibroblastów oraz wybranych linii komórek nowotworowych, w tym czerniaka, piersi, okrężnicy, płuc i wątroby. Linia komórkowa raka jelita grubego wykazała najwyższą wrażliwość na testowany ekstrakt roślinny [58]. Uogintaite i wsp. (2025) badali wpływ wodnych ekstraktów z wierzbówki koprzycey oraz oenoteiny B na komórki Caco-2, wykazując istotne zmniejszenie ich żywotności oraz zaburzenie funkcji mitochondriów [54].

6.1.4 Metoda ECIS (Electric Cell-Substrate Impedance Sensing)

Metoda ta służy do oceny zmian morfologicznych komórek. Pod wpływem badanych substancji dochodzi do zmian w metabolizmie i funkcjonowaniu komórek, co bezpośrednio przekłada się na zmiany wartości impedancji, oporności i pojemności elektrycznej. W przeprowadzonym doświadczeniu komórki Caco-2 inkubowano ekstraktem z wierzbówki koprzycey w stężeniach: 25, 50, 100, 150, 200 oraz 250 µg/mL. Zmiany impedancji, oporności i pojemności monitorowano przez 200 godzin. Przez cały okres trwania eksperymentu nie wymieniano podłoża hodowlanego, a warunki środowiskowe i parametry pomiarowe utrzymywano na stałym poziomie. Na wykresach przedstawiono stężenia, dla których zaobserwowano największe różnice w analizowanych parametrach.



Rycina 11. Zmiany impedancji, oporności i pojemności elektrycznej komórek Caco-2 po inkubacji z ekstraktem z wierzbowki kiprzyicy: (a1) – impedancja, (b1) – oporność, (c1) – pojemność elektryczna dla stężenia 100 µg/mL; (a2) – impedancja, (b2) – oporność, (c2) – pojemność elektryczna dla stężenia 250 µg/mL. Doświadczenie przeprowadzono z wykorzystaniem systemu ECIS (Electric Cell-substrate Impedance Sensing).

Przy stężeniu 100 µg/mL wartości impedancji i oporności są niższe od kontroli, jednak przez większość czasu utrzymują się na stosunkowo wysokim poziomie. Jednocześnie przebieg pojemności elektrycznej jest zbliżony do kontroli. Może to wskazywać, że ekstrakt wpływa na właściwości warstwy komórkowej, jednak nie powoduje istotnego uszkodzenia monowarstwy. Natomiast przy stężeniu 250 µg/mL obserwuje się znacznie niższe wartości impedancji i oporności w porównaniu z kontrolą. Pojemność elektryczna komórek pozostaje wyraźnie podwyższona względem kontroli. Taki profil zmian jest charakterystyczny dla osłabienia przylegania komórek do podłoża, zaburzenia integralności monowarstwy oraz pogorszenia funkcji barierowej komórek. Może to wskazywać na zależny od stężenia wpływ ekstraktu na właściwości morfologiczne, adhezyjne i funkcjonalne komórek. Im wyższe było stężenie ekstraktu, tym bardziej wyraźne były zmiany parametrów elektrycznych. Linia

Caco-2 jest powszechnie stosowanym modelem bariery nabłonka jelitowego. Uzyskane wyniki odzwierciedlają wpływ ekstraktu na właściwości bariery jelitowej.

Według naszej wiedzy niniejsze badanie należy do pierwszych prac kompleksowo oceniających wpływ ekstraktu z wierzbowki kiprzycy po symulowanym trawieniu *in vitro* na ludzkie linie komórkowe raka jelita grubego, co podkreśla nowatorski charakter przedstawionych badań. Analiza aktywności biologicznej po trawieniu *in vitro* z wykorzystaniem modeli komórkowych pozwala na dokładniejszy obraz działania ekstraktów po spożyciu, ponieważ takie podejście dokładniej odzwierciedla rzeczywiste środowisko ludzkiego organizmu.

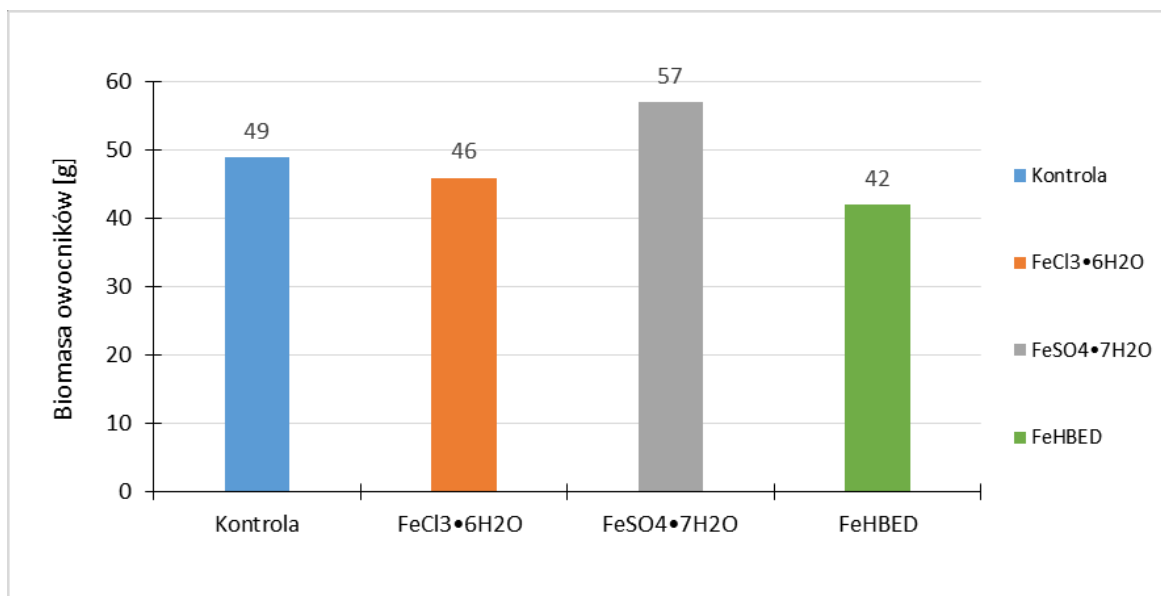
6.2 Soplówka jeżowata

6.2.1 Morfologia i biomasa owocników

Zdjęcie przedstawia hodowlę *Hericium erinaceus*. Każda torebka zawierała inny wariant eksperymentalny związany z dodatkiem różnych form żelaza. W ocenie makroskopowej próbek nie zaobserwowano istotnych różnic w porównaniu z grupą kontrolną. Jednak pod względem biomasy zaobserwowano różnice w wariancie z $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, gdzie wzrost grzyba był większy w porównaniu do kontroli oraz w wariancie z FeHBED, gdzie wzrost był słabszy niż w próbie kontrolnej.



Rycina 12. Makroskopowa charakterystyka owocników kontrolnych (a) oraz owocników hodowanych na podłożach wzbogaconych w $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (b), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (c) i FeHBED (d) w stężeniu 10 mM.



Rycina 13. Biomasa owocników w wariancie kontrolnym (a) oraz owocników hodowanych na podłożu wzbogaconym w FeCl₃·6H₂O (b), FeSO₄·7H₂O (c) i FeHBED (d) w stężeniu 10 mM.

Oczywiste jest, że nadmiar lub niedobór różnych pierwiastków wpływa na zdrowie człowieka. Jest to uwarunkowane wchłanianiem, procesami fizjologicznymi oraz metabolizmem. Żelazo odpowiada za wiele istotnych funkcji w organizmie człowieka, w tym transport tlenu, syntezę kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) i transport elektronów. Żelazo może tworzyć wolne rodniki, dlatego jego stężenie w tkankach musi być ściśle kontrolowane. Nadmiar żelaza może skutkować stresem oksydacyjnym i uszkodzeniem struktur tkankowych. Fe jest pierwiastkiem powszechnie występującym na Ziemi, jednak jego biodostępność jest niska. Wynika to z faktu, że żelazo tworzy tlenki, które są nierozpuszczalne i dlatego nie są łatwo dostępne dla organizmów żywych. Głównymi inhibitorami wchłaniania żelaza są kwas fitynowy, wapń i peptydy z częściowo strawionych białek. Czynnikiem wspomagającym jest kwas askorbinowy[93]. Niedokrwistość z niedoboru żelaza (IDA) dotyka znaczną część populacji w wielu krajach. Zapotrzebowanie na żelazo nie jest zaspokajane z powodu niskiego wchłaniania żelaza, niewystarczającego spożycia i słabej biodostępności. Biofortyfikacja jest jedną z prób podniesienia poziomu żelaza[94]. Sopłówka jeżowata została wykorzystana w badaniach nad biofortyfikacją. Do tej pory nie opublikowano jeszcze prac dotyczących biofortyfikacji tego gatunku żelazem. W literaturze dostępne są natomiast badania poświęcone wzbogacaniu *H. erinaceus* w lit oraz selen. Rzymski i wsp. (2017) ocenili wzrost, akumulację minerałów i skład pierwiastkowy sopłówki jeżowatej uprawianej na podłożach wzbogaconych w lit. Suplementacja litu nie wpłynęła znacząco na biomase, morfologię, kształt ani wielkość owocników, niezależnie od zastosowanego stężenia Li. Ponadto nie zaobserwowano

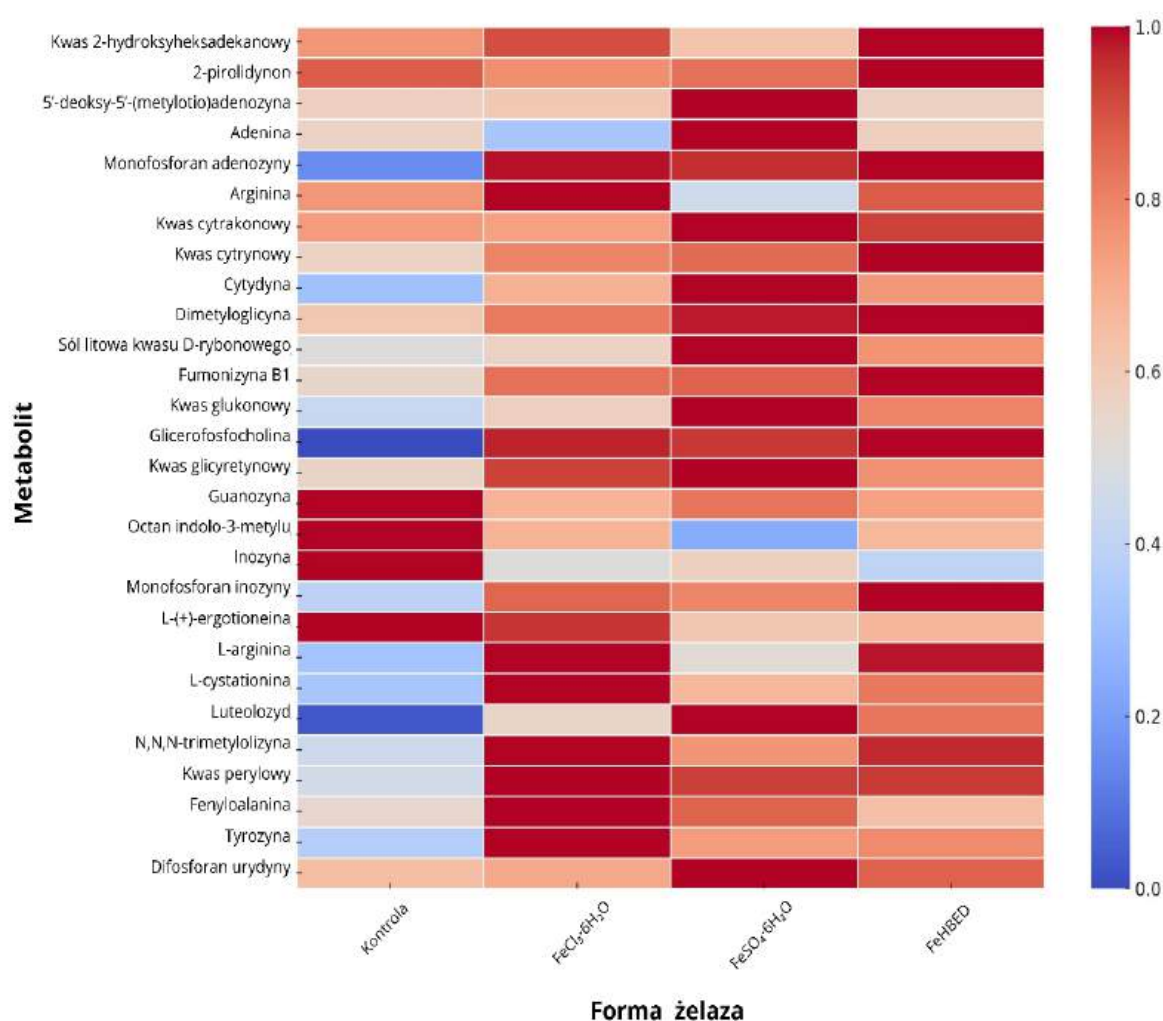
istotnych zmian w ogólnym profilu mineralnym; jednakże zaobserwowano zależne od stężenia pobieranie i akumulację litu w owocnikach. Wyniki te sugerują, że *H. erinaceus* jest obiecującym kandydatem do dalszych badań nad żywnością funkcjonalną wzbogaconą w lit, szczególnie w odniesieniu do biodostępności litu z matrycy grzybowej, oceny bezpieczeństwa stosowania, aktywności biologicznej w eksperymentalnych modelach zwierzęcych oraz potencjalnych zastosowań klinicznych u ludzi [95]. Egressy-Molnár i wsp. (2016) badali wzbogacanie w selen. Doszli do wniosku, że *H. erinaceus* uprawiany w podłożu zawierającym selenit może służyć jako alternatywne źródło suplementacji selenem. Wykryto wysokie poziomy Se-metioniny (Se-Met) i Se- metyloselenocysteiny (MSC) [96]. Hu i wsp. (2020) doszli do wniosku, że wzrost *H. erinaceus* jest bardziej podatny na działanie Se-metioniny (SeMet) niż na selenian i selenit. Około połowa selenu z owocników wzbogaconych w Se została uwolniona podczas trawienia żołądkowo-jelitowego *in vitro*. Ponadto suplementacja selenem zaburza akumulację innych pierwiastków śladowych w *H. erinaceus*[97]. Niedzielski i wsp. (2014) zaobserwowali, że dodatek soli selenu do podłoża hodowlanego indukował makroskopowe zmiany w owocnikach grzybów. Stężenia selenu przekraczające 0,4 mM prowadziły do zmniejszenia liczby owocników lub ich całkowitego braku. Ponadto odnotowano zmiany w zabarwieniu[98]. Jozífek i wsp. (2025) badali pobieranie selenu przez soplówkę jeżowatą uprawianą na różnych podłożach oraz ich wpływ na wzrost i plonowanie[99].

6.2.2 Metabolom

W przeprowadzonym badaniu dodatek różnych form żelaza spowodował istotne zmiany w poziomie 28 z 115 analizowanych metabolitów *Hericium erinaceus*. Wyniki wskazują, że biofortyfikacja różnymi formami żelaza może wpływać na przemiany metaboliczne *Hericium erinaceus*, jednak kierunek i zakres tych zmian zależą od zastosowanej formy chemicznej żelaza[100]. Rycina przedstawia wyniki dla kontroli oraz zmiany poziomu metabolitów wywołane biofortyfikacją z wykorzystaniem trzech różnych związków żelaza. Wartości zaznaczone na czerwono wskazują na istotne różnice w porównaniu z kontrolą. Można zauważyć, że poziomy metabolitów są zwiększone, a inne zmniejszone w zależności od użytego związku żelaza. W przypadku $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ zaobserwowano silny wzrost cytrynianu, który jest kluczowym produktem pośrednim cyklu Krebsa, odpowiedzialnym za produkcję ATP w mitochondriach[101]; spadek metabolizmu nukleotydów – adeniny, guanozyny i inozyny, co może wskazywać na potencjalne zmniejszenie puli nukleotydów niezbędnych do replikacji i naprawy DNA; zwiększone

poziomy aminokwasów – argininy, fenyloalaniny i tyrozyny; umiarkowaną aktywację metylacji oraz stres oksydacyjny – spadek L-ergotioneiny. Fe^{3+} aktywuje metabolizm energetyczny, ale także promuje reakcje Fentona-Habera-Weissa, generując wolne rodniki i zwiększając stres oksydacyjny, który może hamować enzymy biorące udział w syntezie DNA[102]. W $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, forma Fe^{2+} skutecznie promuje metabolizm energetyczny poprzez zwiększanie poziomów cytrynianu i cytrakonianu, co wskazuje na przyspieszony przepływ substratu przez cykl Krebsa. Równoległy wzrost stężenia AMP i IMP sugeruje stymulację szlaków syntezy nukleotydów, które promują procesy biosyntezy i proliferację komórek [103]. Natomiast wariant z FeHBED wykazał najsilniejszy wzrost metabolizmu energetycznego – cytrynianu, IMP, glicerofosfocholiny i ochrony antyoksydacyjnej – L-cystioniny[104]. We wszystkich wariantach zaobserwowano spadek stężenia L-ergotioneiny, silnego przeciwutleniacza występującego w grzybach, który chroni białka i lipidy przed utlenianiem[105]. Może to być spowodowane zwiększonym stresem oksydacyjnym w obecności żelaza[106]. Natomiast poziomy L-cystioniny wzrosły we wszystkich formach żelaza. Oznacza to, że każda forma żelaza stymuluje metabolizm siarki, promując syntezę cysteiny i glutationu, co pomaga chronić przed stresem oksydacyjnym. Może to być mechanizm kompensacyjny w odpowiedzi na spadek ergotioneiny[107].

Podsumowując, biofortyfikacja żelazem różnorodnie wpływa na metabolizm soplówki jeżowatej, modulując szlaki związane z metabolizmem energii, stresem oksydacyjnym i adaptacją, biosyntezą białek i aminokwasów, ochroną i detoksykacją, metabolizmem lipidów i fuzją błon komórkowych. Każda forma żelaza generuje unikalny profil metaboliczny, który należy uwzględnić przy planowaniu strategii poprawy wartości odżywczej grzybów.



Rycina 14. Profil metabolitów w kontroli oraz w owocnikach rosnących na podłożach wzbogaconych w 10 mM FeCl₃·6H₂O, FeSO₄·7H₂O i FeHBED.

6.2.3 Zawartość wybranych pierwiastków

Tabela 6 prezentuje wyniki oznaczeń zawartości poszczególnych pierwiastków w zależności od formy żelaza zastosowanej podczas procesu biofortyfikacji. Zastosowanie FeCl₃·6H₂O znacząco zwiększyło zawartość żelaza, miedzi i cynku, jednocześnie powodując wyraźny spadek zawartości sodu. Dodatek FeSO₄·7H₂O spowodował największy wzrost zawartości wapnia, jednocześnie obniżając zawartość żelaza i sodu. Natomiast w przypadku FeHBED zaobserwowano wzrost zawartości wapnia i sodu, przy jednoczesnym spadku poziomu żelaza. Biofortyfikacja nie wpłynęła na poziom pierwiastków takich jak magnez, mangan i potas. Można zaobserwować, że zmiana formy żelaza wpływa również na inne minerały, co może wynikać z mechanizmów konkurencji o miejsca wiązania, transportery lub zmian pH środowiska. Analiza przedstawionych danych wskazuje, że wpływ biofortyfikacji na zawartość żelaza zależy od zastosowanej formy

chemicznej. W badanych warunkach jedynie $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ prowadził do zwiększenia zawartości żelaza w owocnikach, natomiast w przypadku $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ oraz FeHBED stwierdzono niższą zawartość tego pierwiastka niż w próbie kontrolnej. Ze względu na ograniczoną literaturę dotyczącą biofortyfikacji grzybów różnymi formami żelaza, trudno jest bezpośrednio porównać uzyskane wyniki z wynikami innych badań. Jednakże badania roślin wyraźnie wykazały, że forma żelaza obecna w podłożu hodowlanym znacząco wpływa na jego akumulację. W badaniu na *Sorbus commixta* wykazano, że zarówno źródło żelaza (FeSO_4 , Fe-EDTA i Fe-DTPA), jak i pH podłoża wpływają na wzrost i rozwój roślin[108]. W roślinach żelazo i cynk oddziałują na siebie w ten sposób, że podwyższony poziom Fe zmniejsza dostępność Zn, podczas gdy w warunkach niskiego poziomu Fe występuje zwiększona ekspresja transporterów, które wychwytyują Zn[109]. Żelazo i miedź wykorzystują częściowo wspólne mechanizmy transportu w obrębie systemu korzeniowego, dlatego wyższe dawki żelaza mogą hamować pobieranie miedzi przez rośliny [107]. Istotne zmiany w zawartości Ca, Cu i Na w przypadku *Hericium eurinaceus* mogą wynikać z różnych mechanizmów. Jednym z nich jest konkurencja i interakcja między kationami a systemami wychwytywania metali. Miedź odgrywa istotną rolę w procesie pobierania żelaza przez grzyby, ponieważ stanowi kofaktor oksydaz niezbędnych do jego transportu. W związku z tym zmiany dostępności żelaza mogą prowadzić do zaburzeń homeostazy miedzi[110]. Forma chemiczna zastosowanego żelaza wpływa na aktywność wolnych jonów, właściwości redoks oraz procesy kompleksowania w podłożu, co z kolei determinuje dostępność metali [111]. Ponadto zastosowanie różnych soli żelaza może prowadzić do zmian pH podłoża, siły jonowej oraz dostępności innych składników mineralnych. Zmiany tych właściwości fizykochemicznych mogą wpływać na uwalnianie jonów z matrycy podłoża, a w konsekwencji na ich pobieranie i akumulację w owocnikach[112]. Zawartość sodu jest regulowana przez grzybowe pompy $\text{Na}^+/\text{ATPazy}$ i antyportery; duże zmiany w zewnętrznym składzie jonowym lub pH mogą zmieniać dynamikę odpływu/napływu Na^+ [113]. Interesującym wynikiem było stwierdzenie niższej zawartości Fe w owocnikach biofortyfikowanych z zastosowaniem $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ oraz FeHBED w porównaniu z próbą kontrolną, co wskazuje, że obecność dodatkowego żelaza w podłożu nie musi prowadzić do zwiększonej akumulacji tego pierwiastka w owocnikach. W przypadku $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ jony Fe^{2+} mogą ulegać szybkiemu utlenieniu do słabo rozpuszczalnych form żelaza, ograniczając ich dostępność dla grzybnicy. Z kolei FeHBED tworzy stabilne kompleksy z jonami Fe^{3+} , co również może wpływać na dostępność żelaza do pobierania przez grzyb. Ponadto organizmy grzybowe posiadają mechanizmy regulujące pobieranie, transport i magazynowanie żelaza,

których aktywacja może ograniczać jego nadmierną akumulację w odpowiedzi na zwiększoną dostępność tego pierwiastka. Uzyskane wyniki sugerują, że obserwowane zmniejszenie zawartości Fe w wariantach $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i FeHBED może wynikać zarówno z ograniczonej biodostępności tych form żelaza w podłożu, jak i z mechanizmów regulujących pobieranie oraz transport żelaza przez grzyb. Przedstawione mechanizmy mają charakter hipotetyczny i wymagają potwierdzenia w dalszych badaniach.

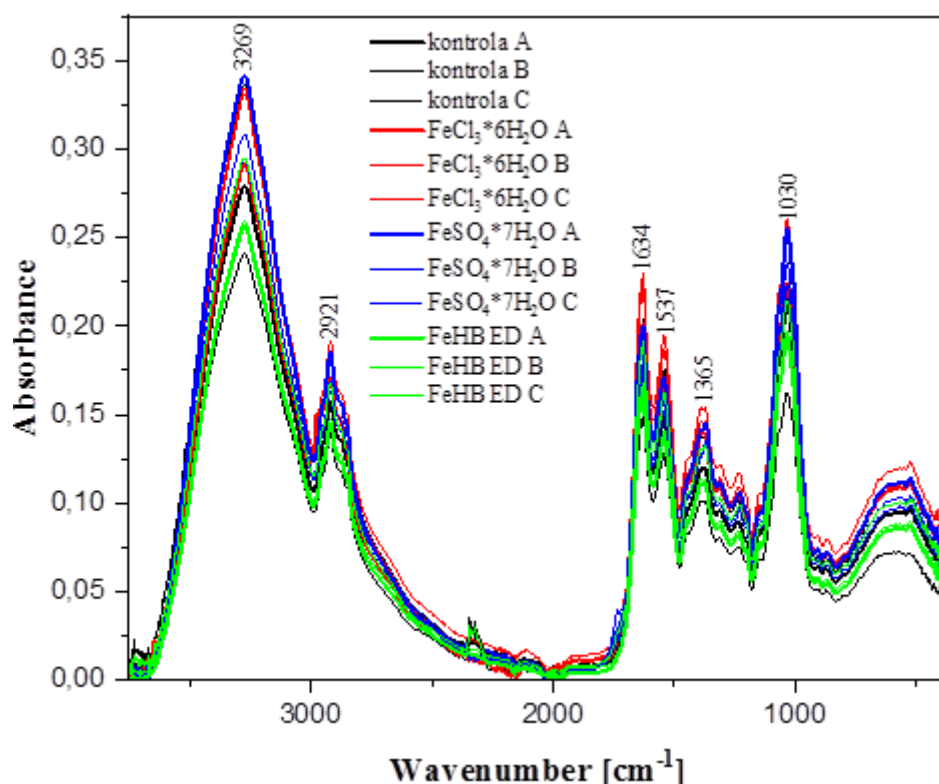
Tabela 6. Zawartość wybranych pierwiastków (mg/kg suchej masy) w owocnikach *H. erinaceus*. Litery a–d w obrębie tej samej kolumny oznaczają istotne statystycznie różnice ($p < 0,05$) pomiędzy badanymi wariantami, określone na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), a następnie testu post hoc Tukeya. Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie statystycznie, natomiast wartości oznaczone różnymi literami wykazują istotne różnice przy poziomie ufności 95%.

Wariant	Fe	Mg	Zn	Ca	K	Na	Cu	Mn
Kontrola	136.43±	1172.55±	114.45±	350.53±	35174.09±	199.51±	29.41±	19.47±
	13.64b	58.63a	8.58b	42.06b	1406.96a	23.94b	3.53b	1.95b
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	197.04±	1184.81±	147.26±	440.32±	35843.60±	20.38±	47.67±	21.78±
	19.70a	59.24a	11.04a	52.84b	1433.74a	2.45c	5.72a	2.18a
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	65.99±	1079.40±	117.46±	1298.59±	35770.26±	129.37±	26.47±	16.00±
	6.60d	53.97b	8.81b	155.83a	1430.81a	15.52b	3.18b	1.60c
FeHBED	100.25±	1118.44±	120.81±	556.94±	34513.58±	286.09±	27.39±	17.65±
	10.03c	55.92ab	9.06b	66.83b	1380.54a	34.33a	3.29b	1.76bc

6.2.4 Charakterystyka chemiczna próbek metodą FTIR

Porównano widma FTIR kontroli i wszystkich trzech wariantów żelaza wybranych do biofortyfikacji soplówki jeżowatej. Szczególną uwagę zwrócono na zmiany pasm absorpcyjnych w zakresie $3000\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$, obejmującym drgania grup $-\text{OH}$ i $-\text{NH}$, drgania rozciągające wiązania C-H , drgania grup karbonylowych oraz innych grup funkcyjnych występujących w tzw. obszarze „odcisku palca”. Analiza porównawcza widm wykazała, że dodatki soli żelaza wpłynęły na układ grup funkcyjnych próbek, przy czym charakter zmian zależał od formy dodanego żelaza. Spośród badanych form żelaza $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ wywołał najbardziej wyraźne zmiany w widmach FTIR, wskazujące na intensywną koordynację jonów żelaza z grupami karboksylowymi oraz zmniejszenie liczby wolnych grup hydroksylowych ($-\text{OH}$). Uzyskane wyniki sugerują, że jony Fe mogą tworzyć mostki koordynacyjne pomiędzy różnymi cząsteczkami, prowadząc do zmian w strukturze badanego materiału. Ponadto FeCl_3 może częściowo degradować składniki białka. Zmiany

te wskazują na modyfikację składu chemicznego: konwersję grup -COOH do grup -COO-Fe i możliwe usieciowanie matrycy organicznej przez Fe^{3+} . $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ wywołuje podobne, lecz łagodniejsze efekty. Zaobserwowano również powstawanie wiązań Fe-karboksyłowych i spadek intensywności grup -OH, ale zmiany te były mniej wyraźne niż w przypadku FeCl_3 . Zaobserwowane zmiany mogą świadczyć o słabszym kompleksowaniu jonów żelaza. Brak wyraźnych oddziaływań z grupami amidowymi sugeruje, że zastosowana forma żelaza w niewielkim stopniu wpływa na strukturę lub skład białek. Ogólnie rzecz biorąc, FeSO_4 wpłynął głównie na grupy karboksylowe, ale nie zmienił drastycznie innych elementów próbki. FeHBED wywoływał odmienny efekt w porównaniu z pozostałymi zastosowanymi formami żelaza. Nie modyfikuje on bezpośrednio grup funkcyjnych próbek, lecz wprowadza własne sygnały do widma. Nie zaobserwowano istotnych zmian w położeniu pasm charakterystycznych dla grup -OH, C=O, C-H oraz grup amidowych. Pojawienie się silnych pasm karboksylanowych wskazuje na obecność chelatu w próbce. Oznacza to, że dodatek FeHBED nie wpłynął na skład chemiczny próbek. Brak przesunięć charakterystycznych pasm FTIR może wskazywać, że FeHBED nie tworzył silnych oddziaływań z grupami funkcyjnymi badanego materiału, pozostając w postaci odrębnej fazy w próbce. Nieorganiczne sole żelaza(III) i żelaza(II) integrują się z istniejącą strukturą próbki poprzez tworzenie wiązań koordynacyjnych pomiędzy jonami Fe^{3+} i Fe^{2+} a grupami karboksylowymi obecnymi w materiale, podczas gdy kompleks FeHBED działa głównie jako dodatkowy składnik, nie zakłócając znacząco pierwotnych grup funkcyjnych. Analiza widm FTIR pozwoliła określić charakter oddziaływań pomiędzy zastosowanymi formami żelaza a składnikami badanego materiału, wskazując na różnice w mechanizmie ich wiązania. W przypadku soli nastąpiła modyfikacja chemiczna, natomiast w przypadku chelatu nastąpiło głównie fizyczne wprowadzenie nowego związku bez silnej interakcji chemicznej ze składnikami próbki.



Rycina 15. Widma absorpcyjne FTIR *Hericium erinaceus* z kontroli oraz próbek poddanych biofortyfikacji na podłożach wzbogaconych w $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i FeHBED o stężeniu 10 mM.

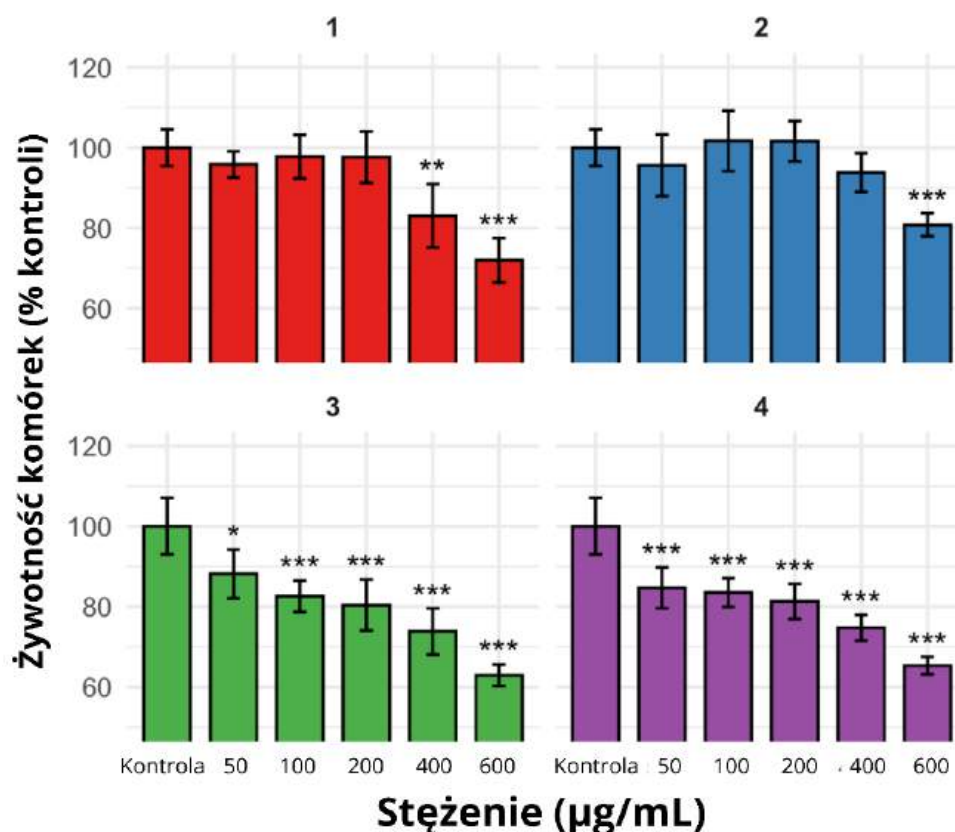
6.2.5 Mapowanie rozkładu pierwiastków metodą EDS

Pierwiastkami, które zostały zidentyfikowane zarówno w kontroli jak i we wszystkich trzech wariantach biofortyfikacji są C, O, Mg, K, P i S. Dodatkowo w próbce $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ zidentyfikowano Ca i Na, natomiast w próbce FeHBED wykryto Si. Brak sygnału Fe w analizie EDS nie musi świadczyć o nieobecności tego pierwiastka w badanym materiale. Najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem są ograniczenia czułości metody EDS, która jest znacznie mniej czuła od metod ilościowych. Ponadto analiza EDS obejmuje jedynie lokalny obszar próbki, a niejednorodny rozkład żelaza oraz jego niskie stężenie mogły uniemożliwić jego detekcję.

6.2.6 Badanie wpływu na żywotność komórek metodą MTT

W przeprowadzonym eksperymencie badano żywotność nowotworowej linii komórkowej HT-29 poddanej działaniu ekstraktów biofortyfikowanych trzema formami żelaza oraz trawieniu *in vitro*. Zakres badanych stężeń: 50, 100, 200, 400 i 600 $\mu\text{g/mL}$. Analiza cytotoksyczności wykazała, że wszystkie badane ekstrakty wpływały na żywotność

komórek w sposób zależny od stężenia; jednak zarówno charakter, jak i nasilenie tego efektu różniły się w zależności od zastosowanej formy żelaza. Niebiofortyfikowany ekstrakt z *Hericium erinaceus* wykazywał umiarkowaną cytotoksyczność, przy czym wyraźny spadek żywotności komórek obserwowano głównie przy wyższych stężeniach (400–600 µg/mL). Natomiast ekstrakt poddany biofortyfikacji za pomocą $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ wykazywał porównywalną lub nawet wyższą żywotność komórek niż próbka niepoddana biofortyfikacji, co wskazuje na brak działania cytotoksycznego na badane komórki. Biofortyfikacja za pomocą $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ spowodowała bardziej wyraźne działanie cytotoksyczne, charakteryzujące się stopniowym, zależnym od dawki spadkiem żywotności komórek. Najbardziej znaczące zmiany zaobserwowano w przypadku ekstraktu wzbogaconego FeHBED, który wykazywał najsilniejszą aktywność cytotoksyczną spośród wszystkich badanych wariantów. Istotne statystycznie obniżenie żywotności komórek było widoczne już przy najniższym badanym stężeniu, a efekt ten nasilał się wraz ze wzrostem stężenia, osiągając najniższe wartości przy najwyższych dawkach. Wyniki te wskazują, że wpływ biofortyfikacji na aktywność cytotoksyczną ekstraktu zależy od zastosowanej formy żelaza. Najsilniejsze działanie obserwowano dla ekstraktu biofortyfikowanego FeHBED, natomiast $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ wykazywał umiarkowane zwiększenie cytotoksyczności. Z kolei $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ nie zwiększał cytotoksyczności w porównaniu z ekstraktem niepoddanym biofortyfikacji.



Rycina 16. Wpływ ekstraktów z *Hericium erinaceus* na żywotność komórek HT-29 po 24 godzinach inkubacji, ocenioną za pomocą testu MTT. Ekstrakty otrzymane z owocników biofortyfikowanych trzema formami żelaza: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3) oraz FeHBED (4) porównano z ekstraktem uzyskanym z niebiofortyfikowanych owocników (niepoddanych działaniu żadnej formy żelaza) (1). Wyniki przedstawiono jako procent wartości kontrolnej (100% żywotności). Istotność statystyczną oznaczono następująco: * $p < 0,01$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$; jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) z testem post hoc Tukeya.

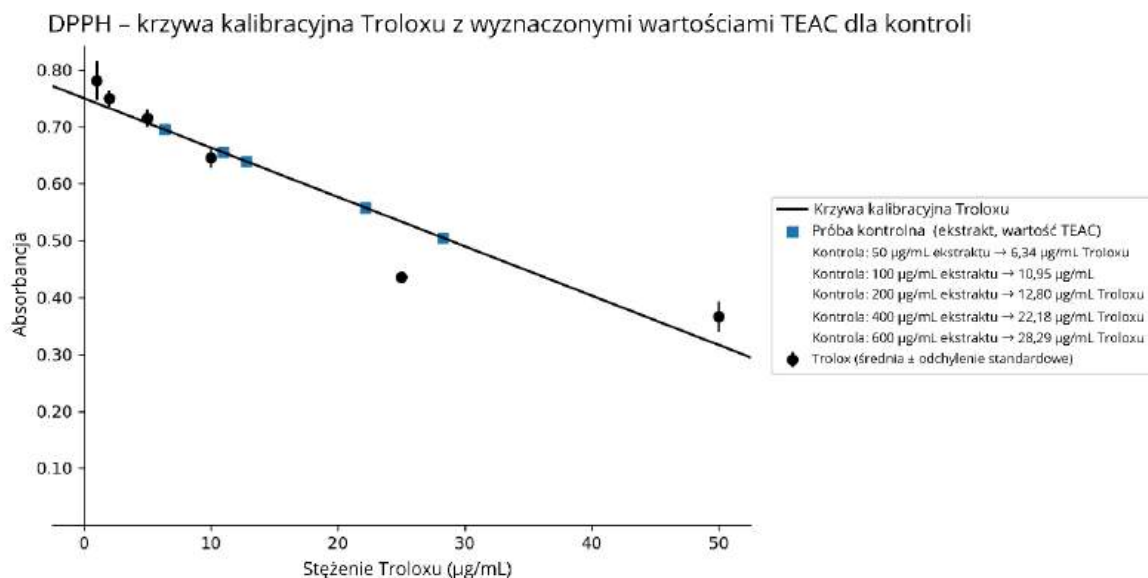
Jest to pierwsze badanie porównujące różne związki żelaza zastosowane do biofortyfikacji soplówki jeżowatej w kontekście badań nad rakiem jelita grubego, podkreślające kluczową rolę form chemicznych żelaza w kształtowaniu odpowiedzi biologicznej. Należy zauważyć, że ekstrakty te zostały dodatkowo poddane trawieniu *in vitro*, aby lepiej odzwierciedlić ich działanie w organizmie człowieka. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami wskazującymi, że *H. erinaceus* wykazuje właściwości przeciwnowotworowe, głównie poprzez mechanizmy związane ze stresem oksydacyjnym i apoptozą [68]. Cytotoksyczność badanych ekstraktów była zależna od stężenia, co potwierdzają wcześniejsze badania opisujące zależne od dawki działanie antyproliferacyjne związków bioaktywnych pochodzenia grzybowego [114]. Istotną obserwacją jest jednak zwiększona cytotoksyczność ekstraktu wzbogaconego w FeHBED, który powodował

znaczące obniżenie żywotności komórek nawet przy niskich stężeniach. Efekt ten można przypisać zwiększonej biodostępności żelaza i jego skuteczniejszemu dostarczaniu do komórki, co jest charakterystyczne dla form chelatowanych. Związki kompleksowe mogą utrzymywać żelazo w postaci rozpuszczalnej i biodostępnej, ułatwiając jego transport do komórek. Po uwolnieniu żelaza z kompleksu może dojść do zwiększenia puli wewnątrzkomórkowego żelaza labilnego, które odgrywa kluczową rolę w generowaniu stresu oksydacyjnego [115]. Wyższą cytotoksyczność FeHBED w porównaniu z FeSO_4 i FeCl_3 można wyjaśnić odmiennym sposobem transportu co może prowadzić do nasilenia stresu oksydacyjnego [116]. FeCl_3 dostarcza jonów Fe^{3+} , które charakteryzują się mniejszą biodostępnością ze względu na szybką hydrolizę i tendencję do tworzenia słabo rozpuszczalnych form. W konsekwencji może to ograniczać pobieranie żelaza przez komórki oraz osłabiać jego efekty biologiczne. Wyniki te podkreślają, że nie tylko obecność żelaza, ale także jego postać chemiczna ma decydujący wpływ na efekty biologiczne [117]. Nie można wykluczyć, że zwiększona aktywność przeciwnowotworowa ekstraktu wzbogaconego FeHBED jest wynikiem nie tylko zastosowania tej formy żelaza, ale również synergii pomiędzy biodostępnym żelazem, a zmianami w składzie bioaktywnych metabolitów grzybów. Nasze wcześniejsze badania wykazały, że FeHBED znacząco zmienia profil metaboliczny *H. erinaceus*. Proces trawienia *in vitro* prawdopodobnie prowadzi do uwolnienia unikalnego profilu biodostępnych związków, które w połączeniu z żelazem dostarczanym w postaci kompleksu FeHBED skuteczniej modulują szlaki onkogenne niż nieorganiczne formy żelaza. Obserwowane efekty są najprawdopodobniej wynikiem złożonej interakcji pomiędzy formą chemiczną żelaza, a zmianami w składzie metabolitów wtórnych grzybów [118]. Związki te wykazują działanie przeciwutleniające i przeciwnowotworowe, mogą wywoływać stres oksydacyjny, apoptozę oraz zatrzymanie cyklu komórkowego w komórkach nowotworowych [59].

6.2.7 Ocena aktywności przeciwutleniającej metodą DPPH

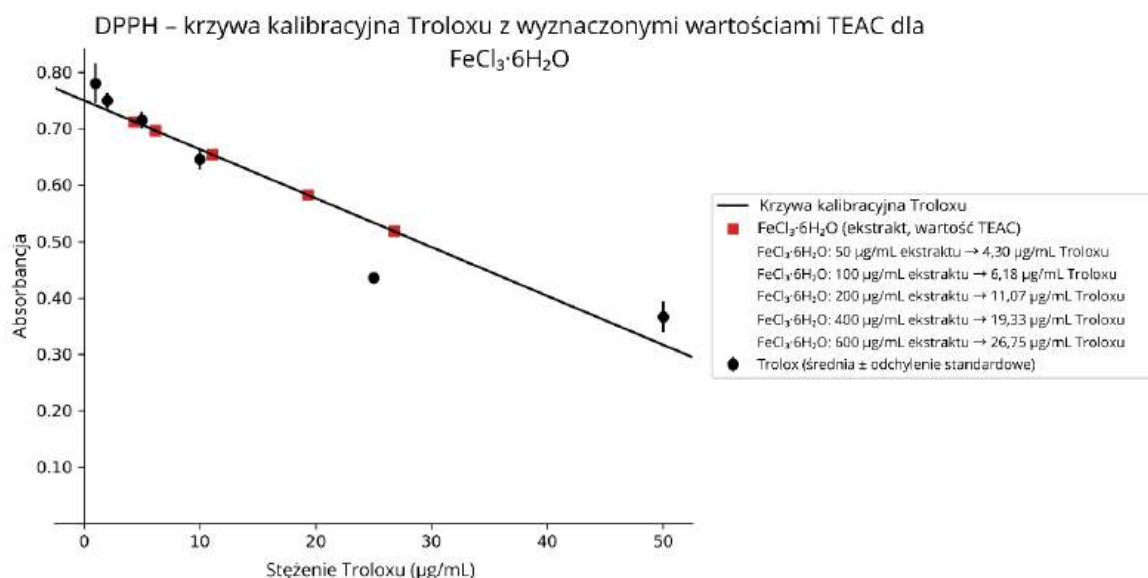
Właściwości przeciwutleniające ekstraktów z soplówki jeżowatej oceniono metodą DPPH, a wyniki wyrażono jako równoważnik zdolności przeciwutleniającej Troloxu (TEAC). Zarówno ekstrakt z niebiofortyfikowanych owocników, jak i ekstrakty uzyskane z owocników biofortyfikowanych wykazywały zależną od stężenia aktywność przeciwutleniającą w zakresie stężeń 50–600 $\mu\text{g/mL}$, co potwierdzał wzrost wartości TEAC wraz ze zwiększaniem stężenia ekstraktu. Ekstrakt niewzbogacony wykazał najwyższą

aktywność przeciwutleniającą spośród analizowanych próbek, osiągając wartość TEAC równą 28,29 $\mu\text{g TE/mL}$ przy stężeniu ekstraktu wynoszącym 600 $\mu\text{g/mL}$.



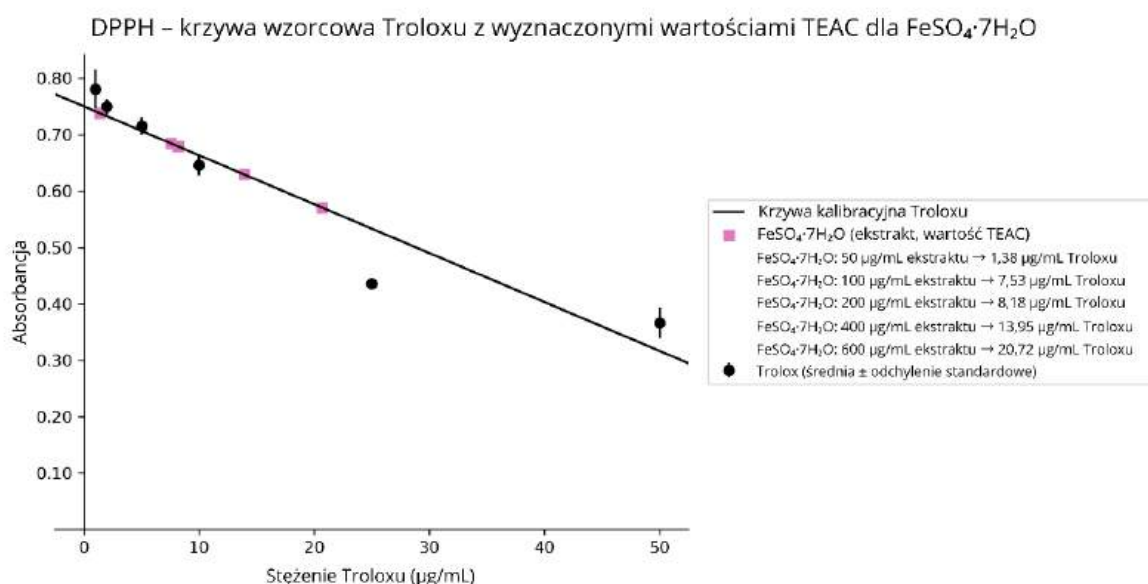
Rycina 17. Aktywność przeciwutleniająca ekstraktu z *Hericum eurinaceus* niepoddanego biofortyfikacji żelazem, oznaczona metodą DPPH i wyrażona jako równoważniki Troloxu ($\mu\text{g TE/mL}$).

W przypadku biofortyfikacji za pomocą $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ wartości TEAC była nieco niższa w porównaniu z ekstraktem niepoddanym biofortyfikacji. Aktywność przeciwutleniająca wzrosła z 4,30 $\mu\text{g TE/mL}$ (przy stężeniu ekstraktu 50 $\mu\text{g/mL}$) do 26,75 $\mu\text{g TE/mL}$ (przy stężeniu ekstraktu 600 $\mu\text{g/mL}$).



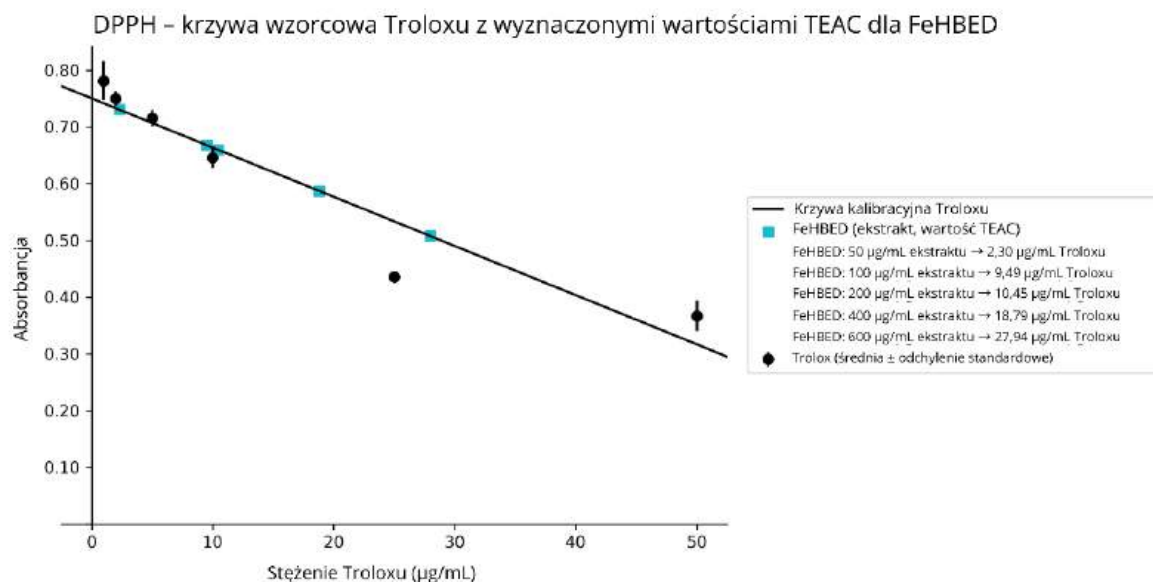
Rycina 18. Aktywność przeciwutleniająca ekstraktu z *Hericum erinaceus* biofortyfikowanego $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, oznaczona metodą DPPH i wyrażona jako równoważniki Troloxu (µg TE/mL).

Natomiast ekstrakt wzbogacony $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ wykazał najniższą zdolność do wychwytywania rodników spośród badanych wariantów, osiągając maksymalną wartość 20,72 µg TE/mL przy stężeniu ekstraktu wynoszącym 600 µg/mL.



Rycina 19. Aktywność przeciwutleniająca ekstraktu z *Hericum erinaceus* biofortyfikowanego $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, oznaczona metodą DPPH i wyrażona jako równoważniki Troloxu (µg TE/mL).

Porównywalną aktywność przeciwutleniającą do ekstraktu z niebiofortyfikowanych owocników wykazywał ekstrakt z owocników wzbogaconych w FeHBED. W najwyższym badanym stężeniu osiągnął on 27,94 $\mu\text{g TE/mL}$, wykazując niemal identyczne działanie jak kontrola.



Rycina 20. Aktywność przeciwutleniająca ekstraktu z *Hericium erinaceus* biofortyfikowanego FeHBED, oznaczona metodą DPPH i wyrażona jako równoważniki Troloxu ($\mu\text{g TE/mL}$).

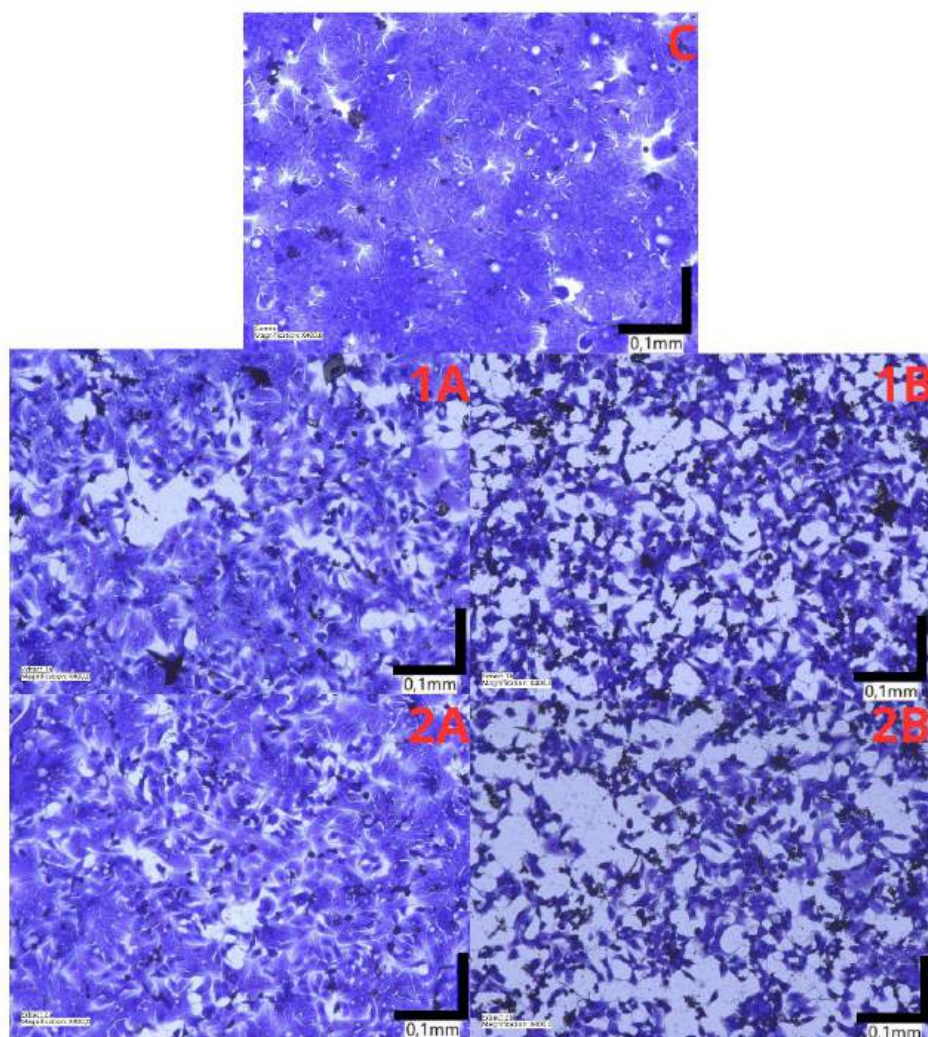
Ogólnie wszystkie analizowane ekstrakty wykazywały wyraźną, zależną od stężenia aktywność przeciwutleniającą oraz podobny przebieg odpowiedzi w całym badanym zakresie stężeń. Najwyższą aktywność zaobserwowano dla ekstraktu z niebiofortyfikowanych owocników oraz ekstraktu z owocników wzbogaconych w FeHBED, natomiast biofortyfikacja z zastosowaniem $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ wiązała się ze stosunkowo niższą skutecznością zmiatania wolnych rodników.

Chociaż wyniki metody DPPH wskazują na wysoki potencjał zmiatania wolnych rodników przez ekstrakt wzbogacony FeHBED w układzie bezkomórkowym, należy podkreślić, że metoda DPPH nie odzwierciedla złożonych procesów redoks zachodzących w komórkach. W związku z tym uzyskanych wyników nie można bezpośrednio interpretować jako dowodu działania przeciwutleniającego lub prooksydacyjnego w warunkach komórkowych. W złożonym środowisku komórki nowotworowej obecność żelaza o wysokiej biodostępności może zmienić rolę tych związków z przeciwutleniaczy na prooksydanty, potencjalnie napędzając reakcję Fentona i generując reaktywne formy tlenu.

Dlatego obserwowane w teście DPPH właściwości przeciwutleniające należy interpretować jako wskaźnik potencjału chemicznego ekstraktu, natomiast ich znaczenie biologiczne wymaga potwierdzenia w badaniach komórkowych [119]. Żelazo jest niezbędnym kofaktorem w licznych reakcjach redoks i może sprzyjać wytwarzaniu reaktywnych form tlenu poprzez reakcje typu Fentona, które katalizują przemianę nadtlenu wodoru w wysoce reaktywne rodniki hydroksylowe[120]. Wynikający z tego wzrost poziomu ROS może przyczyniać się do stresu komórkowego i stabilizacji HIF-1 α , co z kolei stymuluje transkrypcję VEGFA. Mechanizm ten mógłby wyjaśniać jednoczesną obserwację zwiększonej ekspresji VEGFA i zmniejszonej proliferacji komórek HT-29 [115,121]. Jest to jedna z możliwych interpretacji uzyskanych wyników i nie wynika bezpośrednio z oznaczenia DPPH, lecz z aktualnej wiedzy dotyczącej biologicznej roli żelaza i stresu oksydacyjnego.

6.2.8 Ocena zmian morfologicznych komórek

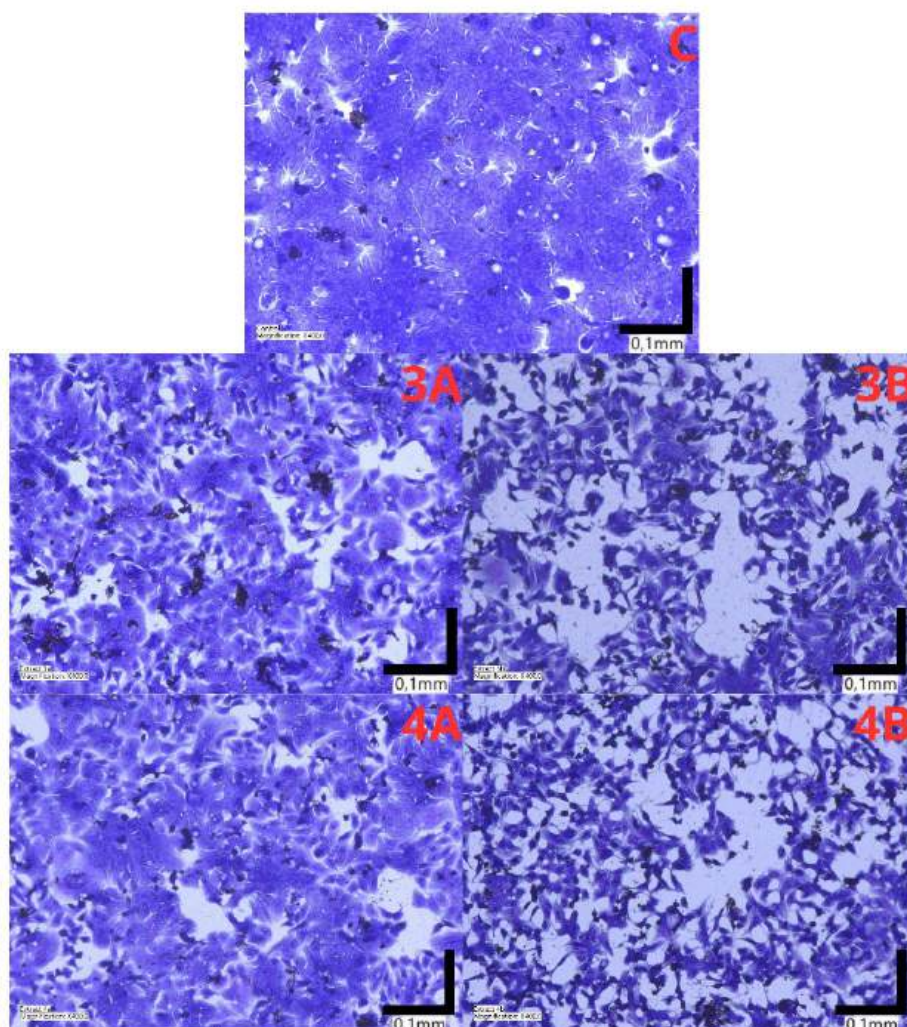
W celu potwierdzenia wyników uzyskanych w testach cytotoksyczności przeprowadzono ocenę zmian morfologicznych komórek. W badaniu komórki nowotworowej linii HT-29 poddano inkubacji z ekstraktami z soplówki jeżowatej w stężeniach 400 i 600 $\mu\text{g/mL}$. Wybór stężeń był podyktowany wynikami wcześniejszych badań cytotoksyczności, ponieważ w tym zakresie stężeń ekstrakty powodowały najwyższy spadek żywotności. Po zastosowaniu niebiofortyfikowanego ekstraktu w stężeniu 400 $\mu\text{g/mL}$ zaobserwowano umiarkowane zmiany morfologiczne, obejmujące niewielkie zmniejszenie gęstości komórek oraz wczesne oznaki obkurczenia cytoplazmy. Przy stężeniu 600 $\mu\text{g/mL}$ zaobserwowano bardziej wyraźne zmiany, takie jak zmniejszenie konfluencji, częściową utratę adhezji do podłoża oraz obecność komórek z zagęszczoną cytoplazmą. Komórki poddane działaniu ekstraktu wzbogaconego w $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ wykazywały umiarkowane cechy cytotoksyczności, szczególnie przy stężeniu 600 $\mu\text{g/mL}$, obejmujące zmniejszenie liczby komórek, zwiększenie przestrzeni międzykomórkowych oraz zmiany morfologiczne sugerujące występowanie wczesnych zmian apoptotycznych.



Rycina 21. Zmiany morfologii oraz liczby komórek HT-29 po ekspozycji na ekstrakty z *Hericium erinaceus*. Obrazy uzyskano z wykorzystaniem mikroskopu KEYENCE VHX-X1 przy powiększeniu 400×. C – kontrola; 1a – ekstrakt z niebiofortyfikowanych owocników, 400 µg/mL; 1b – ekstrakt z niebiofortyfikowanych owocników, 600 µg/mL; 2a – ekstrakt z owocników wzbogaconych w $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 400 µg/mL; 2b – ekstrakt z owocników wzbogaconych w $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 600 µg/mL.

Bardziej wyraźne działanie cytotoksyczne zaobserwowano po podaniu ekstraktów wzbogaconych $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i FeHBED . Przy stężeniu 400 µg/mL widoczne było znaczne zmniejszenie gęstości komórek oraz zaburzenie struktury monowarstwy. Przy stężeniu 600 µg/mL komórki wykazywały charakterystyczną morfologię przypominającą apoptozę, w tym kurczenie się komórek, kondensację chromatyny, utratę adhezji oraz fragmentację

monowarstwy komórkowej, co wskazuje na wzmocnioną aktywność antyproliferacyjną i proapoptotyczną.



Rycina 22. Zmiany morfologii oraz liczby komórek HT-29 po ekspozycji na ekstrakty z *Hericium erinaceus*. Obrazy uzyskano z wykorzystaniem mikroskopu KEYENCE VHX-X1 przy powiększeniu 400×. C – kontrola; 3a – ekstrakt z owocników wzbogaconych w $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 400 $\mu\text{g/mL}$; 3b – ekstrakt z owocników wzbogaconych w $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 600 $\mu\text{g/mL}$; 4a – ekstrakt z owocników wzbogaconych w FeHBED, 400 $\mu\text{g/mL}$; 4b – ekstrakt z owocników wzbogaconych w FeHBED, 600 $\mu\text{g/mL}$.

Ogólnie rzecz biorąc, barwienie potwierdziło, że biofortyfikacja żelazem, zwłaszcza formami $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i FeHBED nasila cytotoksyczne i morfologiczne skutki działania na komórki HT-29 w porównaniu z wariantami niewzbogaconymi lub poddanymi działaniu $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Oprócz obserwacji jakościowych, ilościowa analiza obrazu wykazała znaczące, zależne od stężenia zmniejszenie gęstości komórek. W przypadku ekstraktu

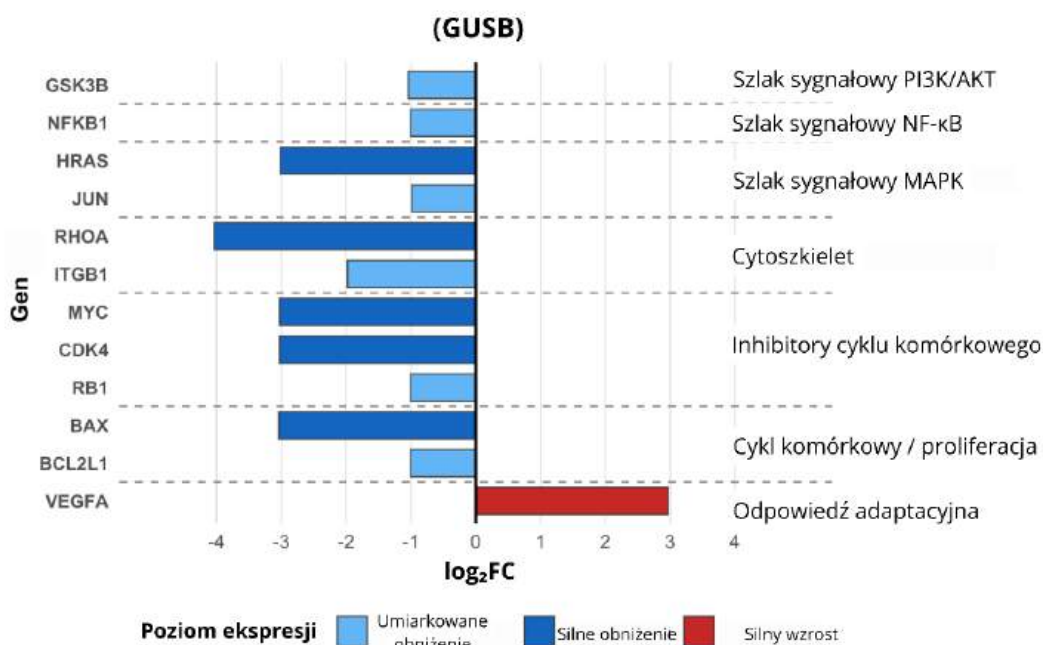
wzbogaconego FeHBED w stężeniu 600 µg/mL liczba komórek przylegających zmniejszyła się o 71% w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast odsetek komórek wykazujących wyraźne cechy podobne do apoptozy osiągnął 46%. Dane ilościowe dostarczają statystycznego potwierdzenia dla lepszego działania antyproliferacyjnego wariantu żelaza chelatowanego, zaobserwowanego w testach morfologicznych i cytotoksyczności.

Analiza morfologiczna wskazuje na aktywację mechanizmów śmierci komórkowej, których przebieg może być związany ze stresem oksydacyjnym. Charakterystycznymi cechami apoptozy są kurczenie się komórek, kondensacja chromatyny oraz utrata adhezji. Badania wskazują, że *H. erinaceus* indukuje apoptozę poprzez aktywację mitochondrialnego szlaku zależnego od reaktywnych form tlenu [114]. Zależność cytotoksyczności od postaci żelaza sugeruje również potencjalną rolę mechanizmów śmierci komórkowej zależnych od żelaza, takich jak ferroptaza. Zwiększona dostępność aktywnego żelaza, szczególnie w przypadku FeHBED, może sprzyjać peroksydacji lipidów i aktywacji szlaków ferroptotycznych, co potwierdzają badania wykazujące, że suplementacja żelaza nasila ferroptozę w komórkach nowotworowych [122]. Ponieważ jednak w niniejszym badaniu nie oceniano swoistych markerów ferroptozy, takich jak ekspresja GPX4, poziom lipidowych reaktywnych form tlenu (lipid ROS) czy produktów peroksydacji lipidów (MDA, 4-HNE), udział ferroptozy pozostaje hipotezą wymagającą dalszej weryfikacji eksperymentalnej. Na obecnym etapie uzyskane wyniki wskazują przede wszystkim na aktywację mechanizmów zgodnych z apoptozą, którym towarzyszy selektywna modulacja ekspresji genów związanych z procesem nowotworzenia [123].

6.2.9 Ekspresja genów związanych z rakiem jelita grubego

Do analizy ekspresji genów wybrano ekstrakt wzbogacony FeHBED w stężeniu 600 µg/ml, ponieważ wywołał on maksymalną reakcję biologiczną zarówno w testach cytotoksyczności, jak i morfologicznych. Zastosowanie najwyższego badanego stężenia umożliwiło identyfikację zmian ekspresji genów związanych z najsilniejszą obserwowaną odpowiedzią komórkową. Analiza ekspresji genów przeprowadzona metodą RT-qPCR wykazała, że podawanie ekstraktu z *H. erinaceus* wzbogaconego FeHBED (600 µg/mL) spowodowała znaczące zmiany w poziomach ekspresji wybranych genów. Poziom ekspresji genów przedstawiono jako log₂ zmiany ekspresji (log₂FC) względem komórek kontrolnych po normalizacji do genu referencyjnego GUSB. Łącznie przeanalizowano ekspresję 92 mRNA związanych z molekularnymi szlakami sygnałowymi zaangażowanymi w rozwój

nowotworów u człowieka, zarówno w próbach kontrolnych, jak i poddanych działaniu badanego ekstraktu.



Rycina 23. Ekspresja genów ($\log_2FC$) w komórkach poddanych działaniu ekstraktu z *Hericium erinaceus* wzbogaconego w FeHBED (600 $\mu\text{g/mL}$), oznaczona metodą RT-qPCR i znormalizowana względem genu referencyjnego GUSB. Kolorystyka przedstawia stopień regulacji ekspresji zgodnie z wcześniej zdefiniowanymi progami wartości $\log_2FC$. Spośród pierwotnie analizowanego panelu 92 genów do dalszej analizy wybrano 12 genów na podstawie określonych kryteriów jakościowych oraz ich znaczenia biologicznego. Geny, dla których nie wykryto ekspresji, oraz geny o wartości Ct przekraczającej 37 na dowolnym etapie analizy, zostały wykluczone w celu zapewnienia wiarygodności wyników. Spośród pozostałych genów wytypowano te wykazujące najbardziej istotne zmiany ekspresji względem grupy kontrolnej. Ostatecznie do analizy wybrano 12 genów charakteryzujących się największymi i biologicznie najbardziej istotnymi zmianami ekspresji.

Do szczegółowej analizy wybrano geny na podstawie wielkości zmian ich ekspresji ($\log_2FC \geq 0,5$). Spośród trzech genów referencyjnych (GAPDH, HPRT1 i GUSB) jako najbardziej odpowiedni wybrano GUSB, ze względu na najmniejszą zmienność pomiędzy badanymi wariantami, potwierdzoną najniższymi wartościami odchylenia standardowego Ct. Najsilniejszy wzrost ekspresji zaobserwowano dla genu VEGFA ($\log_2FC = 2,97$), co wskazuje na znaczące zwiększenie poziomu jego transkrypcji po zastosowaniu badanego ekstraktu. Umiarkowane obniżenie ekspresji ($\log_2FC$ od $-0,5$ do $-1,5$) stwierdzono dla genów JUN, RB1, NFKB1, BCL2L1 oraz GSK3B. Silniejszy spadek poziomu mRNA

(log₂FC od -1,5 do -2,99) odnotowano dla genu ITGB1 (log₂FC = -1,98). Najbardziej wyraźne obniżenie ekspresji (log₂FC < -3) wykazano natomiast dla genów HRAS, MYC, CDK4, BAX oraz RHOA.

Uzyskane wyniki sugerują, że ekstrakt z soplówki jeżowatej wzbogacony FeHBED może indukować skoordynowaną odpowiedź komórkową obejmującą hamowanie proliferacji i przebiegu cyklu komórkowego, modulację szlaków sygnałowych związanych z przeżyciem komórek i odpowiedzią zapalną oraz zmniejszenie potencjału migracyjnego. Jednocześnie zaobserwowano zmiany w ekspresji genów związanych z odpowiedzią na stres. Uzyskane wyniki wskazują, że ekstrakt może wykazywać potencjalne właściwości przeciwnowotworowe, jednak obserwowane zmiany dotyczą poziomu ekspresji mRNA i wymagają potwierdzenia na poziomie białkowym oraz w innych modelach komórkowych. Wyniki ekspresji genów związanych z rakiem jelita grubego wykazały obniżony poziom transkryptów kilku kluczowych regulatorów cyklu komórkowego i sygnalizacji onkogennej, w tym genów HRAS, MYC i CDK4. HRAS jest protoonkogenem należącym do rodziny RAS, który aktywuje główne szlaki proliferacyjne, takie jak MAPK/ERK i PI3K/AKT, niezbędne do wzrostu i przeżycia komórek nowotworowych. W związku z tym obniżona ekspresja HRAS może wskazywać na zahamowanie kaskad sygnałowych związanych z proliferacją[124]. Podobnie czynnik transkrypcyjny MYC, jeden z najważniejszych czynników napędzających proliferację komórek nowotworowych i przeprogramowanie metaboliczne, również wykazywał obniżoną ekspresję, co może być związane z działaniem antyproliferacyjnym [125]. Ponadto obniżona ekspresja genu CDK4, kodującego kluczową kinazę zależną od cykliny, kontrolującą przejście z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego, może sugerować możliwość indukcji zatrzymania cyklu komórkowego i wywierać działanie cytostatyczne w komórkach HT-29[126]. Działaniu hamującemu proliferację komórek nowotworowych towarzyszyły zmiany w genach związanych z migracją komórek i potencjałem inwazyjnym. Co istotne, zaobserwowano znaczące obniżenie ekspresji genów RHOA i ITGB1. Gen RHOA odgrywa kluczową rolę w organizacji cytoszkieletu i regulacji ruchliwości komórek, natomiast integryna β 1 (ITGB1) pośredniczy w adhezji do macierzy pozakomórkowej i przyczynia się do inwazji komórek nowotworowych oraz powstawania przerzutów[127]. Hamowanie ekspresji tych genów może zatem wskazywać, że biofortyfikowany ekstrakt z grzybów może nie tylko ograniczać proliferację komórek, ale również zmniejszać ich zdolność migracji i inwazyjności. Co ciekawe, pomimo ogólnego działania antyproliferacyjnego, zaobserwowano zwiększoną ekspresję VEGFA. W komórkach raka jelita grubego aktywacja osi sygnałowej HIF-1 α -VEGFA stanowi dobrze

znaną reakcję na stres metaboliczny[128]. Komórki HT-29 są szczególnie wrażliwe na zaburzenia metaboliczne, a zwiększoną ekspresję VEGFA często opisywano po ekspozycji na bioaktywne związki pochodzenia roślinnego lub grzybowego, które wywołują stres oksydacyjny lub dysfunkcję mitochondriów[129]. Dlatego też zaobserwowany wzrost ekspresji VEGFA może stanowić reakcję adaptacyjną na stres wywołany działaniem badanego ekstraktu, odzwierciedlając aktywację mechanizmów odpowiedzi na niekorzystne warunki wewnątrzkomórkowe. Należy jednak podkreślić, że biologiczne znaczenie zwiększonej ekspresji VEGFA jest złożone, ponieważ gen ten odgrywa również istotną rolę w procesach angiogenezy i progresji nowotworu. W związku z tym obserwowany wzrost ekspresji VEGFA nie powinien być interpretowany jednoznacznie jako efekt przeciwnowotworowy i wymaga dalszych badań wyjaśniających jego znaczenie funkcjonalne. Interpretacja ta pozostaje zgodna z równoczesną modulacją genów uczestniczących w szlakach sygnałowych związanych z przeżyciem komórek.

Obniżona ekspresja genu NFkB1 kodującego kluczowy czynnik transkrypcyjny regulujący sygnalizację zapalną i przeżycie komórek, może zwiększać podatność komórek nowotworowych na apoptozę[130]. Ponadto zmniejszona ekspresja genu BCL2L1 sugeruje osłabienie ochrony komórek przed apoptozą. Chociaż zaobserwowano również spadek ekspresji BAX, nie wyklucza to udziału mechanizmów apoptotycznych, ponieważ aktywność BAX jest w dużej mierze regulowana na poziomie potranslacyjnym i zależy od translokacji do mitochondriów oraz interakcji z innymi białkami z rodziny BCL-2 [125]. Jednocześnie sam spadek ekspresji BAX nie stanowi jednoznacznego dowodu aktywacji apoptozy i wskazuje, że obserwowany efekt może wynikać ze złożonej regulacji szlaków odpowiedzi komórkowej [131]. Równoczesne zahamowanie ekspresji BCL2L1 oraz NFkB1 może sprzyjać aktywacji mechanizmów związanych z programowaną śmiercią komórki, jednak na podstawie samych zmian ekspresji mRNA nie można jednoznacznie potwierdzić indukcji apoptozy. W związku z tym zaobserwowane cechy morfologiczne, takie jak kondensacja chromatyny i fragmentacja komórkowa, mogą być zgodne z aktywacją mechanizmów apoptotycznych, jednak ich jednoznaczne potwierdzenie wymagałoby oznaczenia swoistych markerów apoptozy na poziomie białkowym lub aktywności kaspaz. Selektywną modulację ekspresji genów dodatkowo potwierdzał brak znaczących zmian w ekspresji kilku genów regulacyjnych, w tym PTEN, MAPK1, RAC1, CDKN1B, CDKN2A i NFkBIA, co sugeruje, że ekstrakty nie wywoływały ogólnego zahamowania transkrypcji, lecz raczej oddziaływały na konkretne szlaki sygnałowe związane z proliferacją, przeżywalnością i migracją komórek nowotworowych. Ponadto brak istotnych zmian w

ekspresji kilku kluczowych genów regulacyjnych, takich jak PTEN i MAPK1, może wskazywać na selektywny charakter działania ekstraktu wzbogaconego FeHBED, sugerując, że zaobserwowane zmiany molekularne nie są wynikiem niespecyficznego, ogólnego zahamowania transkrypcji wywołanego wysoką cytotoksycznością.

Uzyskane dane wskazują, że wybrane ekstrakty roślinne i grzybowe mogą stanowić źródło związków o obiecującej aktywności biologicznej w komórkowych modelach raka jelita grubego, jednak potwierdzenie ich potencjalnego znaczenia chemoprewencyjnego wymaga dalszych badań mechanistycznych i *in vivo*.

7. Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

1. Naturalne produkty pochodzenia roślinnego i grzybowego stanowią cenne źródło związków bioaktywnych o potencjalnym znaczeniu chemoprewencyjnym w komórkowych modelach raka jelita grubego.
2. Pomimo spadku zawartości części związków po trawieniu *in vitro*, badane ekstrakty zachowały mierzalną aktywność biologiczną.
3. Badane ekstrakty wykazały aktywność biologiczną w komórkowych modelach raka jelita grubego, wskazując na ich potencjalne zastosowanie w dalszych badaniach nad chemoprewencją tego nowotworu.
4. Biofortyfikacja grzybów skutecznie modyfikowała ich profil metabolomiczny.
5. Forma chemiczna żelaza zastosowanego w procesie biofortyfikacji wpływała na aktywność biologiczną biofortyfikowanych grzybów oraz ich aktywność w komórkowych modelach raka jelita grubego.
6. Wybrane warianty biofortyfikacji, obejmujące FeHBED i $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ wykazały większy potencjał przeciwnowotworowy niż ekstrakt niebiofortyfikowany, a ich działanie było zależne od zastosowanej formy chemicznej żelaza.
7. Ekstrakt biofortyfikowany FeHBED modulował ekspresję genów związanych z proliferacją, migracją i przeżyciem w komórkowych modelach raka jelita grubego, co może wskazywać na ich udział w regulacji molekularnych mechanizmów rozwoju nowotworu.

Tabela 7. Podsumowanie weryfikacji hipotez badawczych.

Podsumowanie weryfikacji hipotez badawczych

Hipoteza badawcza	Metoda weryfikacji	Najważniejszy wynik	Stopień weryfikacji hipotezy
H1 Biologicznie aktywne składniki badanych ekstraktów	HPLC-ESI-QTOF-MS/MS, LC-MS/MS	Źródło cennych związków bioaktywnych o potencjalnym znaczeniu chemoprewencyjnym.	Potwierdzona
H2 Aktywność biologiczna po trawieniu <i>in vitro</i>	MTT, NR, barwienie metodą May-Grünwald-Giemsa	Zachowana mierzalna aktywność biologiczna po trawieniu <i>in vitro</i> .	Potwierdzona
H3 Wpływ biofortyfikacji na metabolom	LC-MS/MS	Zmiana profilu metabolomicznego.	Potwierdzona
H4 Forma chemiczna żelaza i jej wpływ na skład chemiczny i aktywność biologiczną grzybów	ICP-OES, EDS, FTIR, LC-MS/MS, DPPH	Wpływ formy Fe na skład chemiczny i aktywność biologiczną.	Potwierdzona
H5 Wybrane warianty biofortyfikacji zwiększają ich aktywność biologiczną w porównaniu do ekstraktów niebiofortyfikowanych	MTT, NR, barwienie metodą May-Grünwald-Giemsa	FeHBED; FeSO ₄ ·7H ₂ O.	Potwierdzona częściowo
H6 Wpływ na ekspresję genów	RT-qPCR	Zmiany ekspresji genów związanych z proliferacją, migracją i przeżyciem.	Potwierdzona częściowo

8. Bibliografia

1. Brown, J.S.; Amend, S.R.; Austin, R.H.; Gatenby, R.A.; Hammarlund, E.U.; Pienta, K.J. Updating the Definition of Cancer. *Mol. Cancer Res.* **2023**, *21*, 1142–1147, doi:10.1158/1541-7786.mcr-23-0411.
2. Karidio, I.D.; Sanlier, S.H. Reviewing cancer's biology: an eclectic approach. *J. Egypt. Natl. Canc. Inst.* **2021**, *33*, 1–17, doi:10.1186/s43046-021-00088-y.
3. Schiliro, C.; Firestein, B.L. Mechanisms of Metabolic Reprogramming in Cancer Cells Supporting Enhanced Growth and Proliferation. *Cells* **2021**, *10*, 1056, doi:10.3390/cells10051056.
4. Finley, L.W.S. What is cancer metabolism? *Cell* **2023**, *186*, 1670–1688, doi:10.1016/j.cell.2023.01.038.
5. Lopez, L.R.; Bleich, R.M.; Arthur, J.C. Microbiota Effects on Carcinogenesis: Initiation, promotion and progression. *Annu. Rev. Med.* **2021**, *72*, 243–261, doi:10.1146/annurev-med-080719-091604.
6. Hossain, M.S.; Karuniawati, H.; Jairoun, A.A.; Urbi, Z.; Ooi, D.J.; John, A.; Lim, Y.C.; Kibria, K.M.K.; Mohiuddin, A.K.M.; Ming, L.C.. et al. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers (Basel)*. **2022**, *14*, 1732, doi:10.3390/cancers14071732.
7. Li, Q.; Geng, S.; Luo, H.; Wang, W.; Mo, Y.-Q.; Luo, Q.; Wang, L.; Song, G.-B.; Sheng, J.-P.; Xu, B.. et al. Signaling pathways involved in colorectal cancer: pathogenesis and targeted therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2024**, *9*, 266, doi:10.1038/s41392-024-01953-7.
8. Tariq, K.; Ghias, K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol. Med.* **2016**, *13*, 120–135, doi:10.28092/j.issn.2095-3941.2015.0103.
9. Sung, H.; Filho, A.M.; Laversanne, M.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2024: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 34 cancers in 186 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2026**, *76*, e70090, doi:10.3322/caac.70090.
10. Alrushaid, N.; Khan, F.A.; Al-Suhaimi, E.; Elaissari, A. Progress and Perspectives in Colon Cancer Pathology, Diagnosis, and Treatments. *Diseases* **2023**, *11*, 148, doi:10.3390/diseases11040148.
11. Brouwer, N.P.M.; Bos, A.C.R.K.; Lemmens, V.E.P.P.; Tanis, P.J.; Huguen, N.;

- Nagtegaal, I.D.; de Wilt, J.H.W.; Verhoeven, R.H.A. An overview of 25 years of incidence, treatment and outcome of colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer* **2018**, *143*, 2758–2766, doi:10.1002/ijc.31785.
12. Ahmed, M. Colon Cancer: A Clinician's Perspective in 2019. *Gastroenterol Res.* **2020**, *13*, 1–10, doi:10.14740/gr1239.
 13. Adamowicz, K.; Wrotkowska, M.; Zaucha, J.M. Związek Częstości Występowania Raka Jelita Grubego z BMI. *Przegl. Epidemiol.* **2015**, *69*, 909–912.
 14. Katsaounou, K.; Nicolaou, E.; Vogazianos, P.; Brown, C.; Stavrou, M.; Teloni, S.; Hatzis, P.; Agapiou, A.; Fragkou, E.; Tsiaoussis, G.; et al. Colon Cancer: From Epidemiology to Prevention. *Metabolites* **2022**, *12*, 499, doi:10.3390/metabo12060499.
 15. Faïs, T.; Delmas, J.; Barnich, N.; Bonnet, R.; Dalmasso, G. Colibactin: More Than a New Bacterial Toxin. *Toxins (Basel)*. **2018**, *10*, 151, doi:10.3390/toxins10040151.
 16. Hurtado, C.G.; Wan, F.; Housseau, F.; Sears, C.L. Roles for Interleukin 17 and Adaptive Immunity in Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **2018**, *155*, 1706–1715, doi:10.1053/j.gastro.2018.08.056.
 17. Allen-Vercoe, E.; Jobin, C. Fusobacterium and Enterobacteriaceae: Important players for CRC? *Immunol. Lett.* **2014**, *162*, 54–61, doi:10.1016/j.imlet.2014.05.014.
 18. Fadlallah, H.; El Masri, J.; Fakhereddine, H.; Youssef, J.; Chemaly, C.; Doughan, S.; Abou-Kheir, W. Colorectal cancer: Recent advances in management and treatment. *World J. Clin. Oncol.* **2024**, *15*, 1136–1156, doi:10.5306/wjco.v15.i9.1136.
 19. Romero-Zoghbi, S.E.; Krumina, E.; López-Campos, F.; Couñago, F. Current and future perspectives in the management and treatment of colorectal cancer. *World J. Clin. Oncol.* **2025**, *16*, 100807, doi:10.5306/wjco.v16.i2.100807.
 20. Xie, Y.; Chen, Y.; Fang, J. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 22, doi:10.1038/s41392-020-0116-z.
 21. Lizardo, D.Y.; Kuang, C.; Hao, S.; Yu, J.; Huang, Y.; Zhang, L. Immunotherapy efficacy on mismatch repair-deficient colorectal cancer: from bench to bedside. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2020**, *1874*, 188447, doi:10.1016/j.bbcan.2020.188447.
 22. Ginn, S.L.; Amaya, A.K.; Alexander, I.E.; Edelstein, M.; Abedi, M.R. Gene therapy

- clinical trials worldwide to 2017- an update. *J. Gene Med.* **2018**, *20*, e3015, doi:10.1002/jgm.3015.
23. Zahavi, D.; Weiner, L. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies* **2020**, *9*, 34, doi:10.3390/antib9030034.
 24. Chrobak- Bień, J.; Gawor, A.; Gąsiorowska, A. Wiedza chorych na temat czynników ryzyka i profilaktyki raka jelita grubego. *Piel. Zdr. Publ.* **2016**, *6*, 187–195, doi:10.17219/pzp/64035.
 25. Partyka, O.; Pajewska, M.; Czerw, A.; Deptała, A.; Mękal, D.; Sygit, K.. et al. Current Progress in Clinical Research in Secondary Prevention and Early Detection of Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. **2025**, *17*, 367, doi:10.3390/cancers17030367.
 26. Santibanez, J.F.; Villar, V.H.; Echeverria, C. Current and Future Cancer Chemoprevention Strategies. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 1543, doi:10.3390/pharmaceutics15051543.
 27. Signorile, M.L.; Grossi, V.; Fasano, C.; Simone, C. Colorectal Cancer Chemoprevention : A Dream Coming True ? *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 7597, doi:10.3390/ijms24087597.
 28. Swetha, M.; Keerthana, C.K.; Rayginia, T.P.; Anto, R.J. Cancer Chemoprevention : A Strategic Approach Using Phytochemicals. *Front. Pharmacol.* **2022**, *12*, 809308, doi:10.3389/fphar.2021.809308.
 29. Gu, K.J.; Li, G. An Overview of Cancer Prevention : Chemoprevention and Immunoprevention. *J Cancer Prev* **2020**, *25*, 127–135, doi:10.15430/JCP.2020.25.3.127.
 30. Katona, B.W.; Weiss, J.M. Chemoprevention of Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **2020**, *158*, 368–388, doi:10.1053/j.gastro.2019.06.047.
 31. Zhang, S.; Xiao, X.; Yi, Y.; Wang, X.; Zhu, L.; Shen, Y.; Lin, D.; Wu, C. Tumor initiation and early tumorigenesis : molecular mechanisms and interventional targets. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2024**, *9*, 149, doi:10.1038/s41392-024-01848-7.
 32. Essa, M.M.; Bishir, M.; Bhat, A.; Chidambaram, S.B.; Al-Balushi, B.; Hamdan, H.; Govindarajan, N.; Freidland, R.P.; Qoronfleh, M.W. Functional foods and their impact on health. *J. Food Sci. Technol.* **2023**, *60*, 820–834, doi:10.1007/s13197-021-05193-3.
 33. Zhang, N.; Ren, Y.; Xu, Y. From laboratory to clinic: opportunities and challenges

- of functional food active ingredients in cancer therapy. *Front. Nutr.* **2025**, *12*, 1627949, doi:10.3389/fnut.2025.1627949.
34. Amintas, S.; Dupin, C.; Boutin, J.; Beaumont, P.; Moreau-Gaudry, F.; Bedel, A.; Krisa, S.; Vendrely, V.; Dabernat, S. Bioactive food components for colorectal cancer prevention and treatment: A good match. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2023**, *63*, 6615–6629, doi:10.1080/10408398.2022.2036095.
 35. Esmeeta, A.; Adhikary, S.; Dharshnaa, V.; Swarnamughi, P.; Ummul Maqsummiya, Z.; Banerjee, A.; Pathak, S.; Duttaroy, A.K. Plant-derived bioactive compounds in colon cancer treatment: An updated review. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *153*, 113384, doi:10.1016/j.biopha.2022.113384.
 36. Islam, M.R.; Akash, S.; Rahman, M.M.; Nowrin, F.T.; Akter, T.; Shohag, S.; Rauf, A.; Aljohani, A.S.M.; Simal-Gandara, J. Colon cancer and colorectal cancer: Prevention and treatment by potential natural products. *Chem. Biol. Interact.* **2022**, *368*, 110170, doi:10.1016/j.cbi.2022.110170.
 37. Rathore, H.; Prasad, S.; Sharma, S. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *PharmaNutrition* **2017**, *5*, 35–46, doi:10.1016/j.phanu.2017.02.001.
 38. Hamza, A.; Mylarapu, A.; Krishna, K.V.; Kumar, D.S. An insight into the nutritional and medicinal value of edible mushrooms: A natural treasury for human health. *J. Biotechnol.* **2024**, *381*, 86–99, doi:10.1016/j.jbiotec.2023.12.014.
 39. Kumar, K.; Mehra, R.; Guiné, R.P.F.; Lima, M.J.; Kumar, N.; Kaushik, R.; Ahmed, N.; Yadav, A.N.; Kumar, H. Edible mushrooms: A comprehensive review on bioactive compounds with health benefits and processing aspects. *Foods* **2021**, *10*, 2996, doi:10.3390/foods10122996.
 40. Frljak, J.; Mulabećirović, A.H.; Isaković, S.; Karahmet, E.; Toroman, A. Biological Active Components of Selected Medical Fungi. *Open J. Prev. Med.* **2021**, *11*, 9–22, doi:10.4236/ojpm.2021.111002.
 41. Golak-Siwulska, I.; Kałużewicz, A.; Spiżewski, T.; Sobieralski, K. Zawartość związków biologicznie aktywnych w grzybach jadalnych dziko rosnących. *Sylwan* **2018**, *162*, 238–247, doi:10.26202/sylwan.2017135.
 42. Macharia, J.M.; Zhang, L.; Mwangi, R.W.; Rozmann, N.; Kaposztas, Z.; Varjas, T.; Sugár, M.; Alfatafta, H.; Pintér, M.; Bence, R.L. Are chemical compounds in medical mushrooms potent against colorectal cancer carcinogenesis and antimicrobial growth? *Cancer Cell Int.* **2022**, *22*, 353, doi:10.1186/s12935-022-

02798-2.

43. Benthavaravithana, J.; Islam, T.; Xu, B. Medicinal Mushrooms in Colon Cancer Therapy: Mechanisms of Action of Bioactive Compounds and Therapeutic Potential. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 5304, doi:10.3390/ijms26115304.
44. Ostrovska, H.; Oleshchuk, O.; Vannini, S.; Cataldi, S. Epilobium angustifolium L.: A medicinal plant with therapeutic properties. *EuroBiotech J.* **2017**, *1*, 126–131, doi:10.24190/ISSN2564-615X/2017/02.03.
45. Bartfay, W.J.; Bartfay, E.; Johnson, J.G. Gram-negative and gram-positive antibacterial properties of the whole plant extract of willow herb (Epilobium angustifolium). *Biol. Res. Nurs.* **2012**, *14*, 85–89, doi:10.1177/1099800410393947.
46. Deng, L.; Zong, W.; Tao, X.; Liu, S.; Feng, Z.; Lin, Y.; Liao, Z.; Chen, M. Evaluation of the therapeutic effect against benign prostatic hyperplasia and the active constituents from Epilobium angustifolium L. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *232*, 1–10, doi:10.1016/j.jep.2018.11.045.
47. Kozhantayeva, A.; Iskakova, Z.; Ibrayeva, M.; Sapiyeva, A.; Arkharbekova, M.; Tashenov, Y. Phytochemical Insights and Therapeutic Potential of Chamaenerion angustifolium and Chamaenerion latifolium. *Molecules* **2025**, *30*, 1186, doi:10.3390/molecules30051186.
48. Szwajgier, D.; Baranowska-Wójcik, E.; Kukula-Koch, W.; Kowalik, K.; Polak-Berecka, M.; Waśko, A. Evolution of the anticholinesterase, antioxidant, and anti-inflammatory activity of Epilobium angustifolium L. infusion during in vitro digestion. *J. Funct. Foods* **2021**, *85*, 104645, doi:10.1016/j.jff.2021.104645.
49. Schepetkin, I.A.; Kirpotina, L.N.; Jakiw, L.; Khlebnikov, A.I.; Blaskovich, C.L.; Jutila, M.A.; Quinn, M.T. Immunomodulatory Activity of Oenothien B Isolated from Epilobium angustifolium. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 6754–6766, doi:10.4049/JIMMUNOL.0901827.
50. Wang, G.; Wang, Y.; Yao, L.; Gu, W.; Zhao, S.; Shen, Z.; Lin, Z.; Liu, W.; Yan, T. Pharmacological Activity of Quercetin: An Updated Review. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2022**, *2022*, 3997190, doi:10.1155/2022/3997190.
51. Alrumaihi, F.; Almatroodi, S.A.; Alharbi, H.O.A.; Alwanian, W.M.; Alharbi, F.A.; Almatroudi, A.; Rahmani, A.H. Pharmacological Potential of Kaempferol, a Flavonoid in the Management of Pathogenesis via Modulation of Inflammation and Other Biological Activities. *Molecules* **2024**, *29*, 2007, doi:10.3390/molecules29092007.

52. Golmei, P.; Kasna, S.; Roy, K.P.; Kumar, S. A Review on Pharmacological Advancement of Ellagic Acid. *J. Pharmacol. Pharmacother.* **2024**, *15*, 93–104, doi:10.1177/0976500X241240634.
53. Arulnangai, R.; Asia Thabassoom, H.; Vajiha Banu, H.; Thirugnanasambandham, K.; Ganesamoorthy, R. Recent developments on ursolic acid and its potential biological applications. *Toxicol. Reports* **2025**, *14*, 101900, doi:10.1016/j.toxrep.2025.101900.
54. Uogintaite, D.; Baniene, R.; Jasukaitiene, A.; Marksa, M.; Lasinskas, M.; Jariene, E.; Trumbeckaite, S. Effect of Fireweed (*Chamerion angustifolium* L.) Extracts and Oenothlein B on Colon Cancer Cells: Impact of Leaf Fermentation on Viability and Mitochondrial Function. *Med.* **2025**, *61*, 1957, doi:10.3390/medicina61111957.
55. Sõukand, R.; Mattalia, G.; Kolosova, V.; Stryamets, N.; Prakofjewa, J.; Belichenko, O.; Kuznetsova, N.; Minuzzi, S.; Keedus, L.; Prüse, B.; et al. Inventing a herbal tradition: The complex roots of the current popularity of *Epilobium angustifolium* in Eastern Europe. *J. Ethnopharmacol.* **2020**, *247*, 112254, doi:10.1016/J.JEP.2019.112254.
56. Kowalik, K.; Polak-Berecka, M.; Predecka-Wróbel, M.; Pigoń-Zajac, D.; Niedźwiedz, I.; Sz wajgier, D.; Baranowska-Wójcik, E.; Waśko, A. Biological Activity of an *Epilobium angustifolium* L. (Fireweed) Infusion after In Vitro Digestion. *Molecules* **2022**, *27*, 1006, doi:10.3390/molecules27031006.
57. Zunino, V.; Meineri, G.; Bellone, G.; Vizio, B.; Prati, A.; Grandi, M.; Radice, E.; Dal Bello, F.; Medana, C. Alcoholic extracts of *Epilobium*, *Urtica dioica* and *Evernia prunastri* with 5-fluorouracil in controlling murine colon carcinoma cell growth in vitro. *Orient. Pharm. Exp. Med.* **2017**, *17*, 325–331, doi:10.1007/s13596-017-0282-x.
58. Perużyńska, M.; Nowak, A.; Birger, R.; Ossowicz-Rupniewska, P.; Konopacki, M.; Rakoczy, R.; Kucharski, Ł.; Wenelska, K.; Klimowicz, A.; Drożdżik, M.; et al. Anticancer properties of bacterial cellulose membrane containing ethanolic extract of *Epilobium angustifolium* L. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2023**, *11*, 1133345, doi:10.3389/fbioe.2023.1133345.
59. Qiu, Y.; Lin, G.; Liu, W.; Zhang, F.; Linhardt, R.J.; Wang, X.; Zhang, A. Bioactive compounds in *Herichium erinaceus* and their biological properties: a review. *Food Sci. Hum. Wellness* **2024**, *13*, 1825–1844, doi:10.26599/fshw.2022.9250152.
60. Singh, M.; Kamal, S.; Sharma, V.P. Species and region-wise mushroom production

- in leading mushroom producing countries - China, Japan, USA, Canada and India. *Mushroom Res.* **2022**, *30*, 99–108, doi:10.36036/mr.30.2.2021.119394.
61. Kostanda, E.; Musa, S.; Pereman, I. Unveiling the Chemical Composition and Biofunctionality of *Herichium* spp. Fungi: A Comprehensive Overview. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 5949, doi:10.3390/ijms25115949.
 62. Szućko-Kociuba, I.; Trzeciak-Ryczek, A.; Kupnicka, P.; Chlubek, D. Neurotrophic and Neuroprotective Effects of *Herichium erinaceus*. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 15960, doi:10.3390/ijms242115960.
 63. Lee, K.-F.; Hsieh, Y.-Y.; Tung, S.-Y.; Teng, C.-C.; Cheng, K.-C.; Hsieh, M.-C.; Huang, C.-Y.; Lee, K.-C.; Lee, L.-Y.; Chen, W.-P.. et al. The Cerebral Protective Effect of Novel Erinacines from *Herichium erinaceus* Mycelium on In Vivo Mild Traumatic Brain Injury Animal Model and Primary Mixed Glial Cells via Nrf2-Dependent Pathways. *Antioxidants* **2024**, *13*, 407, doi:10.3390/antiox13040407.
 64. Hsu, C.-H.; Liao, E.-C.; Chiang, W.-C.; Wang, K.-L. Antioxidative Activities of Micronized Solid-State Cultivated *Herichium erinaceus* Rich in Erinacine A against MPTP-Induced Damages. *Molecules* **2023**, *28*, 3386, doi:10.3390/molecules28083386.
 65. Roda, E.; Priori, E.C.; Ratto, D.; De Luca, F.; Di Iorio, C.; Angelone, P.; Locatelli, C.A.; Desiderio, A.; Goppa, L.; Savino, E.; et al. Neuroprotective metabolites of *herichium erinaceus* promote neuro-healthy aging. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6379, doi:10.3390/ijms22126379.
 66. Qiu, Y.; Lin, G.; Liu, W.; Zhang, F.; Linhardt, R.J.; Wang, X.; Zhang, A. Bioactive compounds in *Herichium erinaceus* and their biological properties: a review. *Food Sci. Hum. Wellness* **2024**, *13*, 1825–1844, doi:10.26599/fshw.2022.9250152.
 67. Friedman, M. Chemistry, Nutrition, and Health-Promoting Properties of *Herichium erinaceus* (Lion ' s Mane) Mushroom Fruiting Bodies and Mycelia and Their Bioactive Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7108–7123, doi:10.1021/acs.jafc.5b02914.
 68. Tung, S.Y.; Lee, K.F.; Hsieh, Y.Y.; Cheng, K.C.; Lee, K.C.; Lee, L.Y.; Chen, W.P.; Chen, C.C.; Teng, C.C.; Hsieh, M.C.; et al. A Novel Erinacine S Derivative from *Herichium erinaceus* Overcomes Chemoresistance in Colorectal Cancer Cells by Enhancing TRAIL/TNFR1/DR5 Expression through Histone Acetylation. *Int. J. Med. Sci.* **2025**, *22*, 4278–4294, doi:10.7150/ijms.119894.
 69. Lee, K.C.; Lee, K.F.; Tung, S.Y.; Huang, W.S.; Lee, L.Y.; Chen, W.P.; Chen, C.C.;

- Teng, C.C.; Shen, C.H.; Hsieh, M.C.; et al. Induction Apoptosis of Erinacine A in Human Colorectal Cancer Cells Involving the Expression of TNFR, Fas, and Fas Ligand via the JNK/ p300/p50 Signaling Pathway with Histone Acetylation. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 1174, doi:10.3389/fphar.2019.01174.
70. Díaz-Gómez, J.; Twyman, R.M.; Zhu, C.; Farré, G.; Serrano, J.C.; Portero-Otin, M.; Muñoz, P.; Sandmann, G.; Capell, T.; Christou, P. Biofortification of crops with nutrients: factors affecting utilization and storage. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, *44*, 115–123, doi:10.1016/j.copbio.2016.12.002.
 71. Avnee; Sood, S.; Chaudhary, D.R.; Jhorar, P.; Rana, R.S. Biofortification: an approach to eradicate micronutrient deficiency. *Front. Nutr.* **2023**, *10*, 1233070, doi:10.3389/fnut.2023.1233070.
 72. Malik, K.A.; Maqbool, A. Transgenic Crops for Biofortification. *Front. Sustain. Food Syst.* **2020**, *4*, 571402, doi:10.3389/fsufs.2020.571402.
 73. Jha, A.B.; Warkentin, T.D. Biofortification of pulse crops: Status and future perspectives. *Plants* **2020**, *9*, 73, doi:10.3390/plants9010073.
 74. Bailey, R.L.; West, K.P.; Black, R.E. The epidemiology of global micronutrient deficiencies. *Ann. Nutr. Metab.* **2015**, *66*, 1–13, doi:10.1159/000371618.
 75. Rawat, N.; Neelam, K.; Tiwari, V.K.; Dhaliwal, H.S. Biofortification of cereals to overcome hidden hunger. *Plant Breed.* **2013**, *132*, 437–445, doi:10.1111/pbr.12040.
 76. Budzyńska, S.; Siwulski, M.; Gąsecka, M.; Magdziak, Z.; Kalač, P.; Niedzielski, P.; Mleczek, M. Biofortification of Three Cultivated Mushroom Species with Three Iron Salts—Potential for a New Iron-Rich Superfood. *Molecules* **2022**, *27*, 2328, doi:10.3390/molecules27072328.
 77. Oyetayo, V.O. Mineral Element Enrichment of Mushrooms for the Production of More Effective Functional Foods. *Asian J. Biol. Sci.* **2023**, *16*, 18–29, doi:10.3923/ajbs.2023.18.29.
 78. Budzyńska, S.; Siwulski, M.; Magdziak, Z.; Budka, A.; Gąsecka, M.; Kalač, P.; Rzymiski, P.; Niedzielski, P.; Mleczek, M. Influence of iron addition (Alone or with calcium) to elements biofortification and antioxidants in *Pholiota nameko*. *Plants* **2021**, *10*, 2275, doi:10.3390/plants10112275.
 79. Hansen, G.H.; Lübeck, M.; Frisvad, J.C.; Lübeck, P.S.; Andersen, B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochem.* **2015**, *50*, 1327–1341, doi:10.1016/j.procbio.2015.05.017.

80. Słyszcz, K.; Siwulski, M.; Wiater, A.; Tomczyk, M.; Waśko, A. Biofortification of Mushrooms: A Promising Approach. *Molecules* **2024**, *29*, 4740, doi:10.3390/molecules29194740.
81. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408, doi:10.1006/meth.2001.1262.
82. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Stat. Methodol.* **1995**, *57*, 289–300, doi:10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.
83. Szwajgier, D.; Baranowska-Wójcik, E.; Kukula-Koch, W.; Kowalik, K.; Polak-Berecka, M.; Waśko, A. Evolution of the anticholinesterase, antioxidant, and anti-inflammatory activity of *Epilobium angustifolium* L. infusion during in vitro digestion. *J. Funct. Foods* **2021**, *85*, 104645, doi:10.1016/j.jff.2021.104645.
84. Dacrema, M.; Sommella, E.; Santarcangelo, C.; Bruno, B.; Marano, M.G.; Insolia, V.; Saviano, A.; Campiglia, P.; Stornaiuolo, M.; Daglia, M. Metabolic profiling, in vitro bioaccessibility and in vivo bioavailability of a commercial bioactive *Epilobium angustifolium* L. extract. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *131*, 110670, doi:10.1016/j.biopha.2020.110670.
85. Baert, N.; Kim, J.; Karonen, M.; Salminen, J.P. Inter-population and inter-organ distribution of the main polyphenolic compounds of *Epilobium angustifolium*. *Phytochemistry* **2017**, *134*, 54–63, doi:10.1016/j.phytochem.2016.11.003.
86. Gevrenova, R.; Zengin, G.; Ozturk, G.; Zheleva-Dimitrova, D. Exploring the Phytochemical Profile and Biological Insights of *Epilobium angustifolium* L. Herb. *Plants* **2025**, *14*, 415, doi:10.3390/plants14030415.
87. Qi, W.; Qi, W.; Xiong, D.; Long, M. Quercetin: Its Antioxidant Mechanism, Antibacterial Properties and Potential Application in Prevention and Control of Toxipathy. *Molecules* **2022**, *27*, 6545, doi:10.3390/molecules27196545.
88. Wang, G.; Wang, Y.; Yao, L.; Gu, W.; Zhao, S.; Shen, Z.; Lin, Z.; Liu, W.; Yan, T. Pharmacological Activity of Quercetin: An Updated Review. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2022**, *2022*, 3997190, doi:10.1155/2022/3997190.
89. de Moraes, E.F.; de Oliveira, L.Q.R.; Farias Moraes, H.G. de; Souto Medeiros, M.R. de; Freitas, R. de A.; Rodini, C.O.; Coletta, R.D. The Anticancer Potential of Kaempferol: A Systematic Review Based on In Vitro Studies. *Cancers (Basel)*. **2024**, *16*, 585, doi:10.3390/cancers16030585.

90. Kia, B.H.; Nouredini, S.K.; Kakhki, M.R.V. The extracts of epilobium parviflorum inhibit MCF-7 breast cancer cells. *Iran. J. Toxicol.* **2021**, *15*, 65–71, doi:10.32598/IJT.15.1.752.1.
91. Akbudak, M.A.; Sut, T.; Eruygur, N.; Akinci, E. Antiproliferative Effect of Epilobium parviflorum Extracts on Colorectal Cancer Cell Line HT-29. *Rom. Biotechnol. Lett.* **2021**, *26*, 3120–3128, doi:10.25083/rbl/26.6/3120-3128.
92. Kiss, A.K.; Stolarczyk, M.; Piwowarski, J.P.; Granica, S. Effects of standardized extracts from Epilobium sp. herbs on of hormone-dependent prostate cancer cells (LNCaP)-searching for active compounds. *Pharmacol. Rep.* **2013**, *65*, 160–170, doi:10.1016/S1734-1140(13)71277-5.
93. Gozzelino, R.; Arosio, P. Iron Homeostasis in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 130, doi:10.3390/ijms17010130.
94. Latunde-Dada, G.O. Iron Intake and Human Health. *Nutrients* **2024**, *16*, 206, doi:10.3390/nu16060833.
95. Rzymiski, P.; Niedzielski, P.; Siwulski, M.; Mleczek, M.; Budzyńska, S.; Gąsecka, M.; Poniedziałek, B. Lithium biofortification of medicinal mushrooms *Agrocybe cylindracea* and *Herichium erinaceus*. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54*, 2387–2393, doi:10.1007/s13197-017-2679-4.
96. Egressy-Molnár, O.; Ouerdane, L.; Györfi, J.; Dernovics, M. Analogy in selenium enrichment and selenium speciation between selenized yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Herichium erinaceus* (lion's mane mushroom). *Lwt* **2016**, *68*, 306–312, doi:10.1016/j.lwt.2015.12.028.
97. Hu, T.; Hui, G.; Li, H.; Guo, Y. Selenium biofortification in *Herichium erinaceus* (Lion's Mane mushroom) and its in vitro bioaccessibility. *Food Chem.* **2020**, *331*, 127287, doi:10.1016/j.foodchem.2020.127287.
98. Niedzielski, P.; Mleczek, M.; Siwulski, M.; Gąsecka, M.; Kozak, L.; Rissmann, I.; Mikołajczak, P. Efficacy of supplementation of selected medicinal mushrooms with inorganic selenium salts. *J. Environ. Sci. Heal. B* **2014**, *49*, 929–937, doi:10.1080/03601234.2014.951576.
99. Jozífek, M.; Praus, L.; Matějka, J.; Jablonský, I.; Koudela, M. Selenium Uptake by *Herichium erinaceus* Basidiocarps on Various Substrates and Their Effect on Growth and Yield. *Agriculture* **2025**, *15*, 460, doi:10.3390/agriculture15050460.
100. Zulfiqar, U.; Ayub, A.; Hussain, S.; Ahmad, M.; Rehman, A.; Ishfaq, M.; Ali, M.F.; Shabaan, M.; Wan, J.; Yong, H. Iron biofortification in cereal crops : Recent

- progress and prospects. *Food Energy Secur.* **2024**, *13*, e547, doi:10.1002/fes3.547.
101. Zhang, Y.; Fernie, A.R. The Role of TCA Cycle Enzymes in Plants. *Adv. Biol.* **2023**, *7*, 2200238, doi:10.1002/adbi.202200238.
 102. Sheridan, K.J.; Lechner, B.E.; Keeffe, G.O.; Keller, M.A.; Werner, E.R.; Lindner, H.; Jones, G.W.; Haas, H.; Doyle, S. Ergothioneine Biosynthesis and Functionality in the Opportunistic Fungal Pathogen , *Aspergillus fumigatus*. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 35306, doi:10.1038/srep35306.
 103. Gasmi, A.; Peana, M.; Arshad, M.; Butnariu, M.; Menzel, A.; Bjørklund, G. Krebs cycle : activators , inhibitors and their roles in the modulation of carcinogenesis. *Arch. Toxicol.* **2021**, *95*, 1161–1178, doi:10.1007/s00204-021-02974-9.
 104. Buturi, C.V.; Sabatino, L.; Mauro, R.P.; Navarro-le, E.; Blasco, B.; Leonardi, C.; Giuffrida, F. Iron Biofortification of Greenhouse Soilless Lettuce : An Effective Agronomic Tool to Improve the Dietary Mineral Intake. *Agronomy* **2022**, *12*, 1793, doi:10.3390/agronomy12081793.
 105. Borodina, I.; Kenny, L.C.; McCarthy, C.M.; Paramasivan, K.; Pretorius, E.; Roberts, T.J.; van der Hoek, S.A.; Kell, D.B. The biology of ergothioneine , an antioxidant nutraceutical. *Nutr. Res. Rev.* **2020**, *33*, 190–217, doi:10.1017/S0954422419000301.
 106. Fu, T.; Shen, L. Ergothioneine as a Natural Antioxidant Against Oxidative Stress-Related Diseases. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 850813, doi:10.3389/fphar.2022.850813.
 107. Rai, G.K.; Kumar, P.; Choudhary, S.M.; Singh, H.; Adab, K.; Kosser, R.; Magotra, I.; Kumar, R.R.; Singh, M.; Sharma, R.; et al. Antioxidant Potential of Glutathione and Crosstalk with Phytohormones in Enhancing Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Plants* **2023**, *12*, 1133, doi:10.3390/plants12051133.
 108. Xiao, J.; Park, Y.G.; Guo, G.; Jeong, B.R. Effect of Iron Source and Medium pH on Growth and Development of *Sorbus commixta* In Vitro. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 133, doi:10.3390/ijms22010133.
 109. Hanikenne, M.; Bouché, F. Iron and zinc homeostasis in plants : a matter of trade-offs. *J. Exp. Bot.* **2023**, *74*, 5426–5430, doi:10.1093/jxb/erad304.
 110. Smith, A.D.; Logeman, B.L.; Thiele, D.J. Copper Acquisition and Utilization in Fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **2017**, *71*, 597–623, doi:10.1146/annurev-micro-030117-020444.
 111. Weger, H.G.; Lam, J.; Wirtz, N.L.; Walker, C.N.; Treble, R.G. High stability ferric chelates result in decreased iron uptake by the green alga *Chlorella kessleri* owing to

- decreased ferric reductase activity and chelation of ferrous iron. *Botany* **2009**, *87*, 922–931, doi:10.1139/B09-063.
112. Ab Rhaman, S.M.S.; Naher, L.; Siddiquee, S. Mushroom Quality Related with Various Substrates ' Bioaccumulation and Translocation of Heavy Metals. *J. Fungi* **2022**, *8*, 42, doi:10.3390/jof8010042.
 113. Deng, T.; Yang, J.; Sun, M.; Zhang, Y.; Pan, Y.; Huang, L. Distinct Roles of Ena ATP Family Proteins in Sodium Accumulation , Invasive Growth , and Full Virulence in *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Fungi* **2023**, *9*, 566, doi:10.3390/jof9050566.
 114. Hou, X.X.; Liu, J.Y.; Li, Z.Y.; Chang, M.C.; Guo, M.; Feng, C.P.; Shi, J.Y. Fruiting body polysaccharides of *Herichium erinaceus* induce apoptosis in human colorectal cancer cells via ROS generation mediating caspase-9-dependent signaling pathways. *Food Funct.* **2020**, *11*, 6128–6138, doi:10.1039/d0fo00916d.
 115. Yuan, Y.; Ni, S.; Zhuge, A.; Li, B.; Li, L. Iron Regulates the Warburg Effect and Ferroptosis in Colorectal Cancer. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 614778, doi:10.3389/fonc.2021.614778.
 116. Zhang, J.; Wang, Y.; Zhou, Y.; He, Q.Y. Jolkinolide B induces apoptosis of colorectal carcinoma through ROS-ER stress-Ca²⁺-mitochondria dependent pathway. *Oncotarget* **2017**, *8*, 91223–91237, doi:10.18632/oncotarget.20077.
 117. Galaris, D.; Barbouti, A.; Pantopoulos, K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2019**, *1866*, 118535, doi:10.1016/j.bbamcr.2019.118535.
 118. Słyszcz, K.; Siwulski, M.; Frąszczak, B.; Wiater, A.; Waśko, A. Comparative Iron biofortification in *Herichium erinaceus* : A study of different ionic forms and their uptake efficiency. *Food Chem.* **2026**, *498*, 147238, doi:10.1016/j.foodchem.2025.147238.
 119. Wong, F.C.; Chai, T.T.; Tan, S.L.; Yong, A.L. Evaluation of bioactivities and phenolic content of selected edible mushrooms in Malaysia. *Trop. J. Pharm. Res.* **2013**, *12*, 1011–1016, doi:10.4314/tjpr.v12i6.21.
 120. Abe, C.; Miyazawa, T.; Miyazawa, T. Current Use of Fenton Reaction in Drugs and Food. *Molecules* **2022**, *27*, 5451, doi:10.3390/molecules27175451.
 121. Takala, H.; Saarnio, J.; Wiik, H.; Ohtonen, P.; Soini, Y. HIF-1 α and VEGF are associated with disease progression in esophageal carcinoma. *J. Surg. Res.* **2011**, *167*, 41–48, doi:10.1016/j.jss.2009.11.725.

122. Wang, R.; Xing, R.; Su, Q.; Yin, H.; Wu, D.; Lv, C.; Yan, Z. Knockdown of SFRS9 Inhibits Progression of Colorectal Cancer Through Triggering Ferroptosis Mediated by GPX4 Reduction. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 683589, doi:10.3389/fonc.2021.683589.
123. Xia, W.; Lv, Y.; Zou, Y.; Kang, Z.; Li, Z.; Tian, J.; Zhou, H.; Su, W.; Zhong, J. The role of ferroptosis in colorectal cancer and its potential synergy with immunotherapy. *Front. Immunol.* **2024**, *15*, 1526749, doi:10.3389/fimmu.2024.1526749.
124. McDonald, R.A.; Varela-Ramirez, A.; Ashley, A.K. RESEARCH CHALLENGES IN STAGE III AND IV RAS-ASSOCIATED CANCERS: A Narrative Review of the Complexities and Functions of the Family of RAS Genes and Ras Proteins in Housekeeping and Tumorigenesis. *Biology (Basel)*. **2025**, *14*, 936, doi:10.3390/biology14080936.
125. Venkateswaran, N.; Conacci-Sorrell, M. MYC leads the way. *Small GTPases* **2020**, *11*, 86–94, doi:10.1080/21541248.2017.1364821.
126. Crozier, L.; Foy, R.; Mouery, B.L.; Whitaker, R.H.; Corno, A.; Spanos, C.; Ly, T.; Gowen Cook, J.; Saurin, A.T. CDK4/6 inhibitors induce replication stress to cause long-term cell cycle withdrawal. *EMBO J.* **2022**, *41*, e108599, doi:10.15252/embj.2021108599.
127. Costa, P.; Scales, T.M.E.; Ivaska, J.; Parsons, M. Integrin-Specific Control of Focal Adhesion Kinase and RhoA Regulates Membrane Protrusion and Invasion. *PLoS One* **2013**, *8*, e74659, doi:10.1371/journal.pone.0074659.
128. Zhang, J.; Deng, Y.T.; Liu, J.; Gan, L.; Jiang, Y. Role of transforming growth factor- β 1 pathway in angiogenesis induced by chronic stress in colorectal cancer. *Cancer Biol. Ther.* **2024**, *25*, 2366451, doi:10.1080/15384047.2024.2366451.
129. Kang, Y.; Li, H.; Liu, Y.; Li, Z. Regulation of VEGF-A expression and VEGF-A-targeted therapy in malignant tumors. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2024**, *150*, 221, doi:10.1007/s00432-024-05714-5.
130. Cartwright, T.; Perkins, N.D.; Wilson, C.L. NF κ B1: a suppressor of inflammation, ageing and cancer. *FEBS J.* **2016**, *283*, 1812–1822, doi:10.1111/febs.13627.
131. Kaloni, D.; Diepstraten, S.T.; Strasser, A.; Kelly, G.L. BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy. *Apoptosis* **2023**, *28*, 20–38, doi:10.1007/s10495-022-01780-7.

9. Załączniki

Lublin, 27.07.2026

mgr Klaudia Słyszcz
Jantarowa 5/73
20-582 Lublin
665 288 932
klaudia.kowalik@up.edu.pl

Rada Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, iż w pracach:

1) Kowalik, K.; Polak-Berecka, M.; Prendecka-Wróbel, M.; Pigoń-Zajac, D.; Niedźwiedź, I.; Sz wajgier, D.; Baranowska-Wójcik, E.; Waśko, A. 2022. Biological Activity of an *Epilobium angustifolium* L. (Fireweed) Infusion after *In Vitro* Digestion. *Molecules*, 27, 1006.

2) Słyszcz, K.; Siwulski, M.; Wiater, A.; Tomczyk, M.; Waśko, A. 2024. Biofortification of Mushrooms: A Promising Approach. *Molecules*, 29, 4740.

3) Słyszcz, K.; Siwulski, M.; Frąszczak, B.; Wiater, A.; Waśko, A. 2026. Comparative Iron Biofortification in *Hericum erinaceus*: A Study of Different Ionic Forms and Their Uptake Efficiency. *Food Chemistry*, 498, 147238.

4) Słyszcz, K.; Rachwał, K.; Baranowska-Wójcik, E.; Sz wajgier, D.; Sadurski, J.; Waśko, A. 2026. Impact of Iron Speciation on the Cytotoxicity and Gene Expression Profile of Biofortified *Hericum erinaceus* in Human Colorectal Adenocarcinoma. *Molecules*, 31, 2295.

Mój udział polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań i metodologii; przeprowadzeniu części doświadczalnej; opracowaniu i analizie otrzymanych wyników; analizie statystycznej wyników; zebraniu literatury naukowej; przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, współredagowaniu jego treści oraz przygotowaniu finalnej wersji pracy; współopracowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów(1);
- współtworzeniu koncepcji publikacji przeglądowej; zebraniu literatury naukowej; analizie i interpretacji danych z piśmiennictwa; przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, współredagowaniu jego treści oraz przygotowaniu finalnej wersji pracy; współopracowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów (2);

- opracowaniu koncepcji badań i metodologii, przeprowadzeniu części doświadczalnej, opracowaniu i analizie otrzymanych wyników; zebraniu literatury naukowej; przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, współredagowaniu jego treści oraz przygotowaniu finalnej wersji pracy; pełnieniu roli autora korespondencyjnego; współopracowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów (3);
- opracowaniu koncepcji badań i metodologii, przeprowadzeniu części doświadczalnej, opracowaniu i analizie otrzymanych wyników; zebraniu literatury naukowej; przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, współredagowaniu jego treści oraz przygotowaniu finalnej wersji pracy; współopracowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów (4).

Lublin, 27.07.2026

prof. dr hab. Adam Waśko

Adres do korespondencji

Nr telefonu 601 989 97

E-mail adam.wasko@up.lublin.pl

Rada Dyscypliny

Technologia Żywności i Żywienia

Uniwersytetu Przyrodniczego

w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, iż w pracach:

1) Kowalik, K.; Polak-Berecka, M.; Prendecka-Wróbel, M.; Pigoń-Zajac, D.; Niedźwiedź, I.; Sz wajgier, D.; Baranowska-Wójcik, E.; Waśko, A. 2022. Biological Activity of an *Epilobium angustifolium* L. (Fireweed) Infusion after *In Vitro* Digestion. *Molecules*, 27, 1006.

2) Słyszcz, K.; Siwulski, M.; Wiater, A.; Tomczyk, M.; Waśko, A. 2024. Biofortification of Mushrooms: A Promising Approach. *Molecules*, 29, 4740.

3) Słyszcz, K.; Siwulski, M.; Frąszczak, B.; Wiater, A.; Waśko, A. 2026. Comparative Iron Biofortification in *Hericum erinaceus*: A Study of Different Ionic Forms and Their Uptake Efficiency. *Food Chemistry*, 498, 147238.

4) Słyszcz, K.; Rachwał, K.; Baranowska-Wójcik, E.; Sz wajgier, D.; Sadurski, J.; Waśko, A. 2026. Impact of Iron Speciation on the Cytotoxicity and Gene Expression Profile of Biofortified *Hericum erinaceus* in Human Colorectal Adenocarcinoma. *Molecules*, 31, 2295.

Mój udział polegał na:

- współtworzeniu koncepcji badań; konsultacjach dotyczących metodyki i analizy wyników; redakcji i korekcie manuskryptu; nadzorze merytorycznym (1);
- współudziale w koncepcji pracy przeglądowej; redakcji i korekcie manuskryptu; nadzorze merytorycznym; pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego (2);
- współtworzeniu koncepcji badań; konsultacjach dotyczących metodyki i analizy wyników; redakcji i korekcie manuskryptu; nadzorze merytorycznym (3);
- współtworzeniu koncepcji badań; konsultacjach dotyczących metodyki i analizy wyników; redakcji i korekcie manuskryptu; nadzorze merytorycznym; pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego (4).



Podpis

Lublin, 27.07.2026

prof. dr hab. Adrian Wiater
Adres do korespondencji
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej UMCS
Nr telefonu 815375960
E-mail adrian.wiater@umcs.pl

**Rada Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

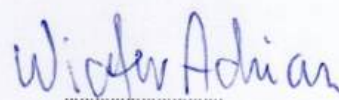
Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, iż w pracach:

- 1) Słyszcz, K.; Siwulski, M.; Wiater, A.; Tomczyk, M.; Waśko, A. 2024. Biofortification of Mushrooms: A Promising Approach. *Molecules*, 29, 4740.
- 2) Słyszcz, K.; Siwulski, M.; Frąszczak, B.; Wiater, A.; Waśko, A. 2026. Comparative Iron Biofortification in *Hericium erinaceus*: A Study of Different Ionic Forms and Their Uptake Efficiency. *Food Chemistry*, 498, 147238.

Mój udział polegał na:

- redakcji i korekcie manuskryptu; opracowaniu części odpowiedzi na uwagi recenzentów (1);
- przygotowaniu próbek po procesie biofortyfikacji soplówki jeżowatej do dalszych analiz;
- opracowaniu wybranych elementów metodyki badawczej (2).



Podpis

Lublin, 27.07.2026

prof. dr hab. inż. Dominik Sz wajgier

Wydz. Nauk o Ż ywności i Biotechnologii

Kat. Biotechnologii, Mikrobiologii i Ż ywienia Człowieka

Ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

dominik.sz wajgier@up.edu.pl

Rada Dyscypliny

Technologia Ż ywności i Ż ywienia

Uniwersytetu Przyrodniczego

w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, iż w pracach:

1) Kowalik, K.; Polak-Berecka, M.; Prendecka-Wróbel, M.; Pigoń-Zajac, D.; Niedźwiedź, I.; Sz wajgier, D.; Baranowska-Wójcik, E.; Waśko, A. 2022. Biological Activity of an *Epilobium angustifolium* L. (Fireweed) Infusion after *In Vitro* Digestion. *Molecules*, 27, 1006.

2) Słyszcz, K.; Rachwał, K.; Baranowska-Wójcik, E.; Sz wajgier, D.; Sadurski, J.; Waśko, A. 2026. Impact of Iron Speciation on the Cytotoxicity and Gene Expression Profile of Biofortified *Hericum erinaceus* in Human Colorectal Adenocarcinoma. *Molecules*, 31, 2295.

Mój udział polegał na współprowadzeniu badań obejmujących przeprowadzenie procesu trawienia *in vitro*.

Podpis

Lublin, 27.07.2026

mgr Dominika Pigoń-Zajac
ul. Wędrawna 1/15
20-819 Lublin
661908593
dominika.pigon-zajac@umlub.edu.pl

**Rada Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, iż w pracy:

1) Kowalik, K.; Polak-Berecka, M.; Prendecka-Wróbel, M.; Pigoń-Zajac, D.; Niedźwiedz, I.; Sz wajgier, D.; Baranowska-Wójcik, E.; Waśko, A. 2022. Biological Activity of an *Epilobium angustifolium* L. (Fireweed) Infusion after *In Vitro* Digestion. *Molecules*, 27, 1006.

Mój udział polegał na współprowadzeniu badań z wykorzystaniem metody ECIS służącej do pomiaru impedancji, rezystancji i pojemności elektrycznej (Electric Cell-Substrate Impedance Sensing, ECIS), obejmujących realizację eksperymentów oraz udział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników.

Dominika Pigoń-Zajac

Podpis

Lublin, 27.07.2026

prof. dr hab. Marek Siwulski
Adres do korespondencji
Ul. Strzeszyńska 67 D m. 48, 60-479 Poznań
Nr telefonu 691773881
E-mail marek.siwulski@up.poznan.pl

Rada Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, iż w pracach:

- 1) Słyszczak, K.; Siwulski, M.; Wiater, A.; Tomczyk, M.; Waśko, A. 2024. Biofortification of Mushrooms: A Promising Approach. *Molecules*, 29, 4740.
- 2) Słyszczak, K.; Siwulski, M.; Frąszczak, B.; Wiater, A.; Waśko, A. 2026. Comparative Iron Biofortification in *Hericium erinaceus*: A Study of Different Ionic Forms and Their Uptake Efficiency. *Food Chemistry*, 498, 147238.

Mój udział polegał na:

- współokreśleniu zakresu i struktury przeglądu; selekcji literatury naukowej uwzględnionej w pracy przeglądowej (1);
- współprowadzeniu badań w zakresie biofortyfikacji soplówki jeżowatej; opracowaniu części odpowiedzi na uwagi recenzentów (2).



Podpis

Lublin, 27.07.2026

Dr inż. Iwona Niedźwiedź
Koralowa 21/9,
20-583 Lublin
tel: 516 596 297
E-mail: koprukowniak.i@gmail.com

Rada Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, iż w pracy:

1) Kowalik, K.; Polak-Berecka, M.; Predecka-Wróbel, M.; Pigoń-Zajac, D.; Niedźwiedź, I.; Sz wajgier, D.; Baranowska-Wójcik, E.; Waśko, A. 2022. Biological Activity of an *Epilobium angustifolium* L. (Fireweed) Infusion after *In Vitro* Digestion. *Molecules*, 27, 1006.

Mój udział polegał na współprowadzeniu badań obejmujących ocenę wpływu ekstraktu z wierzbowki koprzycy na wzrost wybranych szczepów bakterii z wykorzystaniem systemu Bioscreen C.

dr inż. Iwona Niedźwiedź

Podpis

Lublin, 27.07.2026 r.

prof. UPP dr hab. Barbara Frąszczak

Adres do korespondencji
Katedra Warzywnictwa
Ul. Dąbrowskiego 159
60-594 Poznań

Nr telefonu 508689675

E-mail barbara.fraszczak@up.poznan.pl

**Rada Dyscypliny
Technologii Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, iż w pracy:

1) Słyszczak, K.; Siwulski, M.; Frąszczak, B.; Wiater, A.; Waśko, A. 2026. Comparative Iron biofortification in *Hericium erinaceus*: A study of different ionic forms and their uptake efficiency. Food Chemistry, 498, 147238.

Mój udział polegał na współprowadzeniu badań w zakresie biofortyfikacji soplówki jeżowatej.



.....
Podpis

Białystok, 30.07.2026 r.

prof. dr hab. Michał Tomczyk
Zakład Biologii i Farmakognozji
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Mickiewicza 2A, 15-222 Białystok
michal.tomczyk@umb.edu.pl

Rada Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, iż w pracy:

1) Słyszczak, K.; Siwulski, M.; Wiater, A.; Tomczyk, M.; Waśko, A. 2024. Biofortification of Mushrooms: A Promising Approach. *Molecules*, 29, 4740.

Mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji pracy przeglądowej; nadzorze merytorycznym.



PODPIS ZAUFANY

Michał
TOMCZYK
30.07.2026 15:49:46 GMT+0200
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

.....
Podpis

Lublin, 27.07.2026

prof. dr hab. Magdalena Polak-Berecka
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii
i Żywienia Człowieka
Uniwersytet Przyrodniczy
w Lublinie, ul. Skromna 8,
20 -704 Lublin
+48 (81) 462 33 56
magdalena.polak-berecka@up.edu.pl

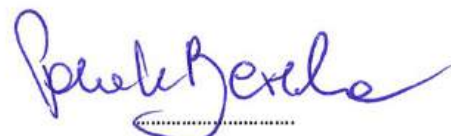
Rada Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, iż w pracy:

1) Kowalik, K.; Polak-Berecka, M.; Predecka-Wróbel, M.; Pigoń-Zajac, D.; Niedźwiedź, I.; Sz wajgier, D.; Baranowska-Wójcik, E.; Waśko, A. 2022. Biological Activity of an *Epilobium angustifolium* L. (Fireweed) Infusion after *In Vitro* Digestion. *Molecules*, 27, 1006.

Mój udział polegał na współopracowaniu koncepcji pracy; redakcji i korekcie manuskryptu; pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego.



Podpis

Lublin, 27.07.2026

dr hab. inż. Ewa Baranowska-Wójcik
Adres do korespondencji
Nr telefonu: 814623394
E-mail: Ewa.Baranowska@up.edu.pl

Rada Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, iż w pracach:

1) Kowalik, K.; Polak-Berecka, M.; Predecka-Wróbel, M.; Pigoń-Zajac, D.; Niedźwiedź, I.; Sz wajgier, D.; Baranowska-Wójcik, E.; Waśko, A. 2022. Biological Activity of an *Epilobium angustifolium* L. (Fireweed) Infusion after *In Vitro* Digestion. *Molecules*, 27, 1006.

2) Słyszcz, K.; Rachwał, K.; Baranowska-Wójcik, E.; Sz wajgier, D.; Sadurski, J.; Waśko, A. 2026. Impact of Iron Speciation on the Cytotoxicity and Gene Expression Profile of Biofortified *Hericium erinaceus* in Human Colorectal Adenocarcinoma. *Molecules*, 31, 2295.

Mój udział polegał na współprowadzeniu badań obejmujących przeprowadzenie procesu trawienia *in vitro*.



Podpis

Lublin, 27.07.2026

Mgr inż. Jan Józef Sadurski
Kaniowczyków 6/7, 24-100 Puławy
665-210-380
Jan.sadurski@up.lublin.pl

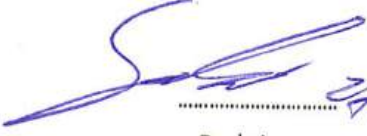
Rada Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, iż w pracy:

1) Słyszczak, K.; Rachwał, K.; Baranowska-Wójcik, E.; Sz wajgier, D.; Sadurski, J.; Waśko, A. 2026.
Impact of Iron Speciation on the Cytotoxicity and Gene Expression Profile of Biofortified
Hericium erinaceus in Human Colorectal Adenocarcinoma. *Molecules*, 31, 2295.

Mój udział polegał na opracowaniu graficznej prezentacji wyników oraz wykonaniu analiz
statystycznych.



27.07.26

Podpis

Lublin, 27.07.2026

dr Kamila Rachwał
ul. Wyżynna 51/6
20-560 Lublin
tel. 516780154
E-mail: kamila.rachwal@up.edu.pl

Rada Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, iż w pracy:

1) Słyszczak, K.; Rachwał, K.; Baranowska-Wójcik, E.; Szwałgier, D.; Sadurski, J.; Waśko, A. 2026. Impact of Iron Speciation on the Cytotoxicity and Gene Expression Profile of Biofortified *Hericium erinaceus* in Human Colorectal Adenocarcinoma. *Molecules*, 31, 2295.

Mój udział polegał na współprowadzeniu badań obejmujących oznaczanie ekspresji genów związanych z rakiem jelita grubego z wykorzystaniem metody ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym; opracowaniu wybranych elementów metodyki badawczej; współtworzeniu pierwotnej wersji manuskryptu.



Podpis

Lublin, 27.07.2026

dr hab. n. med. i n. o zdr. Monika

Predecka-Wróbel

Adres do korespondencji

20-863 Lublin,

ul. Młodej Polski 14/18

Nr telefonu 609 788 206

E-mail monika.predecka-wrobel@umlub.edu.pl

Rada Dyscypliny

Technologia Żywności i Żywienia

Uniwersytetu Przyrodniczego

w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, iż w pracy:

1) Kowalik, K.; Polak-Berecka, M.; Predecka-Wróbel, M.; Pigoń-Zajac, D.; Niedźwiedź, I.; Sz wajgier, D.; Baranowska-Wójcik, E.; Waśko, A. 2022. Biological Activity of an *Epilobium angustifolium* L. (Fireweed) Infusion after *In Vitro* Digestion. *Molecules*, 27, 1006.

Mój udział polegał na współprowadzeniu badań z wykorzystaniem metody ECIS służącej do pomiaru impedancji, rezystancji i pojemności elektrycznej (Electric Cell-Substrate Impedance Sensing, ECIS), obejmujących realizację eksperymentów oraz udział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników.



.....
Podpis

Article

Biological Activity of an *Epilobium angustifolium* L. (Fireweed) Infusion after In Vitro Digestion

Klaudia Kowalik ¹, Magdalena Polak-Berecka ^{1,*} , Monika Predecka-Wróbel ², Dominika Pigoń-Zajac ² , Iwona Niedźwiedz ¹, Dominik Sz wajgier ¹ , Ewa Baranowska-Wójcik ¹  and Adam Waśko ¹ 

¹ Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland; klaudia.kowalik@up.lublin.pl (K.K.); koprukowniak.i@gmail.com (I.N.); dominik.sz wajgier@up.lublin.pl (D.S.); ewa.baranowska@up.lublin.pl (E.B.-W.); adam.wasko@up.lublin.pl (A.W.)

² Chair and Department of Human Physiology, Medical University of Lublin, Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin, Poland; monikaprendeckawrobel@umlub.pl (M.P.-W.); dominika.pigon-zajac@umlub.pl (D.P.-Z.)

* Correspondence: magdalena.polak-berecka@up.lublin.pl; Tel.: +48-81-462-33-56

Abstract: The biological activity of an in vitro digested infusion of *Epilobium angustifolium* (fireweed) was examined in a model system of intestinal epithelial and colon cancer tissues. The content of selected phenolic compounds in the digested aqueous extract of fireweed was determined using HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. Biological activity was examined using the human colon adenocarcinoma cell lines HT-29 and CaCo-2 and the human colon epithelial cell line CCD 841 CoTr. Cytotoxicity was assessed by an MTT assay, a Neutral Red uptake assay, May-Grünwald-Giemsa staining, and a label-free Electric Cell-Substrate Impedance Sensing cytotoxicity assay. The effect of the infusion on the growth of selected intestinal bacteria was also examined. The extract inhibited the growth of intestinal cancer cells HT-29. This effect can be attributed to the activity of quercetin and kaempferol, which were the most abundant phenolic compounds found in the extract after in vitro digestion. The cytotoxicity of the fireweed infusion was dose-dependent. The highest decrease in proliferation (by almost 80%) compared to the control was observed in HT-29 line treated with the extract at a concentration of 250 µg/mL. The fireweed infusion did not affect the growth of beneficial intestinal bacteria, but it did significantly inhibit *E. coli*. The cytotoxic effect of the fireweed extract indicates that it does not lose its biological activity after in vitro digestion. It can be concluded that the fireweed infusion has the potential to be used as a supporting agent in colon cancer therapy.

Keywords: colon cancer; *Epilobium angustifolium*; in vitro digestion; polyphenols; plant extracts; ECIS; cytotoxicity; impedance



Citation: Kowalik, K.; Polak-Berecka, M.; Predecka-Wróbel, M.; Pigoń-Zajac, D.; Niedźwiedz, I.; Sz wajgier, D.; Baranowska-Wójcik, E.; Waśko, A. Biological Activity of an *Epilobium angustifolium* L. (Fireweed) Infusion after In Vitro Digestion. *Molecules* **2022**, *27*, 1006. <https://doi.org/10.3390/molecules27031006>

Academic Editor: Lillian Barros

Received: 12 January 2022

Accepted: 28 January 2022

Published: 2 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Epilobium angustifolium (*Chamerion angustifolium*), also known as fireweed or willow herb, is a plant that belongs to the *Onagraceae* family [1]. This family includes over 200 species. Other well-known and well-described plants of this family include *Epilobium hirsutum* L. and *Epilobium parviflorum* Schreb. [2]. Fireweed is a plant with a circumpolar range. It grows in Europe, Asia, and North America. It is a medicinal plant used in traditional medicine around the world for healing numerous diseases. Externally, it is administered as an antiseptic, an anti-inflammatory agent, and a wound-healing agent. It is also used internally in the treatment of diseases of the digestive tract and the prostate [3].

The traditional use is reflected in scientific research, which shows that fireweed has antibacterial properties against a variety of gram-negative and gram-positive bacteria and therapeutic properties against benign prostatic hyperplasia (BPH). BPH is a chronic disease which affects men over 50 years of age [4]. In this condition, there is a non-cancerous enlargement of the prostate gland due to hyperproliferation of stromal and epithelial cells.

It is commonly thought that the causes of BPH are associated with the androgen level, aging, and inflammation. Fireweed extracts have been shown to exhibit potent anti-BPH activity in vitro as assessed using the LNCap and BPH-1 cell lines [5].

Extracts from various species of *Epilobium* display numerous therapeutic properties, including antifungal, antimicrobial, antiproliferative, anti-inflammatory, antiandrogenic, and antioxidant effects [6,7]. Phenolic compounds, such as dolicol, triterpenoids, polyprenols, and ellagitannins, are found in extracts from these plants [8]. Alcohol extracts contain kaempferol, quercetin, myricetin, afzelin, juglalin, guajaverin, and oenothien B [9]. Oenothien B is a macrocyclic ellagitannin which shows many therapeutic properties. It reduces prostate-specific antigen (PSA) secretion in LNCaP cells, activates NK cells and T cells (giving rise to an increased expression of the activation marker), shows antibacterial activity against *Helicobacter pylori*, inhibits IL-1 β and IL-6 production by activated dendritic cells, and attenuates neuroinflammation in response to LPS treatment [10]. In addition to medicines and nutraceuticals based on *E. angustifolium*, the most commonly consumed form of fireweed is a hot aqueous infusion [11], which is why we used an aqueous extract as the biological material in the present study.

There are few reports on the biological activity of phytonutrients from fireweed extracts, as tested in animal cell lines from the large intestine. This concerns both normal and cancer tissues. The only existing reports concern a dietary supplement that contains extracts of three *Epilobium* species. The effect of this supplement was tested on mouse colon cancer (C26 cell line). These studies confirm that these extracts can influence in vitro colorectal cell growth, cytoskeleton reorganization, and E-cadherin expression [12]. It is very important to investigate the effects of plant extracts on colon tissues, because colorectal cancer is one of the most common cancers in women and men, and its incidence continues to increase [13]. Worldwide, this cancer occurs in 614,000 cases per year in women, making it the second most common cancer in women. In contrast, it is the third most common cancer in men, causing 746,000 new cases per year. Incidence rates in less developed countries are lower by 9000 cases per year than in more developed countries. In contrast, mortality in less developed countries is higher (52% of total deaths), resulting in a low percentage of 5-year patient survival [14]. There are many risk factors for this cancer, one of which is poor diet. Digestive tract cancers are very sensitive to nutritional factors. This is particularly true of colorectal cancer, in which diet is responsible for most cases of the illness. The food people eat and the ways in which it is produced, processed, and preserved can affect human health. Therefore, diet plays a key role in cancer prevention [15]. Treatment options for colorectal cancer include surgery, chemotherapy, and targeted therapy. Recently, more and more patients are turning to herbal medicines because of their therapeutic effects. In our experiments, we study plant extracts because there is much evidence that cancer cells are sensitive to substances of plant origin. Examples of such plants are *Prunella vulgaris* L., *Salvia fruticosa* L., and *Salvia officinalis* L. Active substances, which are isolated from plants, are characterized by different mechanisms of anti-cancer activity, e.g., inhibition of nucleic acid synthesis or the clumping and destruction of cancer cells [16–18].

There is still scarce information in the scientific literature about the content of bioactive compounds in fireweed extract after intestinal digestion and the biological activity of the digested extract. In our previous work, we reported a quantitative and qualitative characterization of the phenolic compounds found in a water extract of fireweed at various stages of in vitro gastrointestinal digestion [19]. In this current study, we present quantitative determinations of selected bioactive polyphenolic compounds such as quercetin glucuronide, guajaverin, afzelin, neochlorogenic acid, kaempferol glucoside, chlorogenic acid, isoquercetin, and hyperin gallate in a fireweed extract after in vitro digestion.

The aim of our experiments was to investigate the biological activity of an *Epilobium angustifolium* infusion after in vitro digestion in a model system of intestinal epithelial tissues. Moreover, the morphological and functional status of Caco-2 cells exposed to various concentrations of the fireweed extract was analyzed using a label-free Electric Cell-Substrate Impedance Sensing assay. In vitro digestion and cell line studies provide a

more precise picture of how fireweed works after ingestion, because this approach more accurately reflects the real environment of the human body. This is the first work that provides a comprehensive evaluation of fireweed extract and its effects on the human enterocyte and colon cancer cell lines.

2. Results

2.1. Chemical Characterization

The quantitative analysis was carried out for selected main compounds contained in the fireweed extract subjected to gastric and intestinal digestion. The measurements were made by comparing the measured surface areas with the surface areas of the standards. Twenty-six dominant compounds from the group of phenolic acids, flavonoids, organic acids and ester derivatives of glucosides have been identified, i.e., Citric acid, Gallic acid, Vanillic acid isomer, Galloyl-glucose, Digalloylglucose, Hydroxybenzoic acid isomer, Trigalloylglucose, Neochlorogenic acid, Hydroxybenzoic acid isomer, Coumaroyl-quinic acid isomers, Chlorogenic acid, Ferulic acid, Quercetin glucuronide, Vanillic acid isomer, Myricetin hexoside, Hyperin gallate, Myricetin glucuronide, Isoquercetin, Quercetin glucoside, Guaiaverin (quercetine arabinofuranoside), Kaempferol glucoside, Kaempferol glucuronide, Hydroxybenzoic acid isomer, Ferulic acid, Afzelin (kaempferol rhamnoside), and Caffeic acid.

The eight compounds listed in the table below were present in significant amounts. They all belonged to the group of polyphenols with a broad spectrum of anti-cancer activities (Table 1). Table 2 shows the percentage of individual compounds in the extract from *Epilobium angustifolium* L. before and after in vitro digestion.

Table 1. The content of the individual compounds (in µg/mL) in the extract from in vitro digested *Epilobium angustifolium* L. The determination was performed using a high-resolution mass spectrometer coupled with a high-performance liquid chromatograph (HPLC-ESI-Q-TOF-MS).

Name of Substance	Content in µg/mL after Digestion
Quercetine glucuronide	593.0
Giaverin	212.7
Afzelin	148.2
Neochlorogenic acid	37.3
Kaempferol glucoside	24.9
Chlorogenic acid	20.8
Isoquercetin	15.6
Hyperin gallate	15.5

Table 2. The percentage of individual compounds in the extract from *Epilobium angustifolium* L. before and after in vitro digestion. The determination was performed using a high-resolution mass spectrometer coupled with a high-performance liquid chromatograph (HPLC-ESI-Q-TOF-MS). SD—standard deviation and RSD—relative standard deviation (in percent) of the results.

Name of Substance	Before Digestion	SD	RSD	After Digestion	SD	RSD
Neochlorogenic acid	0.28796	0.00434	1.5	0.00370	0.00012	3.4
Chlorogenic acid	0.09889	0.00279	2.8	0.00239	0.00009	3.8
Isoquercetin	0.44318	0.01478	3.3	0.00149	0.00013	8.8
Kaempferol glucoside	0.59884	0.06533	10.9	0.00252	0.00007	2.8
Hyperin gallate	1.48623	0.02287	1.5	0.00236	0.00008	3.6
Quercetine glucuronide	4.75316	0.09163	1.9	0.06274	0.00058	0.9
Giaverin	0.71688	0.01206	1.7	0.02349	0.00004	0.2
Afzelin	1.11672	0.03015	2.7	0.02849	0.00062	2.2

2.2. Experiments on Animal Cell Lines

2.2.1. MTT Assay

In this experiment, the aqueous extract tested was administered to a cancer and normal cell culture (HT-29, CCD 841 CoTr) at the following concentrations: 25 µg/mL,

50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL, 200 µg/mL, and 250 µg/mL. Changes in cell viability and proliferation were monitored. The results showed that the *Epilobium angustifolium* L. extract practically did not affect the viability of the cells; only at the highest concentration could statistically significant differences from the control be noticed. We can observe a 20% decrease in cell viability compared to the control. The extracts did not cause statistically significant decreases in the viability of the normal cell line after 24 h treatment, even at the highest concentrations used (Figure 1).

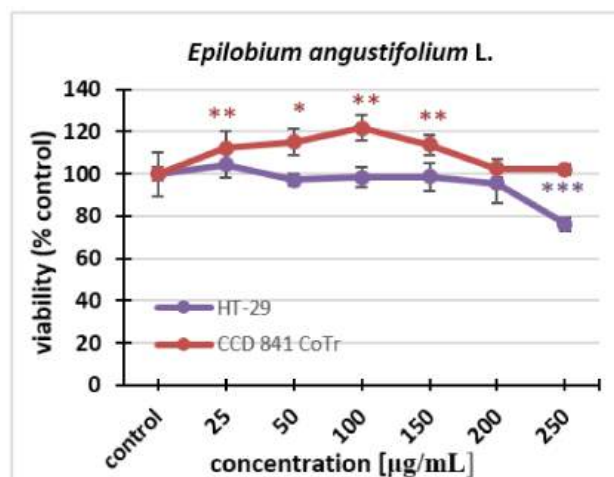


Figure 1. The effect of the fireweed extract on the viability of HT-29 and CCD 841 CoTr cells analyzed after 24 h using the MTT assay. The values are compared to the control (100% viability); * $p < 0.01$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA, Dunnett's test.

With regard to proliferation, statistically significant differences could be seen for both cell lines. The effect was dose-dependent. Fireweed inhibited the proliferation of the HT-29 line. This was observed even at the lowest concentration. In contrast, at a concentration of 250 µg/mL, the extract caused a decrease in proliferation to 27% compared to the control. The fireweed extract stimulated cell division of the normal cell line. Significant differences could already be seen after 96 h treatment at the concentration of 50 µg/mL, while at the highest concentration, there was an increase in proliferation up to 128% compared to the control (Figure 2).

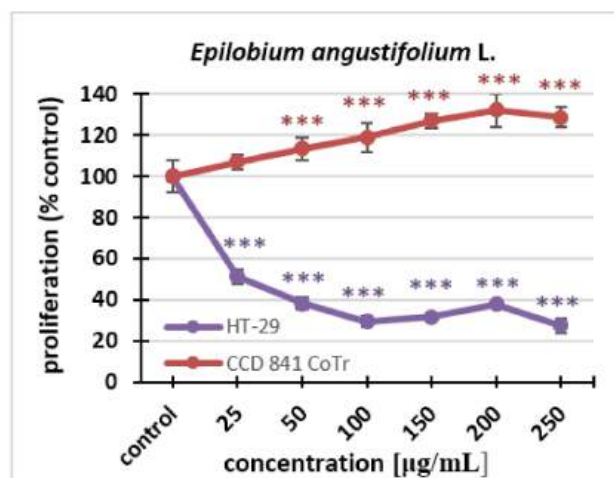


Figure 2. The influence of the *Epilobium angustifolium* L. extract on the proliferation of HT-29 and CCD 841 CoTr cells analyzed after 96 h using the MTT assay. The values are compared to the control (100% proliferation); *** $p < 0.001$, one-way ANOVA, Dunnett's test.

2.2.2. Neutral Red (NR) Uptake Assay

The cytotoxicity of the fireweed extract against the HT-29 and CCD 841 CoTr cell lines was investigated using the NR uptake test. Fireweed extract concentrations of 25–250 µg/mL were used. The effect of the extract was dose-dependent for both lines. Cell viability decreased in the same way in both HT-29 and CCD 841 CoTr cells. Statistically significant differences in the decrease in viability could be seen at the concentration of 150 µg/mL. The final concentration of the extract caused a decrease in the number of viable cells to 50% in the cancer line and to 58% in the normal line (Figure 3).

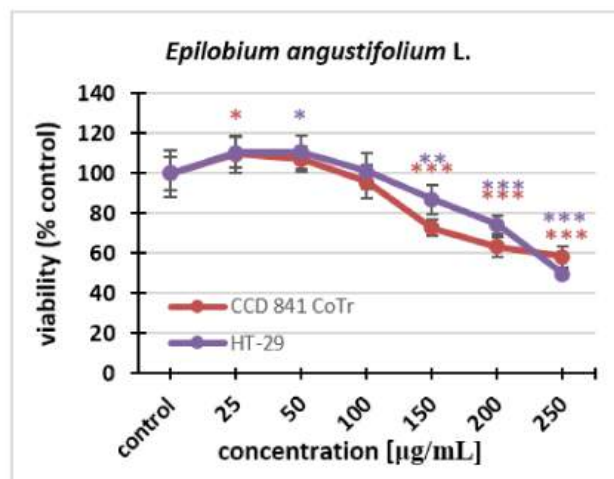


Figure 3. Cytotoxicity of the fireweed extract on HT-29 and CCD 841 CoTr cell lines was determined using the neutral red (NR) uptake assay. The values are compared to the control (100% viability); * $p < 0.01$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA, Dunnett's test.

2.2.3. May–Grünwald–Giemsa Staining

The staining experiment was performed to confirm the results of the spectrophotometric test (MTT assay). The cancer cell line HT-29 and the normal cell line CCD 841 CoTr as well as the fireweed extract at concentrations of 100 and 250 µg/mL were used. Cancer cell morphology changed after incubation with the extract (250 µg/mL) compared to the control. In the control and at the fireweed extract concentration of 100 µg/mL, a large number of clustered cells were observed; the cytoplasm and cell nuclei were very clearly visible. When a concentration of 250 µg/mL was used, much fewer cells were visible, and they did not tend to clump together. It was very difficult to distinguish between the cell nucleus and the cytoplasm because the cells changed their shape. Normal cell morphology looked similar in the control and after incubation with the extract. Spindle-shaped cells were clearly discernible. One could easily discriminate between the cytoplasm and the cell nuclei. At a higher concentration, the number of cells decreased (Figure 4).

2.2.4. Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)

The ECIS system is used to detect and quantify morphological changes. When cells are stimulated with test substances, changes occur in their metabolism and functionality, which directly lead to changes in the impedance, resistance, and capacitance recorded by the device. In the present experiment, the in vitro digested fireweed extract was administered to the CaCo-2 cell culture run in the ECIS system at the following concentrations: 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL, 200 µg/mL, and 250 µg/mL. Changes in impedance, resistance, and capacitance in the cell culture were monitored over a period of 200 h. The growth medium was not changed throughout the time of the experiment, and the environment and the measurement conditions were kept constant. The graphs show the concentrations with the largest differences (Figure 5).

In the case of the initial concentrations up to 100 $\mu\text{g/mL}$, differences in the impedance values were found between the control cell culture and cells treated with the fireweed extract. Over the first 24 h of cultivation, before the in vitro digested fireweed extract was added to the test culture, the impedance values for both cultivation variants remained relatively similar. After 60 h into the measurement, a significant difference in impedance was noted: about 800 Ohms for cells in the control culture and 500 Ohms for the test culture. Up to 140 h, the growth of both cultures stabilized, and only after 150 h did the impedance in the control culture increase to 1000 Ohm, while in the culture with the addition of the test substance, it remained relatively stable at about 700 Ohm. The data obtained lead to the conclusion that the capacitance in the control cultures decreased slightly more and reached the lowest value of about 5–10 nF between 40 and 200 h. A clear downward trend in impedance and resistance values could be observed with the increasing fireweed extract concentration. This may indicate that as the concentration of the fireweed extract increased, the cells were able to absorb larger amounts of it. In other words, the higher the concentration of the in vitro digested fireweed extract, the greater was its absorbability and the clearer was the manifestation of changes in the electrical parameters.

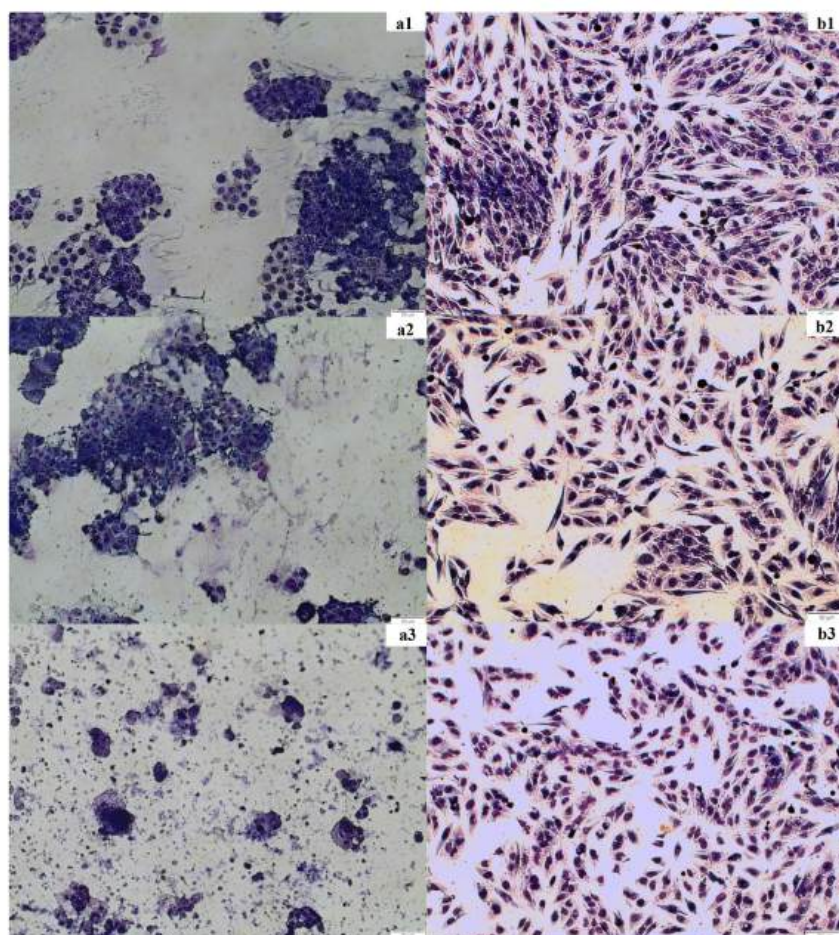


Figure 4. Changes in the morphology and number of HT-29 and CCD 841 CoTr cells under the influence of fireweed extract. Images were taken using a MOTIC AE31E series light microscope, magnification $100\times$ g. (a1)—control, HT-29; (a2)—100 $\mu\text{g/mL}$, HT-29; (a3)—250 $\mu\text{g/mL}$, HT-29 and (b1)— control, CCD 841 CoTr; (b2)—100 $\mu\text{g/mL}$, CCD 841 CoTr; (b3)—250 $\mu\text{g/mL}$, CCD 841 CoTr.

2.2.5. Antimicrobial Properties

The optical density experiment was carried out using six strains of Gram-negative and Gram-positive bacteria: *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Bifidobacterium adolescentis*, and *Bifidobacterium longum*. The

in vitro digested fireweed extract was added to the cultures at the concentrations of 16, 32, 64, 128, and 250 $\mu\text{g/mL}$. It can be seen from the results that the fireweed extract did not cause changes in the growth of *L. rhamnosus*, *E. cloacae*, *B. longum*, and *B. adolescentis*; their OD_{600} did not change under the influence of the extract and was practically the same as in the control. The fireweed extract stimulated the growth of *E. faecalis*. The OD_{600} for this bacterium at the highest fireweed extract concentration was twice as high as in the control, while the doubling time of the generation was almost twice as low. On the other hand, in the case of *E. coli*, bacterial growth was inhibited by fireweed extract and its generation time was almost doubled compared to the control (Table 3). After analyzing the results obtained, it can be concluded that the best antimicrobial concentration is a concentration of 64 $\mu\text{g/mL}$, because maxOD_{600} of *E. coli* is twice as low compared to the control. In contrast, the growth stimulation of *E. faecalis* is still insignificant.

Table 3. Antimicrobial effect of in vitro digested extract of *Epilobium angustifolium* L. Experiment performed using the Bioscreen C reader. The results were analyzed in Python 3.9.7.

Strain	Concentration of Fireweed Extract [$\mu\text{g/mL}$]	Lag Time (h)	Doubling Time (h)	Min OD	Max OD	Effect on Bacterial Growth
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Control *	12.12	3.24	0.43	1.99	no differences in growth
	16	14.97	3.58	0.38	1.91	
	32	14.78	3.50	0.40	1.94	
	64	14.86	3.51	0.40	1.95	
	128	13.96	3.88	0.39	1.95	
	250	13.14	3.75	0.41	1.98	
<i>Enterococcus faecalis</i>	Control *	7.46	10.20	0.19	0.61	stimulation of growth
	16	7.26	10.74	0.19	0.60	
	32	6.47	10.38	0.18	0.76	
	64	6.47	11.75	0.18	0.77	
	128	5.30	8.97	0.19	1.07	
	250	7.28	6.18	0.18	1.35	
<i>Enterobacter cloacae</i>	Control *	0.52	5.47	0.19	1.29	no differences in growth
	16	0	6.25	0.27	1.20	
	32	0	5.92	0.19	1.17	
	64	0	5.67	0.14	1.17	
	128	0	6.42	0.19	1.20	
	250	0	6.05	0.22	1.32	
<i>Escherichia coli</i>	Control *	0	14.85	0.20	1.41	MIC-64 $\mu\text{g/mL}$
	16	0	16.10	0.22	1.05	
	32	0	15.96	0.24	1.07	
	64	0	20.21	0.22	0.84	
	128	0	16.74	0.19	0.83	
	250	0	25.12	0.25	0.87	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Control *	4.53	33.25	0.30	0.78	no differences in growth
	16	6.98	38.41	0.28	0.67	
	32	2.77	40.73	0.24	0.69	
	64	9.15	42.12	0.25	0.70	
	128	3.77	39.43	0.28	0.74	
	250	0	93.21	0.39	0.69	
<i>Bifidobacterium longum</i>	Control *	4.66	34.13	0.27	0.75	no differences in growth
	16	5.72	46.14	0.25	0.64	
	32	8	52.48	0.26	0.63	
	64	6.72	41.14	0.25	0.63	
	128	0	48.85	0.26	0.61	
	250	0	73.18	0.27	0.53	

* Control—bacterial growth control without test extract.

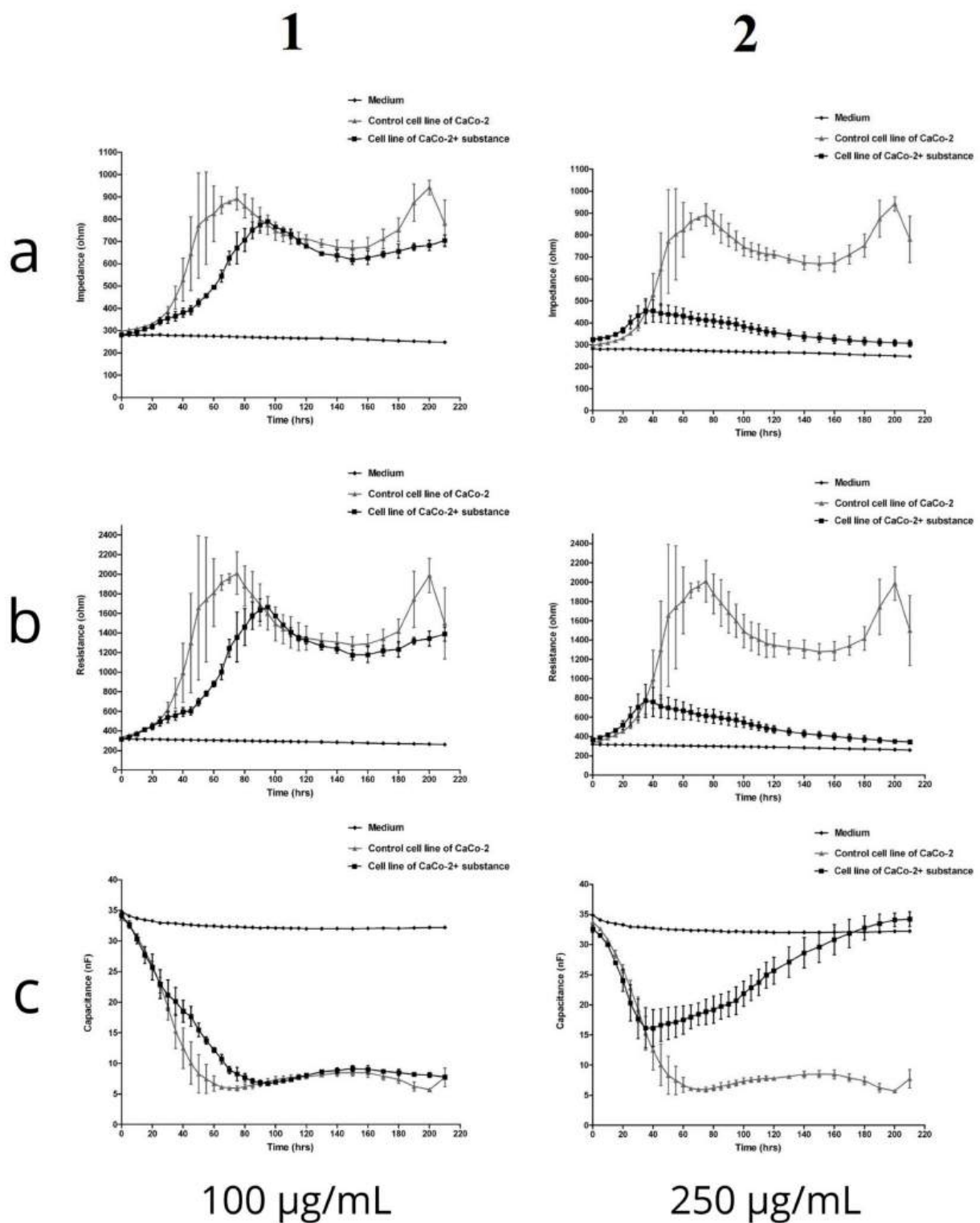


Figure 5. Changes in the impedance, resistance, and capacitance of CaCo-2 cells after incubation with the in vitro digested fireweed extract: (a1)—impedance, (b1)—resistance, and (c1)—capacitance, concentration: 100 µg/mL; (a2)—impedance, (b2)—resistance, and (c2)—capacitance, concentration: 250 µg/mL. The experiment was conducted in the ECIS system.

3. Discussion

Our previous work shows that fireweed infusion is rich in phenolic compounds, with flavonoids being the most abundant at 53.04 ± 1.24 mg quercetin/g of the freeze-dried infusion. The HPLC-MS analysis confirmed the presence of phenolic acids (e.g., gallic, vanillic, hydroxybenzoic, ferulic, and chlorogenic acids), flavonoid glucosides (e.g., quercetin, kaempferol, and myricetin derivatives), and galloyl glucose derivatives. However, we did not ascertain the presence of oenothien B, which is unique to fireweed, which could have resulted from the fact that we used water for the infusion instead of organic solvents [19]. Other authors also reported that fireweed is rich in polyphenols. Kosalec et al. (2008) Ref [4] showed that ethanol extracts from fireweed flowers and leaves were rich in phenol derivatives— $10.04 \pm 0.35\%$ and $12.96 \pm 0.32\%$ of dry weight, respectively. Previously, in various *E. angustifolium* extracts, certain compounds have been detected, such as ellagitannin, oenothien B, well-known and widely distributed polyphenols such as kaempferol, quercetin, myricetin, and their derivatives, phenolic acids (ellagic, chlorogenic, p-coumaric, gallic, protocatechuic, gallic, cinnamic, caffeic, and ferulic acids), valoneic acid dilactone, terpene compounds, and other substances [20,21]. It is these compounds that are responsible for the beneficial effects of *E. angustifolium*, including its antioxidant, anti-inflammatory, inhibitory enzyme, antitumor, antimicrobial, and immunomodulatory activities, as confirmed in in vitro and in vivo studies [5].

In this work, we were especially interested in the quantification of the bioactive compounds present in a fireweed infusion after in vitro digestion. We identified quercetin glucuronide, guaiaverin, and afzelin as quantitatively dominant compounds, and zeochlorogenic acid, kaempferol glucoside, chlorogenic acid, isoquercetin, and hyperin gallate as compounds present in smaller quantities (at a similar level). Comparing these results with our previous study, in which we had determined the content of phenolic compounds in a fireweed infusion (prepared with the same method) [19], we found that all the polyphenolic compounds we identified in the present study had also occurred in *E. angustifolium* water extract before in vitro digestion. However, we observed a decrease in the total polyphenolic content during the small intestinal digestion phase [19]. Similarly, Dacrema et al. [21] reported a drop in the content of individual polyphenolic compounds after in vitro digestion of fireweed extract. They observed a loss of individual polyphenolic compounds after the orogastric phase in the range of 1.92–84.17%, and a 11.83–98.07% decrease after the duodenal phase. The loss of polyphenolic compounds during digestion seems indisputable, but it is important to point out that these authors also identified quercetin, kaempferol, and chlorogenic acid in fireweed extract after in vitro digestion. Some differences in the results of our study and Dacrema et al.'s work may be due to differences in the in vitro digestion procedures used.

Other authors who investigated extracts of *Epilobium* plants (*E. rosmarinifolium*, *E. spicatum*, and *E. tetragonum*) have observed growth-inhibitory effects in different human cell lines (PZ-HPV-7, normal prostate cells; LNCaP, transformed prostate cells; HMEC, mammary cells, and 1321N1, astrocytoma cells). They revealed that the kaempferol and quercetin present in *Epilobium* plants showed antiproliferative effects [22]. *Epilobium* species have well-described antioxidant and anti-inflammatory properties, which may enhance their anti-cancer effects [23]. Thus, in our experiment, the inhibition of the growth of the intestinal cancer cells HT-29 can be attributed to the activity of quercetin and kaempferol, which were the most abundant phenolic compounds in the fireweed extract after in vitro digestion. *Epilobium angustifolium* is well known for its therapeutic effects on prostate diseases and breast cancer [23,24]. However, to the best of our knowledge, its potential anti-proliferative and cytotoxic effects on human colon cancer cells have not been studied yet.

Plant extracts are complex matrices of compounds that tend to interfere with the label-dependent methods that are typically used for cytotoxicity screening, also the ones employed in this work. Therefore, we additionally applied a label-free ECIS-based cytotoxicity assay for the assessment of the cytotoxicity of the in vitro digested fireweed extract.

The impedance curves showed an overall concentration- and time-dependent toxic effect of the fireweed extract. As expected, lower concentrations (25 and 100 µg/mL) were less cytotoxic, while the higher concentrations (200 and 250 µg/mL) caused more acute effects, with impedance, measured during the first 60 h of the experiment, decreasing to around 50% compared to untreated cells. The cytotoxicity detected in the fireweed extract can be explained by the chemical composition of the infusion, which does not lose its biological activity after the in vitro digestion process. These observations are in line with the results we obtained using other, label-dependent cytotoxicity screening methods. There was a clear dose-dependency at the concentrations of 200 and 250 µg/mL. As the concentration increased, the impedance and resistance values fell. This may indicate that, at the higher concentrations, the cells absorbed more of the fireweed extract. Changes in electrical parameters reflect alterations in the morphological and functional state of the cell, which can also be observed after May-Grünwald-Giemsa staining. The physiological processes taking place in cells are mirrored by changes in morphology and, thus, also the effects of absorption of bioactive substances added to the culture. It can be concluded that the higher the concentration of the in vitro digested fireweed extract, the greater the absorbability and the clearer the manifestation of changes in electrical parameters. Our observations are confirmed by other studies which showed that extracts from *E. angustifolium* exerted an inhibitory effect on the proliferation of human cancer cell lines and inhibited DNA synthesis in human astrocytoma cells 1321N1 [25]. Moreover, an aqueous extract of *E. angustifolium* demonstrated a higher antiproliferative activity than ethanol extracts [26].

To the best of our knowledge, the influence of *Epilobium* plant extracts on the growth of lactic acid bacteria and human gut microbiome has not been studied yet. Our results clearly show that fireweed infusion does not adversely affect the growth of beneficial intestinal bacteria. However, a commensal strain of *E. coli* was significantly inhibited. This is consistent with the results of studies by other authors [27]. According to Bartfay et al. [3], *E. angustifolium* extracts display a higher antibacterial activity against *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa* than antibiotics. This is a very important observation in the light of the possibility of using fireweed infusion as a supporting agent in colon cancer therapy. The beneficial gut microbiota plays an essential role in regulating intestinal homeostasis. On the other hand, microbial dysbiosis and the emergence of colorectal-cancer-associated microorganisms, such as *E. coli*, can lead to intestinal disease and exert potentially carcinogenic effects on the host [28]. Taxonomic (16S rRNA gene-based) and metagenomic (pan-genomic-based) microbial sequence analyses have provided a clear link between bacteria, inflammation, and colorectal cancer [29,30]. Evidence from functional studies indicates that *E. coli* utilize a complex arsenal of virulence factors to colonize and persist in the intestine. Some of these virulence factors, such as genotoxin and colibactin, have been found to promote colorectal cancer in experimental models [28].

4. Materials and Methods

4.1. Materials

Plant Material

We obtained the plant material for research from the herbal company Polskie Zioła, Piaski Wielkie, Poland. Extraction was performed according to Kiss et al. [31] with slight modifications. A thirty-minute extraction with distilled water at a temperature of 90 °C was performed with the use of ultrasound for 10 min (1:10 plant-to-solvent ratio (*m/v*)). Then, the infusions were filtered and after cooling, subjected to in vitro digestion. Digested samples were centrifuged (10,700 × *g* for 30 min at 4 °C) and frozen at 80 °C for 24 h. Next, lyophilization was carried out in a Labconco freeze dryer (Labconco, Kansas City, MO, USA).

4.2. Qualitative and Quantitative Analysis of Samples by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS

This method was performed as described in our previous work [32].

4.3. *In Vitro* Gastrointestinal Digestion of Fireweed Infusion

In vitro digestion was performed as described in our previous work [32].

4.4. Cell Cultures

The human colon adenocarcinoma cell line HT-29 and the human colon epithelial cell line CCD 841 CoTr were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). HT-29 cells were grown in RPMI 1640 medium with 10% or 2% FBS. CCD841 CoTr cells were cultured in mixed media: RPMI 1640 and Dulbecco (DMEM) (1:1), with a 10% or a 2% addition of FBS. All media were supplemented with penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 mg/mL). The cells were maintained in standard conditions: temperature 37 °C (HT-29), 34 °C (CCD 841 CoTr), and 5% CO₂. CaCo-2 cells for Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS) were purchased from ATCC (ATCC HTB-37™, Manassas, VA, USA) and cultured according to the manufacturer's instructions. The cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 20% FBS Good HI (fetal bovine serum) and antibiotics—100 IU/mL Streptomycin/Penicillin/Amphotericin B. The process was carried out in a Galaxy 170R incubator under controlled growth conditions, constant humidity, and 5% CO₂ air saturation.

4.5. MTT Cytotoxicity Assay

The MTT assay was used to determine cell viability and proliferation. In the assay, the water-soluble yellow dye MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] is converted to insoluble purple formazan by the action of mitochondrial reductase [33]. The cells were seeded on 96-well microplates at a density of 1×10^5 cells/mL. The next day, the culture medium was removed, and the appropriate concentrations of the in vitro digested fireweed extract (25, 50, 100, 150, 200, and 250 µg/mL) in fresh medium were added to the cells. After a 24-h incubation with or without the examined extract, MTT solution (5 mg/mL in PBS) was added to the cells for 3 h. Next, SDS solution (10% SDS in 0.01N HCl) was added to all wells to stop the reaction and dissolve the resulting formazan crystals. After 24 h of incubation, the absorbance at $\lambda = 570$ nm was determined spectrophotometrically using a Varioskan™ LUX multimode microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The amount of formazan formed (color intensity), read spectrophotometrically, was directly proportional to the number of live, undamaged cells.

4.6. MTT Proliferation Assay

The MTT assay was used to determine cell proliferation. The experiment was carried out exactly as described above. The only two differences were the number of cells used (100 µL of 5×10^4 cells/mL) and the time of incubation of the cells with the in vitro digested fireweed extract (96 h).

4.7. Neutral Red (NR) Uptake Assay

This method was performed as described in work by Ates et al. [34]. The NR uptake method was used to determine cell viability. The test is based on the accumulation of NR in living lysosome cells. This process takes place by means of passive transport. Dead and damaged cells do not bind the dye. The cells were seeded on 96-well microplates at a density of 1×10^5 cells/mL. The next day, the culture medium was removed and the appropriate concentrations of the in vitro digested fireweed extract (25, 50, 100, 150, 200, and 250 µg/mL) in fresh medium were added to the cells. After a 24-h incubation, the culture media were removed, and NR (40 µg/mL) was added to the cells for 3 h at 37 °C. Next, all wells were rinsed with formalin (0.5% in 1% CaCl₂). After 2 min, extraction was performed for 20 min with shaking at room temperature, adding glacial acetic acid (1% in 50% ethanol). Thereafter, the absorbance at $\lambda = 550$ nm was determined spectrophotometrically using the Varioskan™ LUX multimode microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,

USA). The amount of the dye absorbed (color intensity), read spectrophotometrically, was directly proportional to the number of living, undamaged cells.

4.8. May-Grünwald-Giemsa Staining

In the May-Grünwald-Giemsa reaction, cells are stained violet-blue. This method was used to visualize the number and morphology of culture cells and how these parameters changed under the influence of the test extract. The staining was performed on 24-well plates ($1 \text{ mL } 1 \times 10^5 \text{ cells/mL}$). After a 24 h incubation, the culture medium was removed, and appropriate concentrations of the in vitro digested fireweed extract (25, 50, 100, 150, 200, and $250 \text{ } \mu\text{g/mL}$) in fresh medium were added to the cells. The next day, the culture media were removed, and the cells were stained with the May-Grünwald dye for 3 min. Then, deionized water was added, after which the liquid was removed. In the next step, the cells were stained with the Giemsa dye (dilution 1:20) for 30 min at room temperature. After this time, the dye was removed, and the wells were rinsed with deionized water and allowed to dry. Images were taken using the Motic® AE31 Elite inverted microscope (Motic Scientific, Richmond, BC, Canada).

4.9. Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)

An ECIS system Z θ instrument (Applied Biophysics Ltd., Troy, NJ, USA) was used to measure impedance, resistance, and capacitance. The system consists of two separate units: a docking station with two eight-well culture matrices, located inside the incubator, and a Z theta controller unit, located outside the incubator. For the experiment, 8W10E electrodes were used, which comprised eight wells and 10 active electrodes in each well. The matrix station is responsible for the additional signal processing and switching mechanism to change the measurement from one well to the next well. The device measures both resistance and capacitance over a wide range of alternating current frequencies. Moreover, the device only accepts signals of the same frequency as the source oscillator frequency and also eliminates most of the external electrical noise. The ECIS measuring electrodes were placed in the docking station in an incubator (Galaxy 170R) under controlled conditions of temperature ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) and carbonation (5% CO_2). The culture plates were then incubated for 24 h with the culture medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) overnight. After stabilization, the matrix was removed from the station and inoculated with cells. Matrix inoculation was performed using 600 microliters per well of the cell suspension of $\sim 1.2 \times 10^5 \text{ cells/mL}$. The in vitro digested fireweed extract was added to the inoculated wells at final concentrations of $25 \text{ } \mu\text{g/mL}$, $50 \text{ } \mu\text{g/mL}$, $100 \text{ } \mu\text{g/mL}$, $150 \text{ } \mu\text{g/mL}$, $200 \text{ } \mu\text{g/mL}$, and $250 \text{ } \mu\text{g/mL}$. After the cell culture had been supplemented with the test preparation, the culture plates were returned to the incubator and real-time measurements were started. The maximum response for Z, R, and C occurs at different frequencies by default. In our experiment, we used the default optimal frequencies: resistance (R) 4000 Hz, impedance (Z) 32,000 Hz, and capacitance (C) 64,000 Hz. Changes were recorded as impedance signals and the resulting data were processed using the ECIS software. The data generated were impedance/resistance/capacitance versus time.

4.10. Bacterial Strains and Culture Method

The bacterial species used in this study were selected to represent a diverse group of intestinal bacteria. Both Gram-positive and Gram-negative bacteria were selected, as well as microorganisms classified as beneficial and potentially pathogenic microflora. *Lactobacillus rhamnosus* B-445, *Enterococcus faecalis* JCM 1513, *Escherichia coli*, *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083, *Bifidobacterium longum* DSM 20088, and *Enterobacter cloacae* PCM 533 were used in this study. *L. rhamnosus* was cultured in MRS medium (OXOID LTD., Hampshire, UK), *E. faecalis* and *E. cloacae* in nutrient broth (BTL, Łódź, Poland), *E. coli* in LB broth (BTL, Łódź, Poland), and the *Bifidobacterium* strains were cultivated in modified Garche's medium containing peptone, 20 g/L; lactose, 10 g/L; sodium acetate, 6 g/L; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$, 2.5 g/L; yeast extract, 2 g/L; KH_2PO_4 , 2 g/L; L-cysteine hydrochloride,

ride, 0.4 g/L; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.12 g/L; pH 6.4. All the test strains were incubated for twenty-four hours at 37 °C.

Effect on Bacterial Growth

The effect of the in vitro digested fireweed extract on the growth of the selected bacterial strains was determined by measuring the optical density (OD_{600}) in microcultures with a Bioscreen C system (LabSystem, Helsinki, Finland). Bacterial cultures were centrifuged and diluted in physiological saline to an optical density of 0.2 at 600 nm. Subsequently, 50 μL of the bacterial suspension was added into each well of a sterile 100-well Bioscreen plate containing 250 μL of the appropriate culture medium with the extract concentrations tested (16, 32, 64, 128, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively). Each concentration was tested in triplicate for each bacterium. Three wells containing a bacterial suspension with no fireweed extract (compound-free growth control) and three wells containing growth media alone (background control) were included in this plate. OD_{600} was measured for 48 h at 37 °C at 600 nm every 2 h for each well. To better determine the effect of fireweed extracts on individual gut bacteria growth curve parameters were determined using the PYTHON script according to Hoeflinger et al. [35]. Parameters such as lag time or doubling time, which determine changes in the time of adaptation of particular bacteria to environmental conditions and the length of generation time, were determined.

4.11. Statistical Analysis

The results of the experiments were collated in MS Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA). Statistical data were analyzed with a one-way ANOVA test and post-hoc Dunnett's test (all columns compared to the control) using STATISTICA 13.3 (StatSoft, Cracow, Poland). This study used *p*-values to describe statistically significant data; * *p* < 0.01, ** *p* < 0.005, *** *p* < 0.001 were considered significant compared to control.

5. Conclusions

Our results revealed that *E. angustifolium* infusion still retained its biological properties after in vitro digestion. Despite the fact that the total amount of phenolic compounds in the fireweed infusion decreased after in vitro digestion, polyphenols such as quercetin or kaempferol, which are responsible for the cytotoxic effect of the extract on cancerous colon cells, still remained in it at a sufficiently high level. The fireweed infusion adversely affected the morphology and viability of colon cancer cells and inhibited the proliferation of the HT-29 line. The cytotoxic effect of the in vitro digested fireweed extract was dose- and time-dependent. Higher concentrations (200 and 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) caused the most acute cytotoxic effects. The fireweed infusion did not inhibit the growth of beneficial intestinal bacteria of the genera *Lactobacillus* or *Bifidobacterium*. However, a commensal strain of *E. coli* was significantly inhibited. Our work is the first to comprehensively investigate an in vitro digested fireweed extract and its cytotoxic effects on the human colon cancer cell lines. The results we obtained show that a fireweed infusion can be used as a factor supporting the therapy of colon cancer; however, the extract must be checked in normal cells and in animal models in order to evaluate its toxicity. Further investigations should be carried out on *E. angustifolium* extract-based food supplements, the results of which might support the use of *E. angustifolium* extract in the early stages of colorectal cancer.

Author Contributions: Conceptualization, M.P.-B. and A.W.; methodology, K.K., M.P.-B., and A.W. methodology, software, E.B.-W. and D.S.; investigation, K.K., M.P.-W., D.P.-Z., and I.N.; writing—original draft preparation, K.K. and M.P.-W.; writing—review and editing, M.P.-B.; visualization, K.K.; supervision, A.W.; project administration, M.P.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Project financed under the program of the Minister of Science and Higher Education under the name 'Regional Initiative of Excellence' in 2019–2022, project number 029/RID/2018/19 funding amount 11,927,330.00 PLN and from the Statutory Funds of the Medical University of Lublin (DS 24).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the *E. angustifolium* extracts are available from the authors.

References

- Battinelli, L.; Tita, B.; Evandri, M.G.; Mazzanti, G. Antimicrobial activity of *Epilobium* spp. extracts. *Il Farm.* **2001**, *56*, 345–348. [\[CrossRef\]](#)
- Ostrowska, H.; Oleshchuk, O.; Vannini, S.; Cataldi, S. *Epilobium angustifolium* L.: A medicinal plant with therapeutic properties. *EuroBiotech J.* **2017**, *1*, 126–131. [\[CrossRef\]](#)
- Bartfay, W.J.; Bartfay, E.; Johnson, J.G. Gram-negative and gram-positive antibacterial properties of the whole plant extract of willow herb (*Epilobium angustifolium*). *Biol. Res. Nurs.* **2012**, *14*, 85–89. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kosalec, I.; Kopjar, N.; Kremer, D. Antimicrobial activity of willowherb (*Epilobium angustifolium* L.) leaves and flowers. *Curr. Drug Targets* **2013**, *14*, 986–991. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Deng, L.; Zong, W.; Tao, X.; Liu, S.; Feng, Z.; Lin, Y.; Liao, Z.; Chen, M. Evaluation of the therapeutic effect against benign prostatic hyperplasia and the active constituents from *Epilobium angustifolium* L. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *232*, 1–10. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hevesi Tóth, B.; Blazics, B.; Kéry, Á. Polyphenol composition and antioxidant capacity of *Epilobium* species. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *49*, 26–31. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Vitalone, A.; Allkanjari, O. *Epilobium* spp: Pharmacology and phytochemistry. *Phyther. Res.* **2018**, *32*, 1229–1240. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Shikov, A.N.; Poltanov, E.A.; Dorman, H.J.D.; Makarov, V.G.; Tikhonov, V.P.; Hiltunen, R. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of commercial water-soluble willow herb (*Epilobium angustifolium* L.) extracts. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3617–3624. [\[CrossRef\]](#)
- Schepetkin, I.A.; Ramstead, A.G.; Kirpotina, L.N.; Voyich, J.M.; Jutila, M.A.; Quinn, M.T. Therapeutic potential of polyphenols from *Epilobium angustifolium* (Fireweed). *Phyther. Res.* **2016**, *30*, 1287–1297. [\[CrossRef\]](#)
- Schepetkin, I.A.; Kirpotina, L.N.; Jakiw, L.; Khlebnikov, A.I.; Blaskovich, C.L.; Jutila, M.A.; Quinn, M.T. Immunomodulatory activity of oenothien B isolated from *Epilobium angustifolium*. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 6754. [\[CrossRef\]](#)
- Sökand, R.; Mattalia, G.; Kolosova, V.; Stryamets, N.; Prakofjewa, J.; Belichenko, O.; Kuznetsova, N.; Minuzzi, S.; Keedus, L.; Prüse, B.; et al. Inventing a herbal tradition: The complex roots of the current popularity of *Epilobium angustifolium* in Eastern Europe. *J. Ethnopharmacol.* **2020**, *247*, 112254. [\[CrossRef\]](#)
- Zunino, V.; Meineri, G.; Bellone, G.; Vizio, B.; Prati, A.; Grandi, M.; Radice, E.; Dal Bello, F.; Medana, C. Alcoholic extracts of *Epilobium*, *Urtica dioica* and *Evernia prunastri* with 5-fluorouracil in controlling murine colon carcinoma cell growth in vitro. *Orient. Pharm. Exp. Med.* **2017**, *17*, 325–336. [\[CrossRef\]](#)
- Soleymani, J.; Hasanzadeh, M.; Somi, M.H.; Shadjou, N.; Jouyban, A. Highly sensitive and specific cytosensing of HT 29 colorectal cancer cells using folic acid functionalized-KCC-1 nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *132*, 122–131. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Tariq, K.; Ghias, K. Colorectal cancer carcinogenesis: A review of mechanisms. *Cancer Biol. Med.* **2016**, *13*, 120–135. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- O’Keefe, S.J.D. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *13*, 691–706. [\[CrossRef\]](#)
- Huang, M.; Wang, Y.; Xu, L.; You, M. Anti-tumor properties of *Prunella vulgaris*. *Curr. Pharmacol. Rep.* **2015**, *1*, 401–419. [\[CrossRef\]](#)
- Xavier, C.P.R.; Lima, C.F.; Fernandes-Ferreira, M.; Pereira-Wilson, C. *Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis*, and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: The role in MAPK/ERK pathway. *Nutr. Cancer* **2009**, *61*, 564–571. [\[CrossRef\]](#)
- Guo, Y.; Wu, R.; Gaspar, J.M.; Sargsyan, D.; Su, Z.Y.; Zhang, C.; Gao, L.; Cheng, D.; Li, W.; Wang, C.; et al. DNA methylome and transcriptome alterations and cancer prevention by curcumin in colitis-accelerated colon cancer in mice. *Carcinogenesis* **2018**, *39*, 669–680. [\[CrossRef\]](#)
- Szwajgier, D.; Baranowska-Wójcik, E.; Kukula-Koch, W.; Kowalik, K.; Polak-Berecka, M.; Waśko, A. Evolution of the anti-cholinesterase, antioxidant, and anti-inflammatory activity of *Epilobium angustifolium* L. infusion during in vitro digestion. *J. Funct. Foods* **2021**, *85*, 104645. [\[CrossRef\]](#)
- Baert, N.; Kim, J.; Karonen, M.; Salminen, J.P. Inter-population and inter-organ distribution of the main polyphenolic compounds of *Epilobium angustifolium*. *Phytochemistry* **2017**, *134*, 54–63. [\[CrossRef\]](#)
- Dacrema, M.; Sommella, E.; Santarcangelo, C.; Bruno, B.; Marano, M.G.; Insolia, V.; Saviano, A.; Campiglia, P.; Stornaiuolo, M.; Daglia, M. Metabolic profiling, in vitro bioaccessibility and in vivo bioavailability of a commercial bioactive *Epilobium angustifolium* L. extract. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *131*, 110670. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Vitalone, A.; McColl, J.; Thome, D.; Costa, L.G.; Tita, B. Characterization of the effect of *Epilobium* extracts on human cell proliferation. *Pharmacology* **2003**, *69*, 79–87. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kia, B.H.; Nourini, S.K.; Kakhki, M.R.V. The extracts of *Epilobium parviflorum* inhibit MCF-7 breast cancer cells. *Iran. J. Toxicol.* **2021**, *15*, 65–72. [\[CrossRef\]](#)

24. Kiss, A.; Stolarczyk, M.; Piwowarski, J.P.; Granica, S. Effects of standardized extracts from *Epilobium* sp. herbs on of hormone-dependent prostate cancer cells (LNCaP)-searching for active compounds. *Pharmacol. Rep.* **2013**, *65*, 13. [[CrossRef](#)]
25. Granica, S.; Piwowarski, J.P.; Czerwińska, M.E.; Kiss, A.K. Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different *Epilobium* species (Onagraceae): A review. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *156*, 316–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Tita, B.; Abdel-Haq, H.; Vitalone, A.; Mazzanti, G.; Saso, L. Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test. *Il Farm.* **2001**, *56*, 341–343. [[CrossRef](#)]
27. Nowak, A.; Cybulska, K.; Makuch, E.; Kucharski, Ł.; Różewicka-Czabańska, M.; Prowans, P.; Czapla, N.; Bargiel, P.; Petriczko, J.; Klimowicz, A. In vitro human skin penetration, antioxidant and antimicrobial activity of ethanol-water extract of fireweed (*Epilobium angustifolium* L.). *Molecules* **2021**, *26*, 329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Allen-Vercoe, E.; Jobin, C. Fusobacterium and Enterobacteriaceae: Important players for CRC? *Immunol. Lett.* **2014**, *162*, 54–61. [[CrossRef](#)]
29. Wang, T.; Cai, G.; Qiu, Y.; Fei, N.; Zhang, M.; Pang, X.; Jia, W.; Cai, S.; Zhao, L. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J.* **2012**, *6*, 320–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Jobin, C. Colorectal cancer: Looking for answers in the microbiota. *Cancer Discov.* **2013**, *3*, 384–387. [[CrossRef](#)]
31. Kiss, A.K.; Bazylko, A.; Filipek, A.; Granica, S.; Jaszewska, E.; Kiarszys, U.; Kośmider, A.; Piwowarski, J. Oenothlein B's contribution to the anti-inflammatory and antioxidant activity of *Epilobium* sp. *Phytomedicine* **2011**, *18*, 557–560. [[CrossRef](#)]
32. Szwajgier, D.; Paduch, R.; Kukuła-Koch, W.; Polak-Berecka, M.; Waśko, A. Study on biological activity of bread enriched with natural polyphenols in terms of growth inhibition of tumor intestine cells. *J. Med. Food* **2020**, *23*, 181–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P.D. Analysis of cell viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**, *2018*, 469–471. [[CrossRef](#)]
34. Ates, G.; Vanhaecke, T.; Rogiers, V.; Rodrigues, R.M. Assaying cellular viability using the neutral red uptake assay. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1601*, 19–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hoeflinger, J.L.; Hoeflinger, D.E.; Miller, M.J. A dynamic regression analysis tool for quantitative assessment of bacterial growth written in Python. *J. Microbiol. Methods* **2017**, *132*, 83–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Review

Biofortification of Mushrooms: A Promising Approach

Klaudia Słyszcz¹, Marek Siwulski² , Adrian Wiater³ , Michał Tomczyk⁴  and Adam Waśko^{1,*} 

¹ Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, Faculty of Food Science and Biotechnology, University of Life Sciences in Lublin, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland; klaudia.kowalik@up.lublin.pl

² Department of Vegetable Crops, Poznań University of Life Sciences, ul. Dąbrowskiego 159, 60-594 Poznań, Poland; marek.siwulski@up.poznan.pl

³ Department of Industrial and Environmental Microbiology, Institute of Biological Sciences, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin, Poland; adrian.wiater@mail.umcs.pl

⁴ Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy with the Division of Laboratory Medicine, Medical University of Białystok, ul. Mickiewicza 2a, 15-230 Białystok, Poland; michal.tomczyk@umb.edu.pl

* Correspondence: adam.wasko@up.lublin.pl

Abstract: Mushrooms exhibit a broad spectrum of pharmacological activities and are widely used for medical purposes and in nutrition. Numerous bioactive metabolites are responsible for these activities. Their distribution and biological effects differ depending on the fungal species and their chemical composition. Biofortification is a sustainable process that aims to improve the nutritional profile of food crops, as most of them are low in key nutrients. This review aims to delve into the process of fungal biofortification and review the most commonly used elements and species. Through biofortification, it is possible to combat hidden hunger, which affects as many as 2 billion people worldwide. “Hidden hunger” is a phenomenon in which the organism lacks the minerals and vitamins needed for development, growth, and good overall health. Mushrooms are increasingly being considered for biofortification due to their ability to accumulate various elements (both micro- and macroelements).

Keywords: biofortification; mushroom; hidden hunger; nutrition; humans



Citation: Słyszcz, K.; Siwulski, M.; Wiater, A.; Tomczyk, M.; Waśko, A. Biofortification of Mushrooms: A Promising Approach. *Molecules* **2024**, *29*, 4740. <https://doi.org/10.3390/molecules29194740>

Academic Editor: Alexandru Mihai Grumezescu

Received: 30 August 2024

Revised: 27 September 2024

Accepted: 5 October 2024

Published: 7 October 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Biofortification is a process of enriching mushrooms or plants with certain elements, by which the nutritional quality of food crops is improved through agronomic practices, conventional plant breeding, or modern biotechnology. It involves the accumulation or synthesis of nutrients at the source. The bioavailability of nutrients is a phenomenon linked to biofortification. Compared to standard fortification, biofortification can increase bioavailability. Biofortification can increase the bioavailability of nutrients by increasing the concentration of nutrients, changing chemical forms to ones that are more easily absorbed by the body, increasing the content of absorption enhancers such as polyphenols, and interacting with other nutrients that can synergistically promote the absorption of others [1]. The consumption of such enriched food is aimed at reducing the incidence of diseases caused by elemental deficiencies. This process provides an excellent way of producing the so-called functional food. It can contribute to the prevention of diseases and has a beneficial effect on health. The biofortification method has been recognised in recent years as one of the fastest, cheapest, and most natural methods that can improve the mineral richness of foods [2]. As far as plants are concerned, wheat, rice, fruit, potatoes, carrots, tomatoes, and lettuce can be improved with this method. In turn, a popular fungal species used in biofortification are mushrooms of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. In determining the potential for biofortification, the effects of the chemical form of the elements are studied. Their dosage and application routes, as well as the effects of single elements and their mixtures, are assessed. Biofortification should not

lead to a reduction in plant yield or quality [3]. Humans need at least 22 elements for proper development. Worldwide, around 2 billion people suffer from a lack of essential nutrients. This problem is related to the insufficient uptake of nutrients from soils and their consequent incorporation into the food chain [4]. One of the causes of the low mineral content in plants is the deficiency of minerals in soils where crops are grown. Another cause may be that nutrients in soils may be present in forms that are difficult to assimilate and inaccessible to plants or fungi. The World Health Organisation has programmes aimed at combating mineral deficiency, which is a direct cause of bodily dysfunction. The deficiency may also be the cause of a phenomenon known as ‘hidden hunger’. This problem affects approximately 28% of people worldwide [5]. Mushrooms are increasingly being considered for biofortification due to their ability to accumulate various elements. Therefore, they can be a good option for enriching foods with the micro- and macroelements necessary for the proper functioning of the human body [6]. During their growth period, mushrooms have the ability to absorb and bioaccumulate mineral elements in the form of organic molecules. Therefore, mushrooms can be used to supply nutrients that are not provided in the human diet in sufficient proportions. Some of these vital elements that mushrooms may bioaccumulate include iron, zinc, copper, selenium, etc. [7]. In general, the biofortification of mushrooms offers many benefits, such as a higher content of a particular element and improving the nutritional and biochemical profiles of the fungi (enhancement of antioxidant properties or improvement in the total protein content) [8]. Selenium-biofortified mushrooms have additional anticancer and antioxidant properties. The consumption of such mushrooms also brings benefits in the treatment and prevention of cardiovascular, neurodegenerative, and immunological diseases, HIV infection, cancer, or senescence [9]. Another source of highly available lithium with enormous potential is the enhanced *Pleurotus ostreatus* fungus. In comparison to psychiatric medications containing Li_2CO_3 , the high mineral content in fungal biomass was linked to a better availability being achieved after sequential extraction and in vitro digestion [10].

The analysis of researchers’ interest in the topic of fungi revealed that antioxidant properties, antimicrobial properties, and bioavailability of compounds were studied most comprehensively (Figure 1). Phenolic compounds, polysaccharides, and ergosterol turned out to be the most frequently investigated compounds. The biofortification of fungi with various micronutrients and macronutrients was of interest to researchers but to a somewhat lesser extent. Nevertheless, there was an evident upward trend and increasing interest in this topic over the years. *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *P. eryngii* (DC.) Quél, *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, and *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. are the most commonly analysed fungal species. The review explores the process of fungal biofortification, highlighting commonly used species and discussing recent advancements in technology for this purpose.

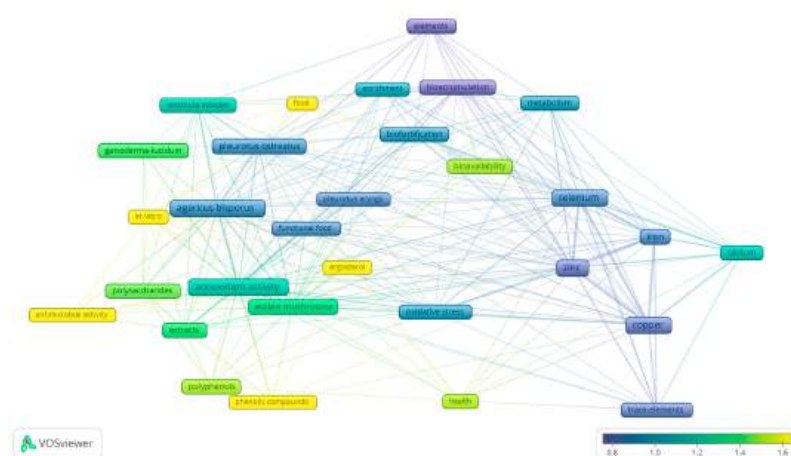


Figure 1. Visualisation of VOSviewer results on the biofortification of edible mushrooms published from December 2018 to January 2024, with key terms ‘biofortification’, ‘edible mushrooms’, ‘elements’, ‘antioxidant activity’, ‘functional food’, ‘nutrition’, and ‘nutritional compounds’.

2. Search Methodology

To conduct this systematic review, the specialised electronic databases PubMed, SCOPUS, EMBASE, or REAXYS were searched for manuscripts on edible mushroom biofortification published over the previous 6 years from December 2018 to January 2024. The terms “biofortification”, “edible mushrooms”, “elements”, “antioxidant activity”, “functional foods”, “nutrition”, and “nutritional compounds” were combined to perform the search. Based on a study of titles and abstracts, a review of the retrieved papers was carried out. Only published English-language and Polish-language research articles were chosen.

3. Nutritional Composition of Mushrooms

Due to their unique flavour, mushrooms have very often been considered part of the human diet. They are also used in folk medicine. In recent decades, many bioactive substances have been isolated from mushrooms, hence the increased interest in fungal research. Currently, mushrooms are being used to produce functional foods. To date, 140,000 species of fungi have been identified worldwide. However, it is estimated that their total number is between 2.2 and 3.8 million. [11]. Of the species described, approximately 21,000 are *Macromycetes*. Approximately 2000 species of macrofungi are edible mushrooms. Currently, around 200 species of mushrooms collected from natural sites are used for culinary and medicinal purposes [12]. The nutritional value of mushrooms consists of the presence of proteins, fatty acids, saccharides, dietary fibre, vitamins, and minerals in their composition. Mushrooms are characterised by their high protein content. Mushroom protein has a good bioavailability level of up to 90%. Additionally, fruiting bodies contain 4.7–6.9% of total saccharides, of which 2.7–3.9% is dietary fibre. The fatty acid content is low, but the ratio of polyunsaturated to saturated fatty acids is considered favourable [13]. Mushrooms contain many minerals, such as phosphorus, potassium, magnesium, and calcium. They are also a good source of trace elements, mainly zinc, copper, iron, selenium, molybdenum, and magnesium. The main biologically active substances found in mushrooms include polysaccharides, sesquiterpenes, glycoproteins, and triterpenoids, which determine their immunomodulating and anticancer effects. Mushrooms also contain natural antibiotics, statins, and antioxidants, including phenolic compounds, flavonoids, carotenoids, and tocopherols [14]. Despite their slightly lower nutrient content, many wild mushroom species contain higher levels of antioxidants than cultivated species [15,16]. Species of mushrooms with the highest content of antioxidant compounds include *Boletus edulis* and *Cantharellus cibarius*. Mushrooms have many health-promoting properties, e.g., anticancer activity (*Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus*), antioxidant activity (*Armillaria mellea*, *Leccinum aurantiacum*, *Suillus luteus*, *Xerocomus badius*), anti-inflammatory activity (*B. edulis*, *Morchella esculenta*), antimicrobial activity (*B. edulis*, *C. cibarius*, *L. deliciosus*), antiviral activity (*B. edulis*), hypoglycaemic activity (*B. edulis*, *C. cibarius*), and neuroprotective activity (*C. cibarius*, *Tricholoma equestre*) [17]. Edible mushrooms are renowned for their unique taste. Unfortunately, many people still believe that they have no nutritional value. In fact, edible mushrooms are a source of substances that are valuable to health and have an impact on the body’s normal function. Table 1 compares popular edible mushrooms with other foods that are equally often consumed. As can be seen, mushrooms contain a number of valuable minerals and can be consumed similarly to other foods.

Table 1. Nutrients of selected edible mushrooms and commonly consumed foods. Own compilation based on FoodData Central, USDA. The content of individual nutrients is given per 100 g of fresh weight of the product.

Chemical Compounds	Agaricus Bisporus	Lentinula Edodes	Pleurotus Eryngii	Pea	Rice	Broccoli	Avocado	Chicken Breasts	Bread	Sweet Potato
Protein	3.09 g	2.24 g	2.41 g	5.42 g	2.69 g	2.82 g	2 g	23.2 g	10.7 g	1.57 g
Total dietary fibre	1 g	2.5 g	3 g	5.7 g	0.4 g	2.6 g	6.7 g	-	4 g	3 g
Vitamin C	2.1 mg	-	-	40 mg	-	89.2 mg	10 mg	1.1 mg	0.2 mg	2.4 mg
Iron, Fe	0.5 mg	0.41 mg	0.34 mg	1.47 mg	1.2 mg	0.73 mg	0.55 mg	0.64 mg	3.6 mg	0.61 mg
Sodium, Na	5 mg	9 mg	1 mg	5 mg	1 mg	33 mg	7 mg	67 mg	473 mg	55 mg

Table 1. Cont.

Chemical Compounds	Agaricus Bisporus	Lentinula Edodes	Pleurotus Eryngii	Pea	Rice	Broccoli	Avocado	Chicken Breasts	Bread	Sweet Potato
Calcium, Ca	3 mg	2 mg	2.49 mg	25 mg	10 mg	47 mg	12 mg	18 mg	125 mg	30 mg
Magnesium, Mg	9 mg	20 mg	13.5 mg	33 mg	12 mg	21 mg	29 mg	-	41 mg	25 mg
Potassium, K	318 mg	304 mg	294 mg	244 mg	35 mg	316 mg	485 mg	-	141 mg	337 mg
Zinc, Zn	0.52 mg	1.03 mg	0.63 mg	1.24 mg	0.49 mg	0.41 mg	0.64 mg	-	1.04 mg	0.3 mg
Copper, Cu	0.32 mg	0.142 mg	0.47 mg	0.176 mg	0.069 mg	0.049 mg	0.19 mg	-	0.148 mg	0.151 mg
Selenium, Se	9.3 µg	5.7 µg	1.2 µg	1.8 µg	7.5 µg	2.5 µg	0.4 µg	-	28.8 µg	0.6 µg

4. Biofortification Techniques

Biofortification is one of the numerous methods and strategies that have been recommended to combat micronutrient deficiencies, which can be achieved by three different methods: traditional breeding methods, genetic engineering, and agronomic practices (Figure 2).

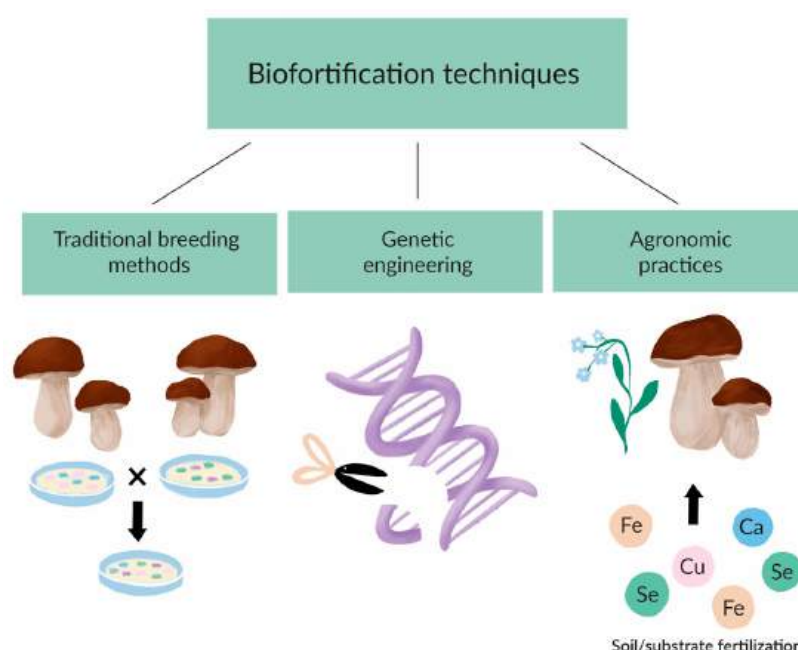


Figure 2. Types of biofortification.

Significantly, biofortification is often regarded as a sustainable, economical, and successful way to increase the amount of micronutrients in diets. Unlike fortification, which adds nutritional additives to food during food processing, biofortification aims to naturally increase the nutritional value of foods. In this way, health improvement can take place by preventing disease through nutrition rather than drugs. The major constraints, including the stability, storage, legal concerns, and biosafety of biofortified crops, still need to be taken into account despite extensive studies [18].

By carefully combining many varieties to select certain qualities, traditional breeding methods can increase the nutritional value of crops. To generate a hybrid with better qualities, the method entails choosing organisms that have desired properties, such as a higher micronutrient content, and crossing them with others. This procedure is done over time, and the progeny are examined for the desired characteristics. When crops naturally contain certain amounts of micronutrients or when the genetic variety is available in a form that can be used, biofortification through breeding is achieved. Some of the most effectively biofortified cultivars have been produced through conventional breeding by large-scale research initiatives across the world, including the BioCassava Plus programme, the HarvestPlus global programme, and the Health Grain Project of the European Union [19]. Biofortified crops include beans high in iron, rice high in zinc, rice high in selenium, and sweet potatoes high in iodine and vitamin A. Since it is safe and does not raise the same safety issues as

genetic engineering, this approach is widely accepted. Nevertheless, producing a crop with an elevated nutritional content may take several years due to the labour-intensive and slow nature of conventional breeding [8].

Biotechnology is a scientific area that involves the use of live organisms, cells, or their constituent parts to yield a valuable product. Many of the most urgent issues facing the planet might be resolved based on biotechnological solutions, e.g., the production of enough food to support the world's expanding population, the development of novel disease cures, and the improvement of the nutritional value of crops. Compared to conventional methods, genetic engineering facilitates a more accurate and effective targeting of particular nutrients. The nutrient content can be increased by increasing the expression of already present genes that are involved in nutrient production or by introducing additional genes responsible for higher levels of vitamins or minerals. Genes that enhance the concentration and bioavailability of micronutrients and those that block antinutritional factors in crops limiting nutrient uptake can all be included concurrently using transgenic procedures [20]. A sensible way to increase the concentration and bioavailability of micronutrients is the use of transgenic technology, particularly in cases where crops have little genetic diversity. One such example is the engineering of “golden rice”, i.e., vitamin A-rich rice that may aid in the treatment of vitamin A insufficiency in underdeveloped nations. This method is controversial and is not recognised around the world due to the traditional way of thinking [2].

Agronomic biofortification is a process of enriching plants or fungi through the soil, growing substrate management, and fertilisation. It is the cheapest and fastest efficient way to produce food rich in macronutrients and micronutrients. Unfortunately, it provides a short-term solution [21]. It is based on the use of inorganic and organic fertilisers or biofertilisers. The source of the fertiliser used, the dose of the fertiliser, the transport of nutrients, and the application stage all have an impact on the final concentration of micronutrients. The success of agronomic biofortification is highly variable due to differences in the mobility and accumulation of minerals and the soil composition in a specific geographical area of cultivation [3]. Chelate fertilisers, water-soluble fertilisers, and nano-fertilisers with high uptake efficiency and a greater translocation of minerals have proved to be innovative approaches that have increased the success of biofortification. Interactions between nutrients may affect the effectiveness of this method. Some micro- and macroelements can work synergistically, increasing the absorption and utilisation of other elements. Another example may be nutrients that compete with each other for absorption. An innovative technique could be the simultaneous strengthening of crops with more than one element [22].

5. Species of Biofortified Mushrooms

The analysis of the literature data showed that the genus *Pleurotus* is the most commonly considered fungi for biofortification, and selenium is the most often added element. The species and elements used in the biofortification process are shown in Table 2.

Table 2. Species of mushrooms used in the biofortification process.

Species of Mushroom	Biofortified Chemical Compound	Literature
<i>Cordyceps militaris</i>	Selenium (Se)	[23]
<i>Lentinus crinitus</i>	Iron (Fe)	[24,25]
<i>Coriolus versicolor</i>	Selenium (Se)	[26]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Iron (Fe), Zinc (Zn), Lithium (Li), Selenium (Se), Calcium (Ca), Germanium (Ge)	[27]
		[6]
		[10,25]
		[28]
		[29]
		[30]
		[31–33]
		[9,34–37]

Table 2. Cont.

Species of Mushroom	Biofortified Chemical Compound	Literature
<i>Grifola frondosa</i>	Copper (Cu), Zinc (Zn), Selenium (Se)	[38,39]
<i>Pholiota nameko</i>	Iron (Fe), Calcium (Ca)	[6,40]
<i>Pleurotus eryngii</i>	Iron (Fe), Selenium (Se), Zinc (Zn), Calcium (Ca)	[6,41] [25,29] [9,31,32,35]
<i>Ganoderma lucidum</i>	Iron (Fe), Selenium (Se), Calcium (Ca), Copper (Cu), Zinc (Zn), Germanium (Ge)	[25,29] [32,42] [33,43] [9]
<i>Schizophyllum commune</i>	Iron (Fe), Zinc (Zn)	[25,29] [35]
<i>Lentinula edodes</i>	Iron (Fe), Selenium (Se), Zinc (Zn)	[25] [44] [9,35]
<i>Agaricus subrufescens</i>	Iron (Fe)	[25,29]
<i>Pleurotus florida</i>	Selenium (Se), Zinc (Zn)	[9,30,45]
<i>Pleurotus sajor caju</i>	Selenium (Se), Zinc (Zn)	[9,30,46]
<i>Pleurotus djamor</i>	Selenium (Se), Zinc (Zn), Calcium (Ca)	[9,32,46] [47]
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Zinc (Zn), Iron (Fe), Copper (Cu), Lithium (Li), Selenium (Se)	[9,36,47] [48] [49]
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Zinc (Zn)	[47]
<i>Flammulina velutipes</i>	Selenium (Se), Calcium (Ca)	[32,50]
<i>Hericium erinaceus</i>	Selenium (Se), Lithium (Li)	[42,51] [52] [53]
<i>Pleurotus floridanus</i>	Calcium (Ca)	[54]
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	Calcium (Ca)	[32]
<i>Inonotus obliquus</i>	Calcium (Ca)	[32]
<i>Pleurotus nebrodensis</i>	Calcium (Ca)	[32]
<i>Poria cocos</i>	Calcium (Ca)	[32]
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Calcium (Ca)	[32]
<i>Agaricus bisporus</i>	Selenium (Se), Zinc (Zn), Copper (Cu)	[9,55]
<i>Agrocybe aegerita</i>	Selenium (Se)	
<i>Agrocybe cylindracea</i>	Lithium (Li)	[53]
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	Selenium (Se)	[9]
<i>Pleurotus fossulatus</i>	Selenium (Se)	[9]
<i>Pleurotus citrinopielatus</i>	Selenium (Se)	[9]
<i>Volvariella volvacea</i>	Selenium (Se)	[9]
<i>Calocybe indica</i>	Selenium (Se)	[9]

The *Pleurotus* species are easy to cultivate due to their rapid growth and 100% biological productivity. The presence of high mineral content in the *Pleurotus* species is considered

an alternative source of elements besides meat, fish, and vegetables [56]. Cordycepin, a major active ingredient in *Cordyceps militaris*, has a variety of biological activities and a number of pharmacological characteristics that are crucial for cancer immunotherapy [23,57]. *Lentinus crinitus* exhibits strong antioxidant activity and has the ability to bioaccumulate lithium in the mycelial biomass, which confers its great health-promoting benefits [58]. The main bioactive component of *Coriolus versicoloris* is a polysaccharopeptide (PSP). PSP increases the expression of cytokines and chemokines, such as tumour necrosis factor α (TNF- α), interleukins (IL-1 β and IL-6), prostaglandin E, and histamine. It also enhances macrophage phagocytosis. The *Grifola frondosa* fungus generates a wide range of bioactive compounds. β -glucans have been found to be the main bioactive components responsible for anticancer activity [59]. The polysaccharide derived from *Phiolota nameko* has been found to have anti-inflammatory, immunological, antihyperlipidaemic, and antioxidant properties. Nevertheless, the use of its active components is severely limited by its poor water solubility [60]. *Ganoderma lucidum* holds considerable promise to help heal diseases that now plague the world's population, such as diabetes, neurodegenerative illnesses, atherosclerosis, and inflammation. A broad range of pharmacological antioxidant, immunomodulatory, anti-neurodegenerative, antidiabetic, anti-inflammatory, anticancer, and antibacterial activities are demonstrated by polysaccharides derived from this mushroom [61,62]. *Schizophyllum commune* is a wood-degrading fungus. It is a primary source of schizophyllan (SPG), a β -glucan with a wide range of health-promoting qualities and industrial uses, particularly in the food, pharmaceutical, and cosmetics industries [63]. Lentinan (LNT) is the main bioactive component in *Lentinus edodes*. The anticancer properties of LNT are reflected in its ability to enhance the body's immune system through various signalling pathways, thus exerting anticancer effects, even if it does not directly destroy cancer cells in the body [64]. *Agaricus bisporus* and *A. subrufescens* are the most widely consumed edible mushroom species worldwide. The composition of *A. bisporus* includes ergothioneine and antibiotic-related compounds such as benzoquinone derivatives. The tyrosinase isolated from this species shows a striking similarity to human tyrosinase. This strongly suggests that this species may have an abundant tyrosinase amount for use in medicine and cosmetics [65,66]. *A. subrufescens* has shown immunomodulatory and antimutagenic properties, although it is still unclear what chemical compounds and cellular mechanisms underlie its pharmacological effects [67]. Polysaccharides from *Flammulina velutipes* (FVP) are the main active ingredients, with a wide range of biological effects, including boosting immunity, enhancing cognition, having antioxidant properties, fending against ageing, and reducing tumour growth [68]. *Hericium erinaceus* produces at least 70 different bioactive metabolites, including β -glucans, erinacines, hericenones, sterols, alkaloids, and volatile aromatic compounds. Given its biological constituents, *H. erinaceus* has several health-promoting properties, including antimicrobial, antioxidant, anticancer, anti-fatigue, anti-ageing, neuroprotective, antidepressant, and anti-anxiety effects [69]. L-ergothioneine is a water-soluble thiol with cytoprotective and antioxidant properties. In particular, hypsin from *Hypsizygus marmoreus* is a thermostable ribosome-inactivating protein that can be obtained from the fungal fruiting body and has been shown to have antifungal and antiproliferative properties. Marmorin is another ribosome-inactivating protein that also inhibits HIV-1 reverse transcriptase and has antiproliferative effects [70]. *Inonotus obliquus* inhibits HIV-1 protease activity, regulates the immune system, eliminates free radicals, inhibits lipid peroxidation, suppresses symptoms of acute colitis, and regulates the serum levels of Th1/Th2 hormones [71]. The physiologically active constituents of *I. obliquus* include triterpenoids, ergosterol, ergosterol peroxide, sesquiterpenes, benzoic acid derivatives, hispidin, polysaccharides, and melanins [72]. *Poria cocos* fungi are mostly composed of triterpenes, polysaccharides, steroids, amino acids, choline, and histidine. In recent decades, significant progress has been achieved in the chemical and bioactive analyses of *P. cocos* polysaccharides (PCP) and their derivatives [73]. *Laetiporus sulphureus* secondary metabolites have anti-thrombin, antioxidant, and antibacterial properties. Non-carotenoid polyenelaetiporic acids found in *L. sulphureus* can be used as food-colouring

agents in place of some manufactured ones [74,75]. FIP-vvo is the name given to an immunomodulatory protein (FIP) that was isolated from *Volvariella volvacea*. While numerous FIPs have been shown to regulate immunity, it is unknown how FIP-vvo affects the dendritic cells (DCs), which are essential in bridging the gap between innate and adaptive immunity [76]. A water-soluble polysaccharide with cytotoxic and immunostimulatory qualities was produced by *Calocybe indica*. By restoring antioxidant enzyme activity and lowering lipid peroxidation, the *C. indica* polysaccharide demonstrated significant antioxidant benefits and an anti-ageing impact in d-galactose-induced ageing rats [77]. The representatives of the genus *Agrocybe* contain a wide range of biological macromolecules, including lectins and polysaccharides, as well as a diverse group of small molecular chemical constituents categorised into sterols, sesquiterpenes, volatile compounds, polyenes, and other compounds [78,79].

The global market for mushroom production has grown significantly, with the industry valued at over USD 96.58 billion in 2023. Mushrooms are widely appreciated for their nutritional value and are consumed around the world, with the most cultivated and commercialised species being *Agaricus bisporus*, *Pleurotus* spp., and *Lentinula edodes*. Additionally, mushrooms are considered a delicacy due to their nutritional, medicinal, and organoleptic characteristics, and they provide numerous vitamins and minerals, making them a desirable food source [80]. Mushroom farming has the potential to help in the transition towards a circular agricultural economy by recycling agricultural wastes and turning them into high-quality products [81]. Thus, biofortified mushrooms may have great potential to help humanity in reducing deficiencies of certain elements.

6. Bioavailability of Nutrients in Biofortified Mushrooms

The route of mineral enrichment varies between different mushrooms. In edible mushrooms, mineral absorption mostly occurs through the mycelium. Different electrochemical potentials cause the passive movement of minerals across the plasma membrane. Furthermore, depending on the carriers on the protoplasmic membrane, minerals can potentially enter the fungal cell actively by requiring energy to enter through the membrane. Mushrooms are enriched with minerals mainly through active modes of transport, which is why edible mushrooms are able to accumulate a higher mineral content than plants [82].

6.1. Selenium and Zinc

Edible mushrooms, compared to most animal and plant sources, are considered an ideal choice for selenium bioaccumulation due to their rapid growth, better Se bioconversion capacity, and lower cultivation cost. *Lentinus edodes*, *Hericius erinaceus*, *Agaricus bisporus*, and *Pleurotus florida* are suitable fungal species for biofortification with this element [23]. They can convert inorganic selenium into selenoamino acids. In order to evaluate Se-enriched mushrooms as a potential dietary supply of this element, it is necessary to determine the form and bioavailability of Se that is accumulated from growth substrates [26]. The chemical forms of Se have an impact on its absorption and bioavailability. There are several oxidation levels of selenium found in the environment: elemental selenium, selenite, selenide, and selenate [50]. Increases in the level of this element in the blood are caused by the greater absorption of organic forms of selenium (SeMet) in humans and animals compared to inorganic forms. Compared to selenite and selenium, these organic selenium compounds are more beneficial due to their lower toxicity [51]. A study conducted by Bhatia et al. examined the bioavailability of Se in vitro in *Pleurotus florida*. Their size-exclusion analysis (HPLC-ICP-MS) performed after in vitro simulated gastrointestinal digestion showed that all high-molecular-weight selenium-containing compounds were broken down to low-molecular-weight selenocompounds. The majority of the bioaccessible Se was SeMet (selenomethionine), which made up at least 65% of the bioaccessible Se and 73% of the total number of forms found. Selenium-biofortified *P. florida* seems to be an excellent bioavailable source of selenium [45]. Selenium-enriched yeast has been recognised as an important nutritional source of selenium, providing chemo-preventative

benefits beyond those observed for selenomethionine supplementation. Studies suggest that supplementation with selenium-enriched yeast may offer chemo-preventative benefits, indicating its potential role in preventing chronic diseases such as cardiovascular disease, cancer, and neurodegenerative diseases [83]. The other interesting form of selenium that has been used to biofortify yeast is urea-selenium. Urea-selenium biofortification of yeast can lead to the accumulation of organic forms of selenium, such as selenomethionine, in the yeast biomass, making it a valuable source of protein and selenium biocomplexes. Also, urea-selenium has been shown to enhance bioavailability and reduce selenium emissions in the environment, potentially improving the nutritional quality of yeast. However, it should be remembered that selenium can be toxic at high concentrations, and excessive consumption of selenium can lead to adverse health effects, emphasising the importance of carefully managing selenium biofortification processes. In conclusion, biofortified yeast enriched with selenium has potential applications in producing dietary supplements for both animals and humans, indicating its relevance to the food and nutrition industries [84].

Zinc biofortification is often combined with selenium. The bioavailability of zinc, like selenium, is limited by many internal and external factors. Its transport into tissues, toxicity, and availability depends on the form taken [44]. As in the case of selenium, organic zinc has higher bioavailability and lower toxicity than inorganic forms. The mechanisms of accumulation of zinc (II) ions are very diverse. Studies indicate that the addition of Zn may be a promising approach, as supplementation with low concentrations of Zn increases mycelial growth rates and biomass production [46].

A relatively new approach to enriching fungi with selenium and zinc ions is the use of nanoparticles (SZMs) [85]. The methods for enriching mushrooms with zinc and selenium nanoparticles involve growing mycelium and fruit in substrates containing various concentrations of selenium and zinc, leading to increased levels of these elements in the mushrooms. Consuming mushrooms enriched with zinc and selenium nanoparticles may offer health benefits such as improved antioxidant capacity and potential antitumor activities. However, there are potential environmental implications and challenges associated with the process, including the need to carefully manage selenium concentrations to avoid adverse effects on mushroom growth and the environment [86].

6.2. Iron

Iron is considered the most difficult element to be added to fortified foods due to the different properties of its chemical forms. Due to differences in iron accumulation efficiency, the choice of products to be enriched must be well thought out. It is also important to consider bioavailability, as the success of enrichment depends on the absorption of the element. The fungus species, the chemical type of Fe added, and the metal content in the medium all have a major impact on the bioaccumulation effectiveness of Fe [24]. As a result, it is impossible to come to a unanimous decision about the optimum species, concentration, or type of iron supplementation. Every case needs to be handled differently. To achieve the highest efficiency, ideal circumstances must be identified before selecting the species to be enriched. With the current understanding of the potential, implementation of this type of biofortification seems quite possible [6]. The following forms were used in most studies: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 , and chelated iron in various concentrations. While iron is necessary for fungal metabolism, excessive amounts can lead to the generation of free radicals that impair fungal metabolism and reproduction through enzymatic inhibition, ion displacement or substitution, and cell membrane rupture. Moreover, the production of iron-protective chemicals may cause the metabolism to reorganise, lowering the energy required for fungal growth. This would account for the decreased growth of mycelial biomass in culture media when high concentrations of iron ions are added [25]. Typically, iron exists as an insoluble salt. The fungus has evolved a number of methods for iron uptake, including acidification of the substrate, conversion of ferric iron ions to the ferrous form, and secretion of hydroxamates, which are iron-chelating molecules. Fungi produce siderophores, which are high-affinity iron-chelating chemicals that help transport iron

across cell membranes [34]. These include rhododotorulic acid, fusarins, coprogens, and ferrichromes. They are also capable of catalysing forms that are reactive with oxygen and damaging to cells. Manoproteins help the fungus absorb iron more efficiently and help siderophore iron chelates stay in the cell wall [40].

6.3. Calcium

Calcium accumulation in edible mushrooms is an effective way to increase the action of this element, as its organic form can be formed from the original inorganic calcium. The main sources of calcium in edible mushrooms are CaCl_2 , CaCO_3 , or $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. While the formation of Ca has been extensively investigated, the mechanisms behind Ca enrichment, which are closely linked to absorption, transport, and metabolism, have only been the subject of a small number of studies. In terms of calcium enrichment in edible mushrooms, an increase in the calcium ion content causes an increase in the activity of the calcium transport system Ca^{2+} -ATPase on the mycelial cell membrane. Progressive improvement in the rate of calcium transport and absorption has been reported [32]. Nevertheless, Ca^{2+} -ATPase activity was hindered when the ion addition was raised to a threshold value. This reduced calcium absorption and transport led to an inadequate calcium buildup in the mycelium. Calcium may be passively transported through a non-specific channel in the cell membrane, diffused further through the mycelium, or transported extracellularly from the medium to the fruiting bodies via the interfungal cavity. In edible fungi, calcium ions attach themselves to reactive groups in such biomacromolecules as polysaccharides, proteins, nucleic acids, etc., finishing the process of converting inorganic calcium into its organic form [54]. In plants, the Ca uptake depends on the form and level of Ca and on the activity of a high- or low-affinity membrane transporter. It is still unknown, nevertheless, whether the Ca transporters found in edible fungi are the same as those found in plants and whether they are general or specialised transporters [87].

6.4. Lithium

Lithium is commonly used in psychiatric drugs because it blocks intracellular neurotransmission enzymes in the central nervous system [49]. While several metals are necessary for the growth and metabolism of fungi, greater amounts of these elements can be harmful. Adsorption in the cell wall, precipitation of minerals and polysaccharides, or extracellular binding through intracellular sequestration of metallothionein are a few examples of how these mechanisms may contribute to fungal lithium tolerance [10]. In the case of lithium, researchers are often concerned with the accumulation of this element and its availability compared to lithium carbonate, which is used in psychiatric treatment. In comparison to the psychiatric medication containing Li_2CO_3 , high mineral content in fungal biomass was linked to greater availability in sequential extraction and in vitro digestion [88]. More encouraging outcomes were obtained in the case of *Hericum erinaceus*. As shown by the calculations, consumption of 100 g of dry-weight fruiting bodies grown in an environment containing 1 mM Li would equal 69% of the currently advised daily allowance of Li [53].

6.5. Copper

A number of enzymes depend on copper for their essential roles in numerous metabolic processes. The most typical signs of a copper shortage include anaemia, lethargy, and a lowered white blood cell count [49]. There is very little information on the mechanisms of copper bioavailability in the biofortification process. It is critical to understand the degree of bioavailability. Solubility is a significant element influencing bioavailability, even though the two cannot be equated. The more soluble forms of Cu are thought to be more potentially bioavailable than the less soluble forms. Furthermore, a substance must be present in the intestinal fluid in a soluble form—either as a free ion or as a chelate with another nutrient—in order for the body to absorb and possibly use it. Therefore, the bioavailability

of both dry mycelium and supplements was evaluated based on the solubility of Cu in the simulated gastrointestinal tract [38].

7. Agronomic Considerations

Mushrooms can accumulate various mineral elements, such as selenium, zinc, copper, magnesium, manganese, and molybdenum, making them an important source of micronutrients essential to humans [89]. The concentration of minerals in mushrooms is affected by the ecological role, phylogenetic affinity, and environmental factors, enabling the maximisation of mineral content in harvested mushrooms by collecting them in specific areas. Mushrooms are low in energy and fat but high in protein, carbohydrates, dietary fibre, and a variety of minerals and trace elements, such as potassium, copper, iron, and selenium, making them a nutritious food with potential health benefits [90]. The mineral composition of mushrooms is influenced by the content of macronutrients in the soil, with the uptake of potassium, magnesium, and calcium by mushrooms being positively correlated with the content of these elements in the soil [91].

Furthermore, depending on the fungus species, different types of culture media are used. The substrate is important for bioavailability, interactions with substrate components and mycelium, and effects on fungal mass and growth. A major challenge in culturing fungi for biofortification is the correct choice of the concentration and form of the element added to the medium. Therefore, each case must be treated individually. In order to achieve optimum efficiency, the species to be enriched must be selected, and the ideal conditions must be determined. For example, Budzyńska et al. studied the effects of three forms of iron: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, FeHBED, and $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ applied at three concentrations (5, 10, or 50 mM) on three fungal species: *Pleurotus ostreatus*, *P. eryngii*, and *Pholiota nameko*. The concentration of 50 mM proved to be the best concentration for the species tested. The most favourable addition was FeHBED for *P. ostreatus* and $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ for *P. nameko* and *P. eryngii*. Additionally, *P. nameko* showed the highest accumulation of Fe among the three species [6]. Mleczek et al. studied three fungal species, *Pleurotus eryngii*, *Ganoderma lucidum*, and *P. ostreatus*, on media enriched with lithium (0.25–1.0 mM) in the form of carbonate or acetate. Lithium accumulation, fruiting body production, and mycelial colony growth were assessed. Li_2CO_3 turned out to be the most bioavailable form but at a higher cost to fungal development. The growth retardation was lessened or absent when CH_3COOLi was added to the substrate, while the Li absorption was decreased. The most encouraging outcomes were achieved with *G. lucidum*, which accumulated up to 73.58 ± 10.87 (Li_2CO_3) and 25.59 ± 9.98 (CH_3COOLi) mg Li kg^{-1} dry mass. The concentrations of Li accumulated in fruiting bodies were not high enough for application in psychiatric treatments but could potentially support the daily intake of Li for behaviour modification or health beneficiary purposes [88]. The most difficult and time-consuming task is the optimisation of the biofortification process. Even if the concentration and form of an element are the same, fungi grow on different substrates, and it turns out that the bioavailability of elements varies. The possible industrial application of biofortified mushrooms as nutraceuticals requires the economical and efficient production of biomass during their growth. The development and appearance of the mycelium can be greatly influenced by an artificial increase in the content of certain components in the growing media. This may lead to higher cultivation expenses, a decline in the end product's appeal to potential buyers, and a reduced market value. Budzyńska et al. found no differences in colour and size between control fruiting bodies and fungi enriched with different concentrations of individual Fe salts. A similar pattern was seen in their biomass. Fungal yields were neither substantially greater nor lower in response to the increased Fe concentrations [40]. Oyetayo et al. reported the same observation, as the addition of 500 mg kg^{-1} did not reduce the yield of *Pleurotus pulmonarius* [48]. Similarly, Meniqueti et al. and Almeida et al. found no significant inhibition of fungal growth at lower concentrations of up to 70 mg L^{-1} and up to 150 mg L^{-1} , respectively [24,34]. In contrast, Umeo and co-authors examined 14 strains of *Agaricus subrufescens*, and 12 were characterised by their lower biomass production

after the addition of $50 \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe}$ [35]. Biofortification of mushrooms using fermentation processes such as solid-state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF) allows the enrichment of mushrooms with various elements, but the effects vary depending on the method. In SSF, fungi grow on a solid medium, and it allows for a more natural way of growth, which often better promotes biofortification in minerals such as selenium, iron, or zinc. In SmF, on the other hand, the fungi grow in a liquid medium, which allows for faster growth and easier control of fermentation conditions. But, the elemental forms may be less bioavailable, and mineral concentrations are sometimes lower compared to SSF. However, SmF may be better for enrichment in some specific elements or compounds. Fermentation processes can significantly affect the efficiency of biofortification depending on the type of fungus, the element used, and the form of its introduction [92]. Submerged fermentation, for example, is used to enrich fungi such as *Antrodia camphorata* with selenium. In this process, the fungus effectively converts sodium selenate into organic forms [93]. Solid-state fermentation, on the other hand, is often used to biofortify soybeans using edible fungi such as *Pleurotus ostreatus*. SSF allows for significant improvements in the nutritional and antioxidant values of substrates. Differences between these processes can affect how fungi accumulate micronutrients and convert them into bioactive forms, which is key to designing functional foods [94].

8. Challenges and Future Directions

The need for nutrient-rich food is rising along with the world population, making biofortification an increasingly significant field of study. Researchers are trying to create new crops with higher concentrations of vital vitamins and minerals. A growing number of nutrient-rich crop types that can aid in addressing global hunger and enhancing public health are probably going to be developed as research in this area progresses. Figure 3 illustrates some future perspectives on biofortification [20].

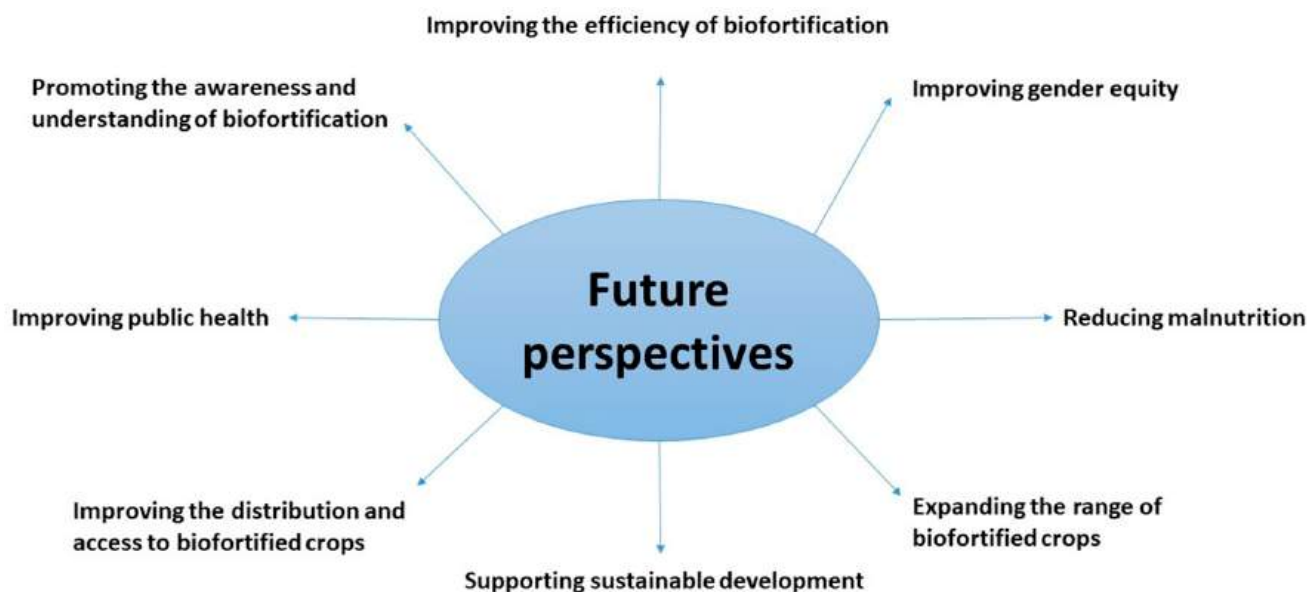


Figure 3. Future perspectives for biofortification.

The aim of effective biofortification should be to increase the concentration of micronutrients while also boosting their bioavailability. This can be accomplished by lowering the concentrations of nutrients that obstruct absorption and raising the concentrations of compounds that increase the absorption of minerals. Vitamins D, C, and E, as well as provitamin A, choline, and niacin, are substances that stimulate the absorption of methionine, tryptophan, Zn, Fe, P, Ca, and Se. In contrast, some polyphenols and phytates reduce the bioavailability of micronutrients. Phytate is a form of phosphorus stored in seeds.

During digestion, it can bind with zinc and iron and thus reduce absorption. The phytate concentration can be controlled by manipulating phytate biosynthesis through mutation of the myo-inositol kinase (MIK) gene, identification of low-phytate lines through embryo screening, and overexpression of phytase, i.e., a phytate-degrading enzyme. Figure 4 illustrates some challenges for biofortification [3].



Figure 4. Challenges for biofortification.

The analysis of the literature revealed that the research carried out in the field of biofortification is focused on the determination of the effects of various micronutrients and macronutrients, while it is difficult to find articles analysing other chemical compounds, such as vitamins. Another interesting compound that has a number of health-promoting properties is gamma-aminobutyric acid (GABA). This non-protein amino acid acts as a major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system. A good innovative trend in biofortification that would be worthwhile to introduce is the study of biofortified products on cell lines. In this way, it would be possible to check whether a particular compound has a beneficial effect on normal cells or an inhibitory effect on the proliferation and viability of cancer cells. Changes at the molecular level and changes in the secretory functions of tissues are also assessed. The problem with *in vitro* studies is the direct translation of the results obtained into a complex *in vivo* system. However, despite the simplistic approach in cell cultures to assessing the activity of compounds, *in vitro* studies allow, e.g., the determination of the doses of a substance or the time of exposure to a compound necessary for the desired effects to appear in cells. The advantages of using cell cultures include the possibility to perform tests on different cell types, the low cost of the tests, the reproducibility and ease of analysis, the possibility to perform tests with a small number of substances, and the accurate and relatively fast analysis of changes in cells [95].

9. Conclusions and Perspectives

Around 2 billion people worldwide suffer from micronutrient deficiencies. “Hidden hunger” is a fairly common phenomenon in developing countries. It is a phenomenon in which the organism lacks the minerals and vitamins needed for development, growth, and good overall health. Deficits in these phytochemicals can have major health repercussions, including decreased cognitive function in children, greater risk of infection, and a host of other detrimental effects on physical and mental health [96]. The process of biofortification is a strategy developed to combat hidden hunger. It involves increasing the levels of essential nutrients in crops that are commonly consumed by humans. There are several

methods of biofortification. While transgenic approaches provide long-term solutions, they take time to produce nutrient-rich varieties. In contrast, agronomic approaches provide short-term immediate solutions. As can be seen, crop enrichment has many advantages and can bring many benefits, but it has to overcome various challenges to become a widespread technique, as very few crops have been commercialised to date [97]. Mushrooms are increasingly being considered for biofortification due to their ability to accumulate various elements. Therefore, they can be a good option for enriching foods with micro- and macroelements, but this still requires further research [98]. Future research worth considering when analysing biofortification is the fungal metabolome, which can show how this process affects fungal metabolism. Another important consideration is the examination of an organoleptic sensory array by a consumer panel so that it will be possible to assess how biofortification affects the flavour and aroma characteristics and studies related to the consumption of biofortified mushrooms by the population/persons who do not have such nutritional needs. The possibility of targeted biofortification aimed at adding such chemical compounds to the mushroom to achieve the desired properties can also be explored.

Author Contributions: K.S.: Conceptualisation, Writing—original draft, Investigation, and Data curation; M.S.: Resources, Investigation, and Data curation; A.W. (Adrian Wiater): Investigation, Project administration, Formal analysis, and Data curation; M.T.: Supervision, Visualisation, and Data curation; A.W. (Adam Waśko): Writing—original draft, Writing—review and editing, Supervision, Funding acquisition, and Conceptualisation. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Díaz-Gómez, J.; Twyman, R.M.; Zhu, C.; Farré, G.; Serrano, J.C.; Portero-Otin, M.; Muñoz, P.; Sandmann, G.; Capell, T.; Christou, P. Biofortification of crops with nutrients: Factors affecting utilization and storage. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, *44*, 115–123. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Singh, U.; Praharaj, C.S.; Singh, S.S.; Singh, N.P. Biofortification: Introduction, Approaches, Limitations, and Challenges. In *Biofortification of Food Crops*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2016; pp. 1–490. [\[CrossRef\]](#)
3. Jha, A.B.; Warkentin, T.D. Biofortification of pulse crops: Status and future perspectives. *Plants* **2020**, *9*, 73. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Bailey, R.L.; West, K.P.; Black, R.E. The epidemiology of global micronutrient deficiencies. *Ann. Nutr. Metab.* **2015**, *66*, 22–33. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Rawat, N.; Neelam, K.; Tiwari, V.K.; Dhaliwal, H.S. Biofortification of cereals to overcome hidden hunger. *Plant Breed.* **2013**, *132*, 437–445. [\[CrossRef\]](#)
6. Budzyńska, S.; Siwulski, M.; Gasecka, M.; Magdziak, Z.; Kalač, P.; Niedzielski, P.; Mleczek, M. Biofortification of Three Cultivated Mushroom Species with Three Iron Salts—Potential for a New Iron-Rich Superfood. *Molecules* **2022**, *27*, 2328. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Oyetayo, V.O. Mineral Element Enrichment of Mushrooms for the Production of More Effective Functional Foods. *Asian J. Biol. Sci.* **2023**, *16*, 18–29. [\[CrossRef\]](#)
8. Singh, D.P.; Gupta, V.K.; Prabha, R. *Microbial Interventions in Agriculture and Environment: Volume 1: Research Trends, Priorities and Prospects*; Springer: Singapore, 2019; Volume 1, ISBN 9789811383915.
9. Kora, A.J. Nutritional and antioxidant significance of selenium-enriched mushrooms. *Bull. Natl. Res. Cent.* **2020**, *44*, 34. [\[CrossRef\]](#)
10. De Assunção, L.S.; Da Luz, J.M.R.; Da Silva, M.D.C.S.; Vieira, P.A.F.; Bazzolli, D.M.S.; Vanetti, M.C.D.; Kasuya, M.C.M. Enrichment of mushrooms: An interesting strategy for the acquisition of lithium. *Food Chem.* **2012**, *134*, 1123–1127. [\[CrossRef\]](#)
11. Hyde, K.D.; Jeewon, R.; Chen, Y.J.; Bhunjun, C.S.; Calabon, M.S.; Jiang, H.B.; Lin, C.G.; Norphanphoun, C.; Sysouphanthong, P.; Pem, D.; et al. *The Numbers of Fungi: Is the Descriptive Curve Flattening*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2020; Volume 103, ISBN 0123456789.
12. Siwulski, M.; Sobieralski, K.; Sas-Golak, I. Wartość odżywcza i prozdrowotna grzybów. *Zywn. Nauk. Technol. J. Qual. Technol.* **2014**, *21*, 16–28. [\[CrossRef\]](#)

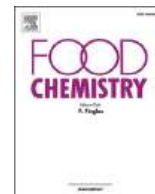
13. Rathore, H.; Prasad, S.; Sharma, S. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *PharmaNutrition* **2017**, *5*, 35–46. [\[CrossRef\]](#)
14. Kumar, K.; Mehra, R.; Guiné, R.P.F.; Lima, M.J.; Kumar, N.; Kaushik, R.; Ahmed, N.; Yadav, A.N.; Kumar, H. Edible mushrooms: A comprehensive review on bioactive compounds with health benefits and processing aspects. *Foods* **2021**, *10*, 2996. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Luque, C.; Cepero, A.; Perazzoli, G.; Mesas, C.; Quiñero, F.; Cabeza, L.; Prados, J.; Melguizo, C. In Vitro Efficacy of Extracts and Isolated Bioactive Compounds from Ascomycota Fungi in the Treatment of Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 22. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Venturella, G.; Ferraro, V.; Cirlincione, F.; Gargano, M.L. Medicinal mushrooms: Bioactive compounds, use, and clinical trials. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 634. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Golak-Siwulska, I.; Kałużewicz, A.; Spizewski, T.; Sobieralski, K. Zawartość związków biologicznie aktywnych w grzybach jadalnych dziko rosnących. *Sylvan* **2018**, *162*, 238–247.
18. Guindon, M.F.; Cazzola, F.; Palacios, T.; Gatti, I.; Bermejo, C.; Cointry, E. Biofortification of pea (*Pisum sativum* L.): A review. *J. Sci. Food Agric.* **2021**, *101*, 3551–3563. [\[CrossRef\]](#)
19. Malik, K.A.; Maqbool, A. Transgenic Crops for Biofortification. *Front. Sustain. Food Syst.* **2020**, *4*, 571402. [\[CrossRef\]](#)
20. Avnee, Sood, S.; Chaudhary, D.R.; Jhorar, P.; Rana, R.S. Biofortification: An approach to eradicate micronutrient deficiency. *Front. Nutr.* **2023**, *10*, 1233070. [\[CrossRef\]](#)
21. Shahzad, R.; Jamil, S.; Ahmad, S.; Nisar, A.; Khan, S.; Amina, Z.; Kanwal, S.; Aslam, H.M.U.; Gill, R.A.; Zhou, W. Biofortification of Cereals and Pulses Using New Breeding Techniques: Current and Future Perspectives. *Front. Nutr.* **2021**, *8*, 721728. [\[CrossRef\]](#)
22. Bouis, H.E.; Hotz, C.; McClafferty, B.; Meenakshi, J.V.; Pfeiffer, W.H. Biofortification: A new tool to reduce micronutrient malnutrition. *Food Nutr. Bull.* **2011**, *32*, 31–40. [\[CrossRef\]](#)
23. Hu, T.; Liang, Y.; Zhao, G.; Wu, W.; Li, H.; Guo, Y. Selenium Biofortification and Antioxidant Activity in *Cordyceps militaris* Supplied with Selenate, Selenite, or Selenomethionine. *Biol. Trace Elem. Res.* **2019**, *187*, 553–561. [\[CrossRef\]](#)
24. Meniqueti, A.B.; Ruiz, S.P.; Faria, M.G.I.; do Valle, J.S.; Gonçalves, A.C.; Dragunski, D.C.; Colauto, N.B.; Linde, G.A. Iron Bioaccumulation in *Lentinus crinitus* Mycelia Cultivated in Agroindustrial Byproducts. *Waste Biomass Valorization* **2021**, *12*, 4965–4974. [\[CrossRef\]](#)
25. Scheid, S.S.; Faria, M.G.I.; Velasquez, L.G.; do Valle, J.S.; Gonçalves, A.C.; Dragunski, D.C.; Colauto, N.B.; Linde, G.A. Iron biofortification and availability in the mycelial biomass of edible and medicinal basidiomycetes cultivated in sugarcane molasses. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 12875. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Miletić, D.; Turlo, J.; Podsadni, P.; Pantić, M.; Nedović, V.; Lević, S.; Nikšić, M. Selenium-enriched *Coriolus versicolor* mushroom biomass: Potential novel food supplement with improved selenium bioavailability. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 5122–5130. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Fontes Vieira, P.A.; Gontijo, D.C.; Vieira, B.C.; Fontes, E.A.F.; de Assunção, L.S.; Leite, J.P.V.; de Oliveira, M.G.A.; Kasuya, M.C.M. Antioxidant activities, total phenolics and metal contents in *Pleurotus ostreatus* mushrooms enriched with iron, zinc or lithium. *LWT* **2013**, *54*, 421–425. [\[CrossRef\]](#)
28. Silva, M.d.C.S.d.; da Luz, J.M.R.; Paiva, A.P.S.; Mendes, D.R.; Carvalho, A.A.C.; Naozuka, J.; Kasuya, M.C.M. Growth and Tolerance of *Pleurotus ostreatus* at Different Selenium Forms. *J. Agric. Sci.* **2019**, *11*, 151. [\[CrossRef\]](#)
29. Meniqueti, A.B.; Ruiz, S.P.; Faria, M.G.I.; do Valle, J.S.; Gonçalves, A.C.; Dragunski, D.C.; Colauto, N.B.; Linde, G.A. Iron-enriched mycelia of edible and medicinal basidiomycetes. *Environ. Technol.* **2022**, *43*, 1248–1254. [\[CrossRef\]](#)
30. Kaur, G.; Kalia, A.; Sodhi, H.S. Selenium biofortification of *Pleurotus* species and its effect on yield, phytochemical profiles, and protein chemistry of fruiting bodies. *J. Food Biochem.* **2018**, *42*, e12467. [\[CrossRef\]](#)
31. Gąsecka, M.; Mleczek, M.; Siwulski, M.; Niedzielski, P. Phenolic composition and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* enriched with selenium and zinc. *Eur. Food Res. Technol.* **2016**, *242*, 723–732. [\[CrossRef\]](#)
32. Tang, Z.X.; Shi, L.E.; Jiang, Z.B.; Bai, X.L.; Ying, R.F. Calcium Enrichment in Edible Mushrooms: A Review. *J. Fungi* **2023**, *9*, 338. [\[CrossRef\]](#)
33. Siwulski, M.; Budzyńska, S.; Rzymiski, P.; Gąsecka, M.; Niedzielski, P.; Kalač, P.; Mleczek, M. The effects of germanium and selenium on growth, metalloid accumulation and ergosterol content in mushrooms: Experimental study in *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma lucidum*. *Eur. Food Res. Technol.* **2019**, *245*, 1799–1810. [\[CrossRef\]](#)
34. Almeida, S.M.; Umeo, S.H.; Marcante, R.C.; Yokota, M.E.; Valle, J.S.; Dragunski, D.C.; Colauto, N.B.; Linde, G.A. Iron bioaccumulation in mycelium of *Pleurotus ostreatus*. *Braz. J. Microbiol.* **2015**, *46*, 195–200. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Umeo, S.H.; Faria, M.G.I.; Dragunski, D.C.; Do Valle, J.S.; Colauto, N.B.; Linde, G.A. Iron or zinc bioaccumulated in mycelial biomass of edible basidiomycetes. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2020**, *92*, e20191350. [\[CrossRef\]](#)
36. Fasoranti, O.F.; Ogidi, C.O.; Oyetayo, V.O. Nutrient contents and antioxidant properties of *Pleurotus* spp. cultivated on substrate fortified with Selenium. *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol.* **2019**, *9*, 66–76. [\[CrossRef\]](#)
37. Milovanović, I.; Brčeski, I.; Stajić, M.; Korać, A.; Vukojević, J.; Knežević, A. Potential of *pleurotus ostreatus* mycelium for selenium absorption. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 681834. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Figlas, D.; Oddera, M.; Curvetto, N. Bioaccumulation and bioavailability of copper and zinc on mineral-enriched mycelium of *Grifola frondosa*. *J. Med. Food* **2010**, *13*, 469–475. [\[CrossRef\]](#)

39. Li, Q.; Wang, W.; Zhu, Y.; Chen, Y.; Zhang, W.; Yu, P.; Mao, G.; Zhao, T.; Feng, W.; Yang, L.; et al. Structural elucidation and antioxidant activity a novel Se-polysaccharide from Se-enriched *Grifola frondosa*. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *161*, 42–52. [\[CrossRef\]](#)
40. Budzyńska, S.; Siwulski, M.; Magdziak, Z.; Budka, A.; Gasecka, M.; Kalač, P.; Rzymiski, P.; Niedzielski, P.; Mleczek, M. Influence of iron addition (Alone or with calcium) to elements biofortification and antioxidants in pholiota nameko. *Plants* **2021**, *10*, 2275. [\[CrossRef\]](#)
41. Zięba, P.; Kała, K.; Włodarczyk, A.; Szewczyk, A.; Kunicki, E.; Sękara, A.; Muszyńska, B. Selenium and Zinc Biofortification of *Pleurotus eryngii* Mycelium and Fruiting Bodies as a Tool for Controlling Their Biological Activity. *Molecules* **2020**, *25*, 889. [\[CrossRef\]](#)
42. Niedzielski, P.; Mleczek, M.; Siwulski, M.; Gasecka, M.; Kozak, L.; Rissmann, I.; Mikołajczak, P. Efficacy of supplementation of selected medicinal mushrooms with inorganic selenium salts. *J. Environ. Sci. Health-Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* **2014**, *49*, 929–937. [\[CrossRef\]](#)
43. Rzymiski, P.; Mleczek, M.; Niedzielski, P.; Siwulski, M.; Gasecka, M. Potential of Cultivated *Ganoderma lucidum* Mushrooms for the Production of Supplements Enriched with Essential Elements. *J. Food Sci.* **2016**, *81*, C587–C592. [\[CrossRef\]](#)
44. Kałucka, M.; Roszczyk, A.; Klimaszewska, M.; Kaleta, B.; Drelich, E.; Błażewicz, A.; Górska-Jakubowska, S.; Malinowska, E.; Król, M.; Prus, A.M.; et al. Optimization of Se- and Zn-Enriched Mycelium of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler as a Dietary Supplement with Immunostimulatory Activity. *Nutrients* **2023**, *15*, 4015. [\[CrossRef\]](#)
45. Bhatia, P.; Aureli, F.; D'Amato, M.; Prakash, R.; Cameotra, S.S.; Nagaraja, T.P.; Cubadda, F. Selenium bioaccessibility and speciation in biofortified *Pleurotus* mushrooms grown on selenium-rich agricultural residues. *Food Chem.* **2013**, *140*, 225–230. [\[CrossRef\]](#)
46. Madaan, K.; Sharma, S.; Kalia, A. Effect of selenium and zinc biofortification on the biochemical parameters of *Pleurotus* spp. under submerged and solid-state fermentation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2023**, *82*, 127365. [\[CrossRef\]](#)
47. Włodarczyk, A.; Krakowska, A.; Sułkowska-Ziaja, K.; Suchanek, M.; Zięba, P.; Opoka, W.; Muszyńska, B. *Pleurotus* spp. Mycelia Enriched in Magnesium and Zinc Salts as a Potential Functional Food. *Molecules* **2021**, *26*, 162. [\[CrossRef\]](#)
48. Oyetayo, V.O.; Ogidi, C.O.; Bayode, S.O.; Enikanselu, F.F. Evaluation of biological efficiency, nutrient contents and antioxidant activity of *Pleurotus pulmonarius* enriched with Zinc and Iron. *Indian Phytopathol.* **2021**, *74*, 901–910. [\[CrossRef\]](#)
49. Ogidi, C.O.; Oyebo, K.O. Assessment of nutrient contents and bio-functional activities of edible fungus bio-fortified with copper, lithium and zinc. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2023**, *39*, 56. [\[CrossRef\]](#)
50. Dong, Z.; Xiao, Y.; Wu, H. Selenium accumulation, speciation, and its effect on nutritive value of *Flammulina velutipes* (Golden needle mushroom). *Food Chem.* **2021**, *350*, 128667. [\[CrossRef\]](#)
51. Hu, T.; Hui, G.; Li, H.; Guo, Y. Selenium biofortification in *Herichium erinaceus* (Lion's Mane mushroom) and its in vitro bioaccessibility. *Food Chem.* **2020**, *331*, 127287. [\[CrossRef\]](#)
52. Egressy-Molnár, O.; Ouerdane, L.; Györfi, J.; Dernovics, M. Analogy in selenium enrichment and selenium speciation between selenized yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Herichium erinaceus* (lion's mane mushroom). *LWT* **2016**, *68*, 306–312. [\[CrossRef\]](#)
53. Rzymiski, P.; Niedzielski, P.; Siwulski, M.; Mleczek, M.; Budzyńska, S.; Gasecka, M.; Poniedziałek, B. Lithium biofortification of medicinal mushrooms *Agrocybe cylindracea* and *Herichium erinaceus*. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54*, 2387–2393. [\[CrossRef\]](#)
54. Odiketa, J.K.; Whitehall, S.; Adedokun, O.M. Biofortification of mushroom (*Pleurotus floridanus*) using calcium based supplements. *J. Mushrooms* **2020**, *18*, 287–291. [\[CrossRef\]](#)
55. Rzymiski, P.; Mleczek, M.; Niedzielski, P.; Siwulski, M.; Gasecka, M. Cultivation of *Agaricus bisporus* enriched with selenium, zinc and copper. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 923–928. [\[CrossRef\]](#)
56. Raman, J.; Jang, K.Y.; Oh, Y.L.; Oh, M.; Im, J.H.; Lakshmanan, H.; Sabaratnam, V. Cultivation and Nutritional Value of Prominent *Pleurotus* spp.: An Overview. *Mycobiology* **2021**, *49*, 1–14. [\[CrossRef\]](#)
57. Zhang, G.; Liang, Y. Improvement of fruiting body production in *Cordyceps militaris* by molecular assessment. *Arch. Microbiol.* **2013**, *195*, 579–585. [\[CrossRef\]](#)
58. Bertéti, M.B.D.; Oliveira Filho, O.B.Q.; Freitas, J.D.S.; Bortolucci, W.C.; Silva, G.R.; Gazim, Z.C.; Lívero, F.A.R.; Lovato, E.C.W.; Valle, J.S.; Linde, G.A.; et al. *Lentinus crinitus* basidiocarp stipe and pileus: Chemical composition, cytotoxicity and antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.* **2021**, *247*, 1355–1366. [\[CrossRef\]](#)
59. Wu, J.Y.; Siu, K.C.; Geng, P. Bioactive ingredients and medicinal values of *grifola frondosa* (Maitake). *Foods* **2021**, *10*, 95. [\[CrossRef\]](#)
60. Zhang, X.; Liu, J.; Wang, X.; Hu, H.; Zhang, Y.; Liu, T.; Zhao, H. Structure characterization and antioxidant activity of carboxymethylated polysaccharide from *Pholiota nameko*. *J. Food Biochem.* **2022**, *46*, e14121. [\[CrossRef\]](#)
61. Seweryn, E.; Ziłała, A.; Gamian, A. Health-promoting of polysaccharides extracted from *ganoderma lucidum*. *Nutrients* **2021**, *13*, 2725. [\[CrossRef\]](#)
62. Liu, W.; Wang, H.; Pang, X.; Yao, W.; Gao, X. Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, *46*, 451–457. [\[CrossRef\]](#)
63. Lelamurni, D.; Razak, A.; Ghani, A.A.; Izwan, M.; Lazim, M.; Khulidin, K.A.; Shahidi, F.; Ismail, A. *Schizophyllum commune* (Fries) mushroom: A review on its nutritional components, antioxidative, and anti-inflammatory properties. *Curr. Opin. Food Sci.* **2024**, *56*, 101129. [\[CrossRef\]](#)
64. Li, S.; Wang, A.; Liu, L.; Tian, G.; Wei, S.; Xu, F. Evaluation of nutritional values of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) stipes. *J. Food Meas. Charact.* **2018**, *12*, 2012–2019. [\[CrossRef\]](#)

65. Ramos, M.; Burgos, N.; Barnard, A.; Evans, G.; Preece, J.; Graz, M.; Ruthes, A.C.; Jiménez-Quero, A.; Martínez-Abad, A.; Vilaplana, F.; et al. Agaricus bisporus and its by-products as a source of valuable extracts and bioactive compounds. *Food Chem.* **2019**, *292*, 176–187. [\[CrossRef\]](#)
66. Atila, F.; Owaid, M.N.; Shariati, M.A. The nutritional and medical benefits of Agaricus Bisporus: A review. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* **2017**, *7*, 281–286. [\[CrossRef\]](#)
67. Wisitrassameewong, K.; Karunarathna, S.C.; Thongklang, N.; Zhao, R.; Callac, P.; Moukha, S.; Férandon, C.; Chukeatirote, E.; Hyde, K.D. Agaricus subrufescens: A review. *Saudi J. Biol. Sci.* **2012**, *19*, 131–146. [\[CrossRef\]](#)
68. Dong, Y.R.; Cheng, S.J.; Qi, G.H.; Yang, Z.P.; Yin, S.Y.; Chen, G.T. Antimicrobial and antioxidant activities of Flammulina velutipes polysacchrides and polysacchride-iron(III) complex. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *161*, 26–32. [\[CrossRef\]](#)
69. Roda, E.; Priori, E.C.; Ratto, D.; De Luca, F.; Di Iorio, C.; Angelone, P.; Locatelli, C.A.; Desiderio, A.; Goppa, L.; Savino, E.; et al. Neuroprotective metabolites of hericium erinaceus promote neuro-healthy aging. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6379. [\[CrossRef\]](#)
70. Wong, J.H.; Wang, H.X.; Ng, T.B. Marmorin, a new ribosome inactivating protein with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the mushroom Hypsizigus marmoreus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 669–674. [\[CrossRef\]](#)
71. Tsai, C.C.; Li, Y.S.; Lin, P.P. Inonotus obliquus extract induces apoptosis in the human colorectal carcinoma's HCT-116 cell line. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *96*, 1119–1126. [\[CrossRef\]](#)
72. Duru, K.C.; Kovaleva, E.G.; Danilova, I.G.; van der Bijl, P. The pharmacological potential and possible molecular mechanisms of action of Inonotus obliquus from preclinical studies. *Phyther. Res.* **2019**, *33*, 1966–1980. [\[CrossRef\]](#)
73. Sun, Y. Biological activities and potential health benefits of polysaccharides from Poria cocos and their derivatives. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *68*, 131–134. [\[CrossRef\]](#)
74. Klaus, A.; Kozarski, M.; Niksic, M.; Jakovljevic, D.; Todorovic, N.; Stefanoska, I.; Van Griensven, L.J.L.D. The edible mushroom Laetiporus sulphureus as potential source of natural antioxidants. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2013**, *64*, 599–610. [\[CrossRef\]](#)
75. Adamska, I. The Possibility of Using Sulphur Shelf Fungus (Laetiporus sulphureus) in the Food Industry and in Medicine—A Review. *Foods* **2023**, *12*, 1539. [\[CrossRef\]](#)
76. Li, J.P.; Lee, Y.P.; Ma, J.C.; Liu, B.R.; Hsieh, N.T.; Chen, D.C.; Chu, C.L.; You, R.I. The enhancing effect of fungal immunomodulatory protein-volvarella volvaria (Fip-vvo) on maturation and function of mouse dendritic cells. *Life* **2021**, *11*, 471. [\[CrossRef\]](#)
77. Nataraj, A.; Govindan, S.; Ramani, P.; Subbaiah, K.A.; Sathianarayanan, S.; Venkidasamy, B.; Thiruvengadam, M.; Rebezov, M.; Shariati, M.A.; Lorenzo, J.M.; et al. Antioxidant, Anti-Tumour, and Anticoagulant Activities of Polysaccharide from Calocybe indica (APK2). *Antioxidants* **2022**, *11*, 1694. [\[CrossRef\]](#)
78. Tonin, F.; Tieves, F.; Willot, S.; Van Troost, A.; Van Oosten, R.; Breestraat, S.; Van Pelt, S.; Alcalde, M.; Hollmann, F. Pilot-Scale Production of Peroxygenase from Agrocybe aegerita. *Org. Process Res. Dev.* **2021**, *25*, 1414–1418. [\[CrossRef\]](#)
79. Zhang, L.; Yan, M.; Liu, C. A comprehensive review of secondary metabolites from the genus Agrocybe: Biological activities and pharmacological implications. *Mycology* **2023**, *15*, 162–179. [\[CrossRef\]](#)
80. Grimm, D.; Wösten, H.A.B. Mushroom cultivation in the circular economy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 7795–7803. [\[CrossRef\]](#)
81. Grimm, D.; Kuenz, A.; Rahmann, G. Integration of mushroom production into circular food chains. *Org. Agric.* **2021**, *11*, 309–317. [\[CrossRef\]](#)
82. Özcan, M.M.; Dursun, N.; Al Juhaimi, F.Y. Heavy metals intake by cultured mushrooms growing in model system. *Environ. Monit. Assess.* **2013**, *185*, 8393–8397. [\[CrossRef\]](#)
83. Rayman, M.P. Selenium and human health. *Lancet* **2012**, *379*, 1256–1268. [\[CrossRef\]](#)
84. Bañuelos, G.S.; Lin, Z.; Broadley, M. Selenium biofortification. In *Selenium in Plants: Molecular, Physiological, Ecological and Evolutionary Aspects*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2015; p. 145. [\[CrossRef\]](#)
85. Kushwaha, A.; Singh, O.; Patil, A.; Kushwaha, K. Effect of zinc sulphate nanoparticle on productivity of oyster mushroom (Pleurotus florida). *Pharma Innov. J.* **2021**, *10*, 2472–2475.
86. Rana, S.; Kapoor, S.; Sharma, S.; Kalia, A. Pleurotus florida mediated biosynthesis of nanoparticles and biofortification. *Food Sci. Biotechnol.* **2023**, *32*, 2079–2092. [\[CrossRef\]](#)
87. Weng, X.; Li, H.; Ren, C.; Zhou, Y.; Zhu, W.; Zhang, S.; Liu, L. Calcium Regulates Growth and Nutrient Absorption in Poplar Seedlings. *Front. Plant Sci.* **2022**, *13*, 887098. [\[CrossRef\]](#)
88. Mleczek, M.; Siwulski, M.; Rzymiski, P.; Budzyńska, S.; Gąsecka, M.; Kalač, P.; Niedzielski, P. Cultivation of mushrooms for production of food biofortified with lithium. *Eur. Food Res. Technol.* **2017**, *243*, 1097–1104. [\[CrossRef\]](#)
89. Kalač, P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *J. Sci. Food Agric.* **2013**, *93*, 209–218. [\[CrossRef\]](#)
90. Dimopoulou, M.; Kolonas, A.; Mourtakos, S.; Androutsos, O.; Gortzi, O. Nutritional Composition and Biological Properties of Sixteen Edible Mushroom Species. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 8074. [\[CrossRef\]](#)
91. Mleczek, M.; Siwulski, M.; Budka, A.; Mleczek, P.; Budzyńska, S.; Szostek, M.; Kuczyńska-Kippen, N.; Kalač, P.; Niedzielski, P.; Gąsecka, M.; et al. Toxicological risks and nutritional value of wild edible mushroom species -a half-century monitoring study. *Chemosphere* **2021**, *263*, 128095. [\[CrossRef\]](#)
92. Hansen, G.H.; Lübeck, M.; Frisvad, J.C.; Lübeck, P.S.; Andersen, B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochem.* **2015**, *50*, 1327–1341. [\[CrossRef\]](#)

93. Li, J.; Wen, S.; Zhang, B.; Wang, F. Selenium Enrichment of the Edible Medicinal Mushroom *Antrodia camphorata* by Submerged Fermentation. *Molecules* **2023**, *28*, 3036. [[CrossRef](#)]
94. Wang, J.; Jiang, Q.; Huang, Z.; Wang, Y.; Roubik, H.; Yang, K.; Cai, M.; Sun, P. Solid-State Fermentation of Soybean Meal with Edible Mushroom Mycelium to Improve Its Nutritional, Antioxidant Capacities and Physicochemical Properties. *Fermentation* **2023**, *9*, 322. [[CrossRef](#)]
95. Li, F.; Vijayasankaran, N.; Shen, A.; Kiss, R.; Amanullah, A. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs* **2010**, *2*, 466–479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Teklu, D.; Gashu, D.; Joy, E.J.M.; Amede, T.; Broadley, M.R. Effectiveness of Agronomic Biofortification Strategy in Fighting against Hidden Hunger. *Agronomy* **2023**, *13*, 2173. [[CrossRef](#)]
97. Yadav, D.N.; Bansal, S.; Tushir, S.; Kaur, J.; Sharma, K. *Advantage of Biofortification over Fortification Technologies*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2020; ISBN 9780128184448.
98. Rizzo, G.; Goggi, S.; Giampieri, F.; Baroni, L. A review of mushrooms in human nutrition and health. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *117*, 60–73. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Comparative Iron biofortification in *Hericium erinaceus*: A study of different ionic forms and their uptake efficiency

Klaudia Słyszczak^{a,*}, Marek Siwulski^b, Barbara Frąszczak^b, Adrian Wiater^c, Adam Waśko^a

^a Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, Faculty of Food Science and Biotechnology, University of Life Sciences in Lublin, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland

^b Department of Vegetable Crops, Faculty of Agriculture, Horticulture and Biotechnology, Poznań University of Life Sciences, Dąbrowskiego 159, 60-594 Poznań, Poland

^c Department of Industrial and Environmental Microbiology, Institute of Biological Sciences, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Iron biofortification
Hericium erinaceus
Lion's mane mushroom
Mushroom cultivation
Functional foods

ABSTRACT

Iron biofortification of *Hericium erinaceus* is a promising strategy for enhancing its nutritional profile. This study examined the effects of supplementing growth substrates with various iron forms (FeCl₃·6H₂O, FeSO₄·7H₂O, and FeHBED) on iron uptake, accumulation, and metabolic profiles in *H. erinaceus* fruiting bodies. The results indicated that iron supplementation not only increased iron content but also affected several metabolic pathways, including energy metabolism, oxidative stress response, and biosynthesis. The choice of iron significantly influenced mushroom growth, mineral composition, and metabolite levels. FeCl₃·6H₂O resulted in the highest iron accumulation, FeSO₄·7H₂O enhanced biomass production, and FeHBED (water-soluble iron chelate) exhibited unique effects on energy metabolism and antioxidant protection. These findings suggest that iron biofortification could facilitate the development of nutritionally enhanced *H. erinaceus* products, potentially addressing iron deficiency while preserving the medicinal properties of mushrooms. Further research is necessary to optimise iron biofortification techniques and assess the bioavailability and health benefits of iron-enriched *H. erinaceus* in human nutrition.

1. Introduction

Iron is extremely important in the human body is even enormous. This element is responsible for the proper functioning of the nervous system and for the necessary oxygenation of various systems and muscles. Iron is an element that is part of many proteins and enzymes in the body, including haemoglobin and myoglobin. It is also used in the formation of erythrocytes in the bone marrow. Tissue enzymes that include iron contain cytochromes, catalase, and peroxidases, among others. This element determines their proper functioning (Kumari & Chauhan, 2022). It is also responsible for the relevant physical and intellectual functioning in humans. Iron also plays an important role in supporting the immune system, as it activates immune cells (Zulfiqar et al., 2024).

Ferroptosis is a recently discovered iron-related phenomenon. Ferroptosis is a type of iron-dependent cell death. It is becoming increasingly significant in cancer research. When cancer cells are resistant to conventional apoptotic processes, inducing iron-dependent death may

be a viable treatment strategy. During this process, the accumulation of oxidized lipids causes cell death (Chen et al., 2023; Xiong et al., 2021).

Iron deficiency is a major cause of anaemia and is the most common deficiency of various elements. The World Health Organization (WHO) has identified anaemia as the most common nutritional deficiency worldwide, affecting 30 % of the population. An estimated 800 million children and women worldwide suffer from anaemia (Budzyńska et al., 2022).

A phenomenon associated with micronutrient malnutrition is “hidden hunger”. It can lead to serious diseases, such as intellectual impairment, poor growth, increased risk of morbidity, and perinatal complications. In addition, it can exacerbate chronic and infectious diseases, thereby significantly affecting the quality of life (Jha & War-kentin, 2020).

Various approaches, such as dietary diversity, nutritional supplements, food fortification, and biofortification, are being used to improve the nutritional value of crops and avoid micronutrient deficiency

* Corresponding author.

E-mail addresses: klaudia.kowalik@up.lublin.pl (K. Słyszczak), marek.siwulski@up.poznan.pl (M. Siwulski), barbara.fraszczak@up.poznan.pl (B. Frąszczak), adrian.wiater@mail.umcs.pl (A. Wiater), adam.wasko@up.lublin.pl (A. Waśko).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.147238>

Received 29 June 2025; Received in revised form 14 November 2025; Accepted 18 November 2025

Available online 19 November 2025

0308-8146/© 2025 Elsevier Ltd. All rights reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

problems (Sharma et al., 2017). Biofortification is the process of improving the nutritional profile of foods through conventional breeding, agrotechnical interventions, and genetic engineering (Marques et al., 2021). Fungi are increasingly being considered in this process because of their ability to accumulate various elements. During the growth period, fungi can absorb and bioaccumulate mineral elements in the form of organic molecules. Therefore, mushrooms can be used to provide nutrients that are not sufficiently available in the human diet (Słyszcz et al., 2024).

Hericum erinaceus (Bull.) Pers., known as Lion's Mane, is a medicinal mushroom valued for its bioactive properties. It is characterised by its neuroprotective potential, which is important in neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's disease (Szućko-Kociuba et al., 2023). Its active compounds, including erinacins and hericenones, have been extensively studied for their ability to promote nerve cell regeneration (Qiu et al., 2024). In addition to its neuroprotective effects, it is also known for its anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, anticancer, and immune-boosting properties. Studies have shown its effects on promoting intestinal health and combating oxidative stress (Chong et al., 2020).

H. erinaceus can be cultivated on a large scale using inexpensive substrates such as artificial and agricultural waste (Banerjee et al., 2024). Accurate data on the global production of *H. erinaceus* are not widely available in public reports. Nevertheless, China is the largest producer of this fungus, which is grown for fruiting bodies and underwater fermentation to produce bioactive compounds such as erinacins belong to the group of cyathin diterpenoids. Production occurs on a varying scale in other countries in Asia, Europe, and North America, mainly for dietary supplements and traditional medicine. In 2018, the global market for Lion's Mane was estimated to be a booming sector with a growing demand for health products such as extracts and supplements. Cultivation and production processes include both substrate and immersion fermentation methods, allowing for the increased availability of mushrooms and their bioactive compounds. *H. erinaceus* has unique properties. Its cultivation opens up new prospects in medicine, food, and biotechnology industries (Singh et al., 2022).

The many health advantages of *H. erinaceus* have drawn increasing scientific attention, and research is still being conducted on how to use it in functional meals and dietary supplements. Further research is needed to standardise its use in clinical settings, since the full range of its therapeutic applications is still under investigation, despite there being data supporting its bioactivities.

Although there are not as many articles on *H. erinaceus* (approximately 350) as on shiitake (840) or oyster mushrooms (1600), the growing trend in interest in this fungus is evidence of its potential, according to a review of PubMed publications over the last ten years.

It should be mentioned that there are only a few publications available in the literature on *H. erinaceus* biofortification, mainly focusing on the enrichment of the fungus with Se and Li (Hu et al., 2020; Rzymiski et al., 2017). Our study is the first to investigate and describe the iron biofortification process of *Hericum erinaceus* using three distinct forms of this element. To date, no research has been published on the iron biofortification of *H. erinaceus*, making this work a novel and comprehensive contribution in this area. The present study provides a detailed comparative analysis of the effectiveness of different iron forms and examines their impact on the metabolomic profile of the fungus. This analysis allows us to determine which form of iron is the most effective, to identify the differences between the tested iron forms and their specific effects, as well as to observe metabolic alterations and adaptive mechanisms occurring in *H. erinaceus* in response to iron supplementation. This approach not only advances the understanding of iron enrichment in *H. erinaceus*, but also fills a gap in the existing literature.

The aim of this study was to biofortify *H. erinaceus* using three different forms of iron and to conduct a detailed analysis to determine the most effective form. The study sought to expand knowledge of the

potential for increasing iron content in fungi, which could contribute to developing new food enrichment strategies and optimization cultivation methods to enhance the nutritional value of fruiting bodies.

2. Materials and methods

2.1. Biofortification

2.1.1. Microorganisms and spawn

In this study, the HE-17 strain of *Hericum erinaceus* was used. The spawn on wheat grain was obtained from the Mushroom Collection of Poznań University of Life Sciences (Department of Vegetable Crops).

2.1.2. Substrate preparation

Substrate from a mixture of beach and oak sawdust (3:1 v/v) was used for cultivation. The substrate was additionally supplemented with wheat bran (20 %), cornmeal (5 %), soy meal (5 %), and gypsum (1 %). The mixture was moistened separately with a solution of three iron salts to 60 % moisture. The (1) iron chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); (2) iron sulfate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); and (3) bis(2-hydroxybenzyl) ethylenediamine diacetic acid, ferric potassium complex (FeHBED) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) in concentration 10 mM Fe were used. The control system was free of Fe addition. The substrate was then placed in polypropylene bags with a microfilter at a quantity of 1 kg per bag.

The substrates were sterilised at 121 °C for one hour, after which they were cooled to 25 °C. The substrates were then inoculated with 15 g of spawn (on wheat grain) per bag.

2.1.3. Cultivation

Incubation was conducted at 25 °C and 80–85 % relative air humidity until the substrate was completely covered with mycelium. The bags were then placed in a cultivation room. For fructification, the relative humidity of the air was maintained at 90–95 % and the temperature at 20 ± 1 °C. The cultivation was additionally lit with fluorescent light of 500 lx intensity for 12 h per day. The growth room was aerated in such a way as to maintain CO_2 concentration below 1000 ppm. Carpophores were harvested successively after maturation.

2.1.4. Carpophores preparation

Immediately after harvesting, the fruit bodies were dried at a temperature of 40 °C until a constant weight was obtained. The dried material was placed in vacuum-sealed foil bag.

2.2. Untargeted metabolome in fruiting body mushroom samples

2.2.1. Preparation of material for analysis

A mixture of methanol, water, and acetonitrile (900 μL) in the proportions of 50:25:25 v/v/v with the addition of deuterated internal standards was added to 100 mg of mushroom lyophilisate. The sample was shaken at 2000 rpm at 4 °C for 30 min to dissolve the metabolites in the solution and precipitate the protein. In the next step, the samples were centrifuged for 4 min at 4000 rpm and 4 °C. Next step, 300 μL of the supernatant was transferred to clean chromatography vials. The prepared samples were analysed on the same day using liquid chromatography–mass spectrometry. QC samples were prepared by mixing the test samples in equal proportions and were prepared in the same manner as the test samples.

2.2.2. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis

The analysis was performed using an ExionLC liquid chromatograph equipped with a binary pump, autosampler, and column thermostat coupled with a Triple TOF 6600+ mass spectrometer (Sciex, Framingham, MA, USA). The separation was carried out on a Phenomenex Luna® Omega 1.6 μm polar C18 150 $\times$ 2.1 mm column for 45 min in gradient separation. The mobile phases were as follows: Phase A, Water

with 10 mM ammonium acetate; and Phase B, acetonitrile with 0.1 % formic acid. The column injection was 2 μ L and the column temperature was 20 °C. The phase flow was 0.2 mL/min. Spectral analysis was performed in the positive ion mode with a capillary voltage of 5500 V, Curtain gas (CUR) of 25 psi, ion source gas 1 (GS1) of 45 psi, ion source gas 2 (GS2) of 60 psi, and ion source temperature of 400 °C. The mode negative ions at a capillary voltage of 4500 V, Curtain gas (CUR) of 25 psi, ion source gas 1 (GS1) of 45 psi, ion source gas 2 (GS2) of 60 psi, and ion source temperature of 350 °C. The spectrometer collected spectral data in the SWATH mode.

2.2.3. Analysis of the results

Untargeted LC-MS/MS metabolomic profiling was performed on a SCIEX HR-MS platform. Metabolites with signal intensities above the detection threshold and library match scores within manufacturer criteria (mass error < 5 ppm, verified MS/MS fragments) were retained ($n = 115$). Significantly altered metabolites ($n = 28$) were identified using $VIP > 1.0$ and $p < 0.05$. Samples were spiked with deuterated internal standards (micromolar range) to correct for matrix effects and ensure quantitative accuracy.

2.3. ICP-MS

Metal ion concentrations were determined using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-OES, 720 ES, Varian, Australia). The sample introduction system consisted of a Conikal® nebulizer, cyclonic spray chamber, and three-channel peristaltic pump. The optimal operating parameters used for determination of the studied elements by the ICP-OES technique were as follows: power 1200 W, plasma argon gas flow rate 15 L/min, auxiliary argon gas flow rate 2.25 dm³/min, nebulizer argon gas flow rate 0.2 dm³/min, pump rate 12 rpm as well as analytical wavelength for Ca(II) 393.366 nm, Mg(II) 280.270 nm, Zn(II) 213.857 nm, Fe(III) 259.940 nm, K(I) 769.897 nm, Na(II) 589.592 nm, Cu(II) 327.395 nm, Mn(II) 257.610 nm. The ICP-OES instrument was calibrated using ICP standards for the above-mentioned ions.

2.4. Fourier-transform infrared (FTIR) spectral measurements

FTIR spectra were recorded using an IRSpirit spectrometer equipped with a horizontal ATR accessory (PIKE Technologies, Japan) featuring a ZnSe crystal with a 45° geometry, which enabled multiple internal reflections of the laser beam during measurement. Samples were prepared according to the procedure described above, and for each sample, 40 scans were collected in a single measurement within the spectral range of 450–3800 cm⁻¹. The obtained data were automatically averaged using LabSolutions software. For each sample, three independent measurements were performed at a spectral resolution of 2 cm⁻¹. The ATR crystal was kept clean by rinsing with ultra-pure solvents supplied by Merck KGaA. The resulting spectra were analysed and processed using Grams AI software (version 9.3, ThermoGalactic Industries, Waltham, MA, USA) and OriginPro 2021b (version SR1 9.8.5.204, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

2.5. Imaging of samples by transmission electron microscopy (TEM)

The samples were crushed into a fine powder using an agate mortar. The resulting powder was mixed with 99.8 % ethanol (POCH) to form a slurry and placed in an ultrasonic homogeniser for 10 s. The suspension containing the samples was pipetted, applied to copper grids (200 mesh/in. - 200 mesh) coated with “lacey” formvar stabilised with carbon (from Ted Pella), and left on blotting paper until the ethanol evaporated. Subsequently, the samples were placed in a special holder and transferred to an electron microscope for imaging. A Titan G2 60–300 kV transmission electron microscope (FEI Company) was used. Sample mapping (determination of distribution, distribution, and elements in

the samples) was carried out in STEM mode, collecting the EDS spectrum from each location corresponding to the pixels of the map, point by point. The collected maps were presented as a matrix of pixels, with the colour signifying the mapped element and the intensity corresponding to the percentage of the element.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Statistica software, with significance levels set at $P < 0.05$. Data were subjected to ANOVA, followed by Tukey's HSD test, to identify significant differences among treatments.

3. Results and discussion

3.1. Morphology and biomass of fruiting bodies

The photo shows a culture of *H. erinaceus*. Each bag contained a different experimental variant associated with the addition of different forms of iron. No significant differences were observed in the macroscopic evaluation of the samples compared to the control. It can only be observed that in the variant with FeCl₃·6H₂O and FeHBED the mycelium is also abundant, but the fruiting bodies are more condensed (Fig. 1). However, in terms of biomass, differences were observed in the variant with FeSO₄·7H₂O, where the growth of the fungus was higher than that of the control, and in the variant with FeHBED, where the growth was weaker than that of the control (Fig. 2).

It is evident that overexposure to or deficiency of various elements affects human health. It is determined by absorption, the degree of interaction with physiological processes, and metabolism. Iron is responsible for many vital functions in the human body, including oxygen transport, deoxyribonucleic acid (DNA) synthesis, and electron transport. Iron can form free radicals; therefore, its concentration in tissues must be strictly regulated, as excessive amounts can lead to tissue degradation. Fe is a commonly found element on Earth; however, despite its geological abundance, its bioavailability is low. This is due to the fact that iron forms oxides that are insoluble and therefore not readily available to living organisms. The main inhibitors of iron absorption are polyphenols, phytic acid, calcium, and peptides from partially digested proteins. The enhancing agent is ascorbic acid (Gozzelino & Arosio, 2016). Iron deficiency anaemia (IDA) affects a large segment of the population in many countries. Iron requirements are not met due to low iron absorption, insufficient intake, and poor bioavailability. Biofortification is one attempt to raise iron levels (Latunde-Dada, 2024). In studies on biofortification with iron, *H. erinaceus* has been used. No previous research has focused on iron biofortification in *H. erinaceus*. However, several studies have investigated the enrichment of this mushroom with lithium and selenium. Rzymiski et al. (2017) investigated the growth, mineral accumulation, and elemental composition of *H. erinaceus* cultivated on lithium-enriched substrates. Lithium supplementation did not significantly affect the biomass, morphology, shape, or size of the fruiting bodies, regardless of the Li concentration applied. Moreover, no substantial alterations in the overall mineral profile were observed; however, a concentration-dependent uptake and accumulation of lithium in the fruiting bodies was observed. These findings suggest that *H. erinaceus* is a promising candidate for further studies on lithium-enriched functional foods, particularly with regard to lithium bioavailability from mushroom matrices, safety profiles, biological activity in experimental animal models, and, ultimately, clinical evaluations in humans (Rzymiski et al., 2017). Egressy-Molnár et al. (2016) investigated selenium enrichment. They concluded that *H. erinaceus* cultivated in compost containing selenite could serve as an alternative source for selenium supplementation. High levels of Se-methionine (Se-Met) and Se-methylselenocysteine (MSC) have been detected (Egressy-Molnár et al., 2016). Hu et al. (2020) concluded that the growth of *H. erinaceus* is more



Fig. 1. Macroscopic characteristics of control (a) and treated fruiting bodies growing on substrates enriched with $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (b), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (c), and FeHBED (d) at a concentration of 10 mM.

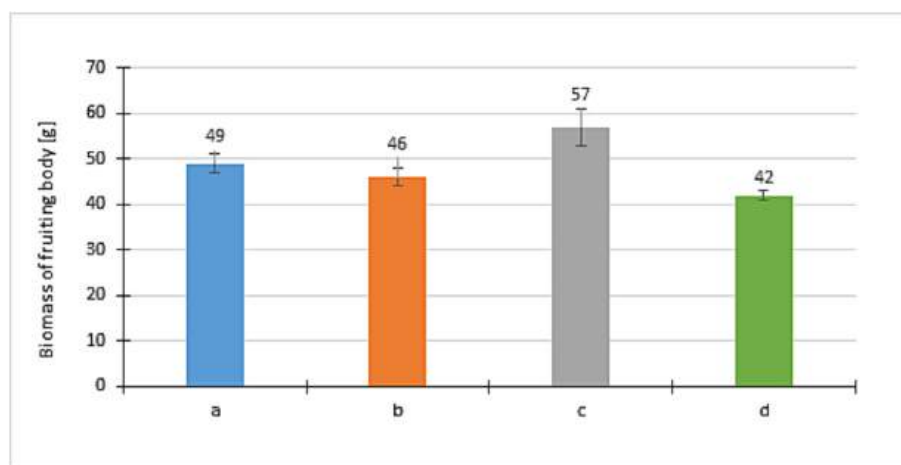


Fig. 2. Biomass of fruiting bodies of control (a) and treated fruiting bodies growing on substrate enriched with $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (b), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (c), and FeHBED (d) at concentrations of 10 mM.

sensitive to Se-methionine (SeMet) than to selenate and selenite. Approximately half of the selenium from Se-enriched fruiting bodies was released during *in vitro* gastrointestinal digestion. Additionally, selenium supplementation disrupts the accumulation of other trace elements in *H. erinaceus* (Hu et al., 2020). Niedzielski et al. (2014) observed that the addition of selenium salts to the cultivation substrate induced macroscopic changes in the fruiting bodies of mushrooms. Selenium concentrations exceeding 0.4 mM led to a reduction in the number of carpophores or their complete absence. Moreover, alterations in the colouration of fruiting bodies have been recorded (Niedzielski et al., 2014). Jozifek et al. (2025) investigated selenium uptake by *H. erinaceus* basidiocarps grown on various substrates and its effects on growth and yield (Jozifek et al., 2025).

3.2. Metabolome

In this study, significant changes were observed in 28 of the 115 measured metabolites in *H. erinaceus* after the addition of various forms of iron. These results confirm that biofortification is an effective tool for modifying the micronutrient content and accompanying metabolic changes in living organisms (Zulfikar et al., 2024). The figure brings together the results from the control, and the other three columns show how metabolite levels change after biofortification with various iron compounds (Fig. 3). Values highlighted in red indicate significant differences from the control. It can be seen that some metabolites are increased and others are decreased depending on the iron compound used. In the case of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, there was a strong increase in citrate,

which is a key intermediate of the Krebs cycle, responsible for ATP production in the mitochondria (Zhang & Fernie, 2023); a decrease in nucleotide metabolism - adenine, guanosine, and inosine, which may indicate a potential reduction in the pool of nucleotides necessary for DNA replication and repair; increased levels of amino acids - arginine, phenylalanine, and tyrosine; moderate activation of methylation: dimethylglycine, *N,N,N*-trimethylglycine; and oxidative stress - a decrease in L-ergothioneine. Fe^{3+} activates energy metabolism but also promotes Fenton-Haber-Weiss reactions, generating free radicals and increasing oxidative stress, which can inhibit enzymes involved in DNA synthesis (Sheridan et al., 2016). In $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Fe^{2+} effectively promoted energy metabolism by increasing both citrate and citraconate levels, indicating an accelerated substrate flow through the Krebs cycle. The parallel increase in AMP and IMP suggests stimulation of nucleotide synthesis pathways, which promote biosynthetic processes and cell proliferation (Gasmi et al., 2021). In contrast, the variant with FeHBED showed the strongest increase in energy metabolism-citrate, IMP, glycerophosphocholine, and antioxidant protection-L-cystationin (Buturi et al., 2022). In all variants, there was a decrease in L-ergothioneine, a powerful antioxidant found in mushrooms that protects proteins and lipids from oxidation (Borodina et al., 2020). This may be due to increased oxidative stress in the presence of iron (Fu & Shen, 2022). In contrast, L-cystionine levels increased in all iron forms. This implies that each form of iron stimulates sulfur metabolism, promoting cysteine and glutathione synthesis, which helps protect against oxidative stress. This may be a compensatory mechanism in response to a decrease in ergothioneine (Hasanuzzaman et al., 2017; G. K. Rai et al., 2023). In

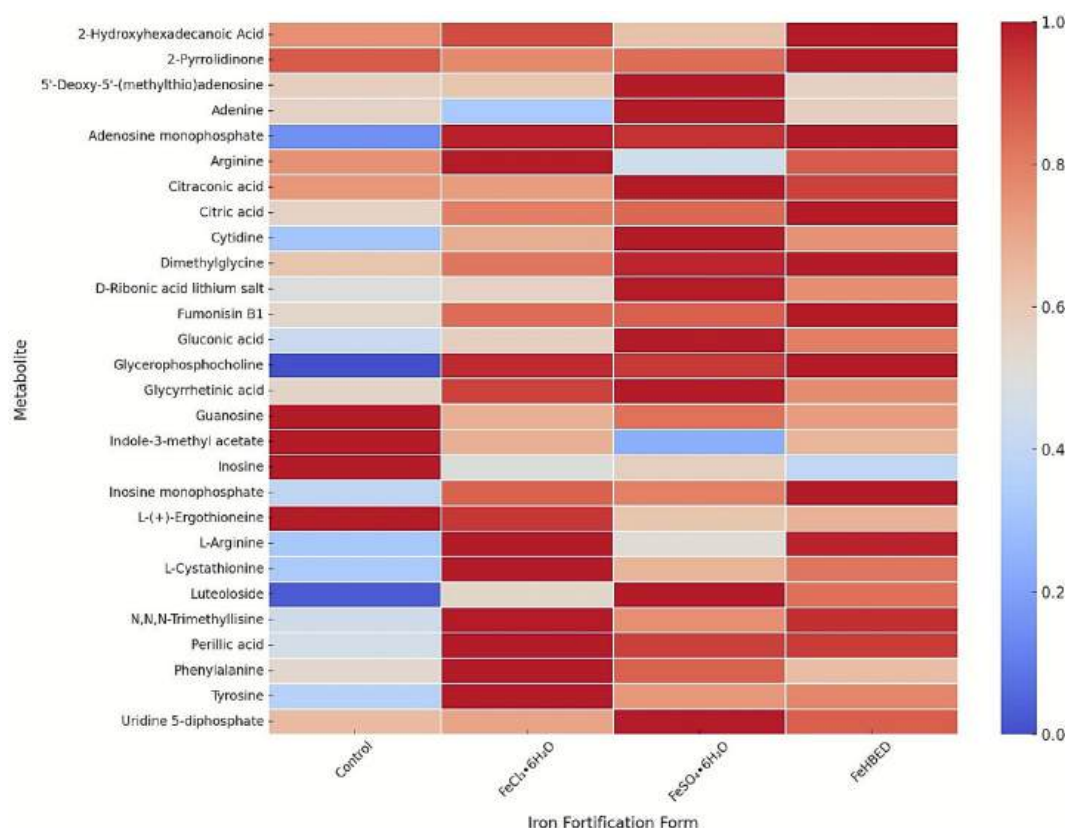


Fig. 3. List of metabolite levels in the control and treated fruiting bodies growing on substrates enriched with 10 mM FeCl₃·6H₂O, FeSO₄·7H₂O, and FeHBED.

summary, iron biofortification produces diverse effects on *H. erinaceus* metabolism, modulating pathways related to energy metabolism, oxidative stress and adaptation, protein and amino acid biosynthesis, protection and detoxification, lipid metabolism, and cell membrane fusion. Each form of iron - Fe³, Fe², and HBED chelate - generates a unique metabolic profile, which should be considered when planning strategies to improve the nutritional value of fungi and other biofortified organisms.

3.3. Content of selected elements in *H. erinaceus* fruiting bodies

Table 1 shows the data on the content of individual elements depending on the form of iron used in the biofortification process. FeCl₃·6H₂O strongly increased the iron, copper, and zinc contents but drastically decreased the sodium content. FeSO₄·7H₂O causes the greatest increase in calcium, but lowers iron and sodium. FeHBED raises calcium and sodium levels but lowers iron levels. Biofortification did not affect the levels of elements such as magnesium, manganese, and potassium. Different iron compounds have different effects on iron levels

and other elements. It can be observed that changing the form of iron also affects other minerals, which may be due to mechanisms of competition for binding sites, transporters, or changes in environmental pH. The interpretation of these data may be crucial for selecting iron forms for supplementation or in studies on mineral interactions in organisms. Further investigation of the mechanisms responsible for these differences is needed to explain why particular forms of iron affect the levels of other elements. Owing to the limited literature on mushroom supplementation with various forms of iron, it is challenging to directly compare the obtained results with those of other studies. However, research on the supplementation of other food products has clearly demonstrated that the form of iron present in the growth medium significantly influences plant iron accumulation. In a study on *Sorbus commixta*, both the source of iron (FeSO₄, Fe-EDTA, and Fe-DTPA) and the pH of the medium were shown to affect plant growth and development *in vitro* (Xiao et al., 2021). In plants, iron and zinc interact: elevated Fe levels reduce Zn availability, whereas under low Fe conditions, there is increased expression of transporters that uptake Zn (Hanikenne & Bouché, 2023). Iron and copper share some of the same

Table 1

Content (mg/kg dry weight) of selected elements in *H. erinaceus* fruiting bodies. Different superscript letters (a–d) within a column indicate statistically significant differences ($P < 0.05$) among treatments, as determined by one-way ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test. Values sharing the same letter are not significantly different, while values marked with different letters differ significantly at the 95 % confidence level.

Treatment	Fe	Mg	Zn	Ca	K	Na	Cu	Mn
Control	136.43 ± 13.64b	1172.55 ± 58.63a	114.45 ± 8.58b	350.53 ± 42.06b	35,174.09 ± 1406.96a	199.51 ± 23.94b	29.41 ± 3.53b	19.47 ± 1.95b
FeCl ₃ ·6H ₂ O	197.04 ± 19.70a	1184.81 ± 59.24a	147.26 ± 11.04a	440.32 ± 52.84b	35,843.60 ± 1433.74a	20.38 ± 2.45c	47.67 ± 5.72a	21.78 ± 2.18a
FeSO ₄ ·7H ₂ O	65.99 ± 6.60d	1079.40 ± 53.97b	117.46 ± 8.81b	1298.59 ± 155.83a	35,770.26 ± 1430.81a	129.37 ± 15.52b	26.47 ± 3.18b	16.00 ± 1.60c
FeHBED	100.25 ± 10.03c	1118.44 ± 55.92ab	120.81 ± 9.06b	556.94 ± 66.83b	34,513.58 ± 1380.54a	286.09 ± 34.33a	27.39 ± 3.29b	17.65 ± 1.76bc

transport mechanisms in the roots, and higher doses of Fe can inhibit Cu uptake (S. Rai et al., 2021). Significant changes in Ca, Cu, and Na content may result from various mechanisms. One of them is competition and interaction between cations and metal uptake systems. The level of metals in is regulated by many systems, and a change in iron availability can affect the uptake or transport of other metals, e.g., through direct competition for transporters or through changes in transporter expression (Philpott, 2006). Copper plays an important role in iron acquisition by fungi, e.g., oxidases necessary for iron uptake. Changes in iron availability can disrupt copper homeostasis (Smith et al., 2017). The chemical form of added iron changes the activity of free ions, redox properties, and complexation in the substrate, which affects the availability of metals (Weger et al., 2009). The addition of various iron salts can alter the pH of the substrate, ionic strength, and availability of other minerals. These physicochemical changes can cause changes in the release of certain ions from the substrate matrix, thereby altering their uptake into the fruiting bodies (Maryam et al., 2022). Sodium content is regulated by fungal Na⁺/ATPase pumps and antiporters; large changes in external ionic composition or pH can alter the dynamics of Na⁺ + efflux/influx (Deng et al., 2023). Interestingly, the Fe content in the fruiting bodies of the FeSO₄·7H₂O and FeHBED variants was lower than that in the control, indicating that the presence of supplemental iron does not necessarily translate into increased accumulation. This phenomenon can be attributed to the limited bioavailability of Fe depending on its chemical form and to the regulatory mechanisms of metal homeostasis in *H. erinaceus*. In the FeSO₄·7H₂O treatment, ferrous ions (Fe²⁺) are rapidly oxidized in the substrate to poorly soluble ferric hydroxides, reducing their uptake efficiency. Conversely, the FeHBED chelate forms highly stable complexes with Fe³⁺, making the metal less accessible for biological assimilation. Additionally, fungi actively control Fe transport and storage to prevent oxidative stress, which may lead to reduced translocation of Fe to the fruiting bodies. Therefore, the lower Fe concentrations observed in these treatments likely result from a combination of physicochemical limitations in Fe availability and physiological regulation of iron uptake and transport.

3.4. FTIR

The FTIR spectra of the control samples and samples modified with iron salt additives (FeCl₃·6H₂O, FeSO₄·7H₂O, and FeHBED complex) were compared. FTIR spectra for the control and samples after

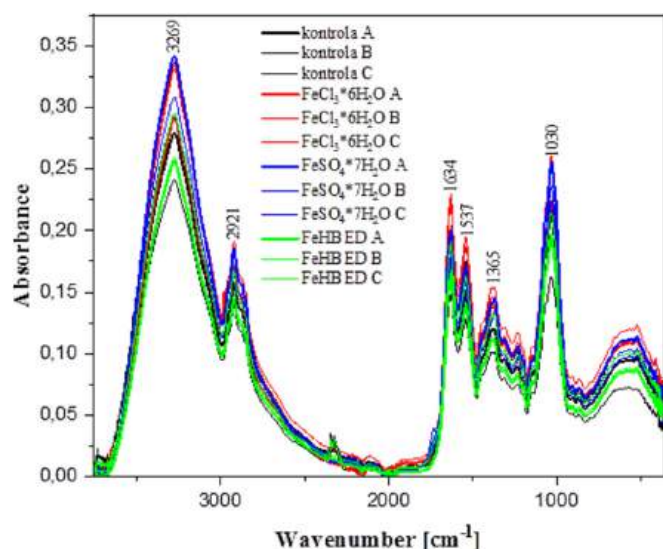


Fig. 4. FTIR absorbance spectra of control and treated fruiting bodies of *H. erinaceus* growing on substrates enriched with FeCl₃·6H₂O, FeSO₄·7H₂O, and FeHBED at concentrations of 10 mM.

biofortification with the three forms of iron are shown in Fig. 4. Special attention was paid to changes in the absorption bands in the 3000–1000 cm⁻¹ range, including the vibrations of -OH/NH groups, C—H stretching, carbonyl vibrations, and other functional groups in the “fingerprint” region. The goal was to determine the effect of additives on the chemical composition or interactions in the samples through changes in the positions and intensities of the bands and to identify characteristic differences for each modification relative to the control samples. Comparative analysis of the spectra showed that the iron salt additives affected the arrangement of the functional groups of the samples, with the nature of the changes depending on the form of the added iron. FeCl₃·6H₂O caused the strongest changes: significant coordination of iron with carboxyl groups and a reduction in free -OH content. Fe likely forms bridges between different molecules, affecting the sample structure. In addition, FeCl₃ may partially degrade the protein components. These changes indicate a modification of the chemical composition: conversion of -COOH to -COO-Fe groups and possible cross-linking of the organic matrix by Fe³⁺. FeSO₄·7H₂O produces similar but milder effects. The formation of Fe-carboxylic bonds and a decrease in the intensity of -OH were also observed, but these changes were less pronounced than those for FeCl₃. This indicates weaker complexation or partial oxidation in the sample. The lack of strong interactions with amide groups suggests less interference with the protein composition. Overall, FeSO₄ mainly affected the carboxyl groups but did not drastically alter other elements of the sample. FeHBED behaves differently; it does not directly modify the functional groups of the samples but contributes its own signals to the spectrum. The bands of the samples bound to -OH, C=O, C—H, or amides remained almost positionally unchanged, and only their relative intensities changed when summed with the bands of the HBED ligand. The appearance of strong carboxylate bands indicates the presence of chelate in the sample. This indicates that the addition of FeHBED did not affect the chemical composition of the samples. FeHBED remained a distinct phase mixed with the sample, reflecting the absence of shifts in the original bands. Inorganic Fe³⁺ and Fe²⁺ salts are integrated into existing sample structures by binding to carboxyl groups and altering the hydrogen bond network, while the FeHBED complex acts mainly as an additional component without significantly disrupting the original functional groups. This analysis of the spectra provided information on how the iron additives bind and interact with the sample matter. In the case of salt, there was a chemical modification, while in the case of chelate, there was mainly a physical introduction of the new compound without a strong chemical interaction with the components of the samples.

3.5. EDS mapping

Figs. 5–8 show the results of mapping objects in the STEM mode using an EDS X-ray fluorescence spectrometer. The colour maps show the distribution of elements in the observed samples. The control identified the presence of the following elements: C, O, Mg, K, P, and S. In the FeCl₃·6H₂O sample, the following elements were identified: C, O, Mg, K, P, S, Ca, and Na. In the FeSO₄·7H₂O sample, the following elements were identified: C, O, Mg, K, P, and S. In the FeHBED sample, the presence of the following elements was identified: C, O, Mg, K, P, S, and Si.

4. Conclusion

The study on the iron biofortification of *Herichium erinaceus* demonstrates significant potential for enhancing the nutritional value of this medicinal mushroom. By supplementing growth substrates with different iron forms (FeCl₃·6H₂O, FeSO₄·7H₂O, and FeHBED), the study revealed notable effects on iron uptake, accumulation, and metabolic profiles in *H. erinaceus* fruiting bodies. The findings indicate that iron supplementation not only increases iron content but also influences various metabolic pathways, including energy metabolism, oxidative stress response and compound biosynthesis. Each iron form exhibited

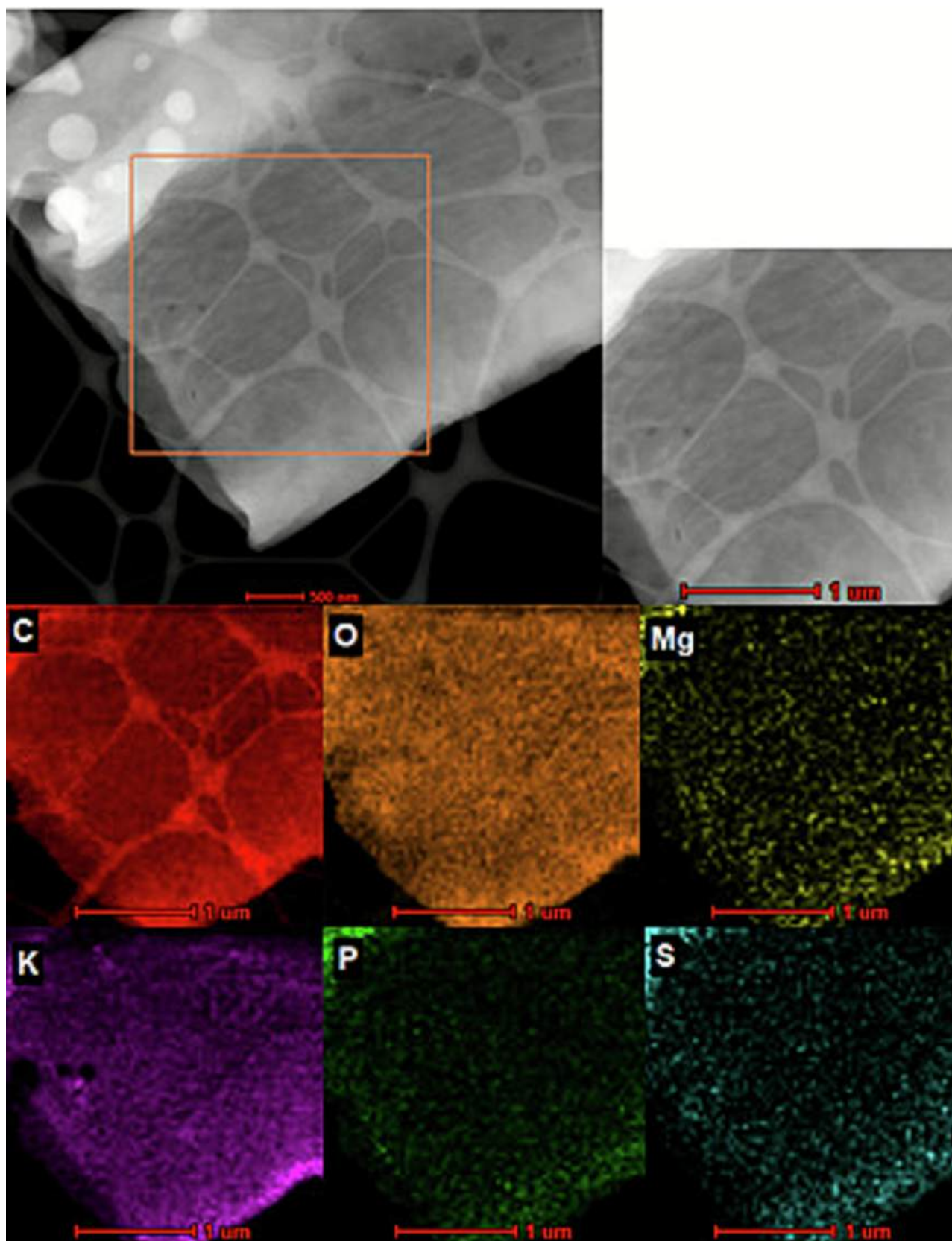


Fig. 5. Overall STEM-EDS analysis of the control. STEM image and maps of individual elements C, O, Mg, K, P, and S in the scan area indicated by the box.

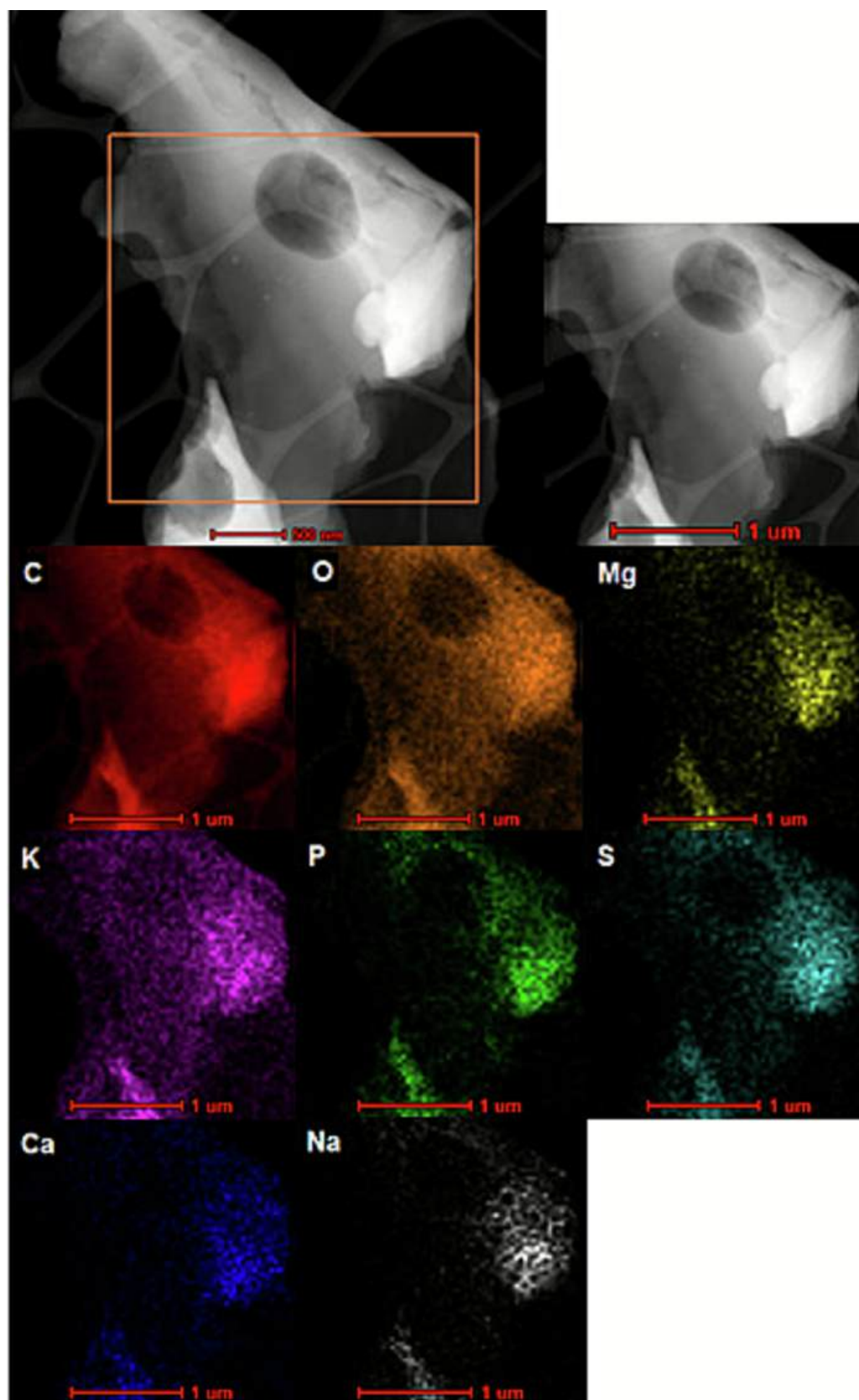


Fig. 6. Overall STEM-EDS analysis of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ STEM image, maps of individual elements C, O, Mg, K, P, S, Ca, and Na in the scanning area indicated by the box.

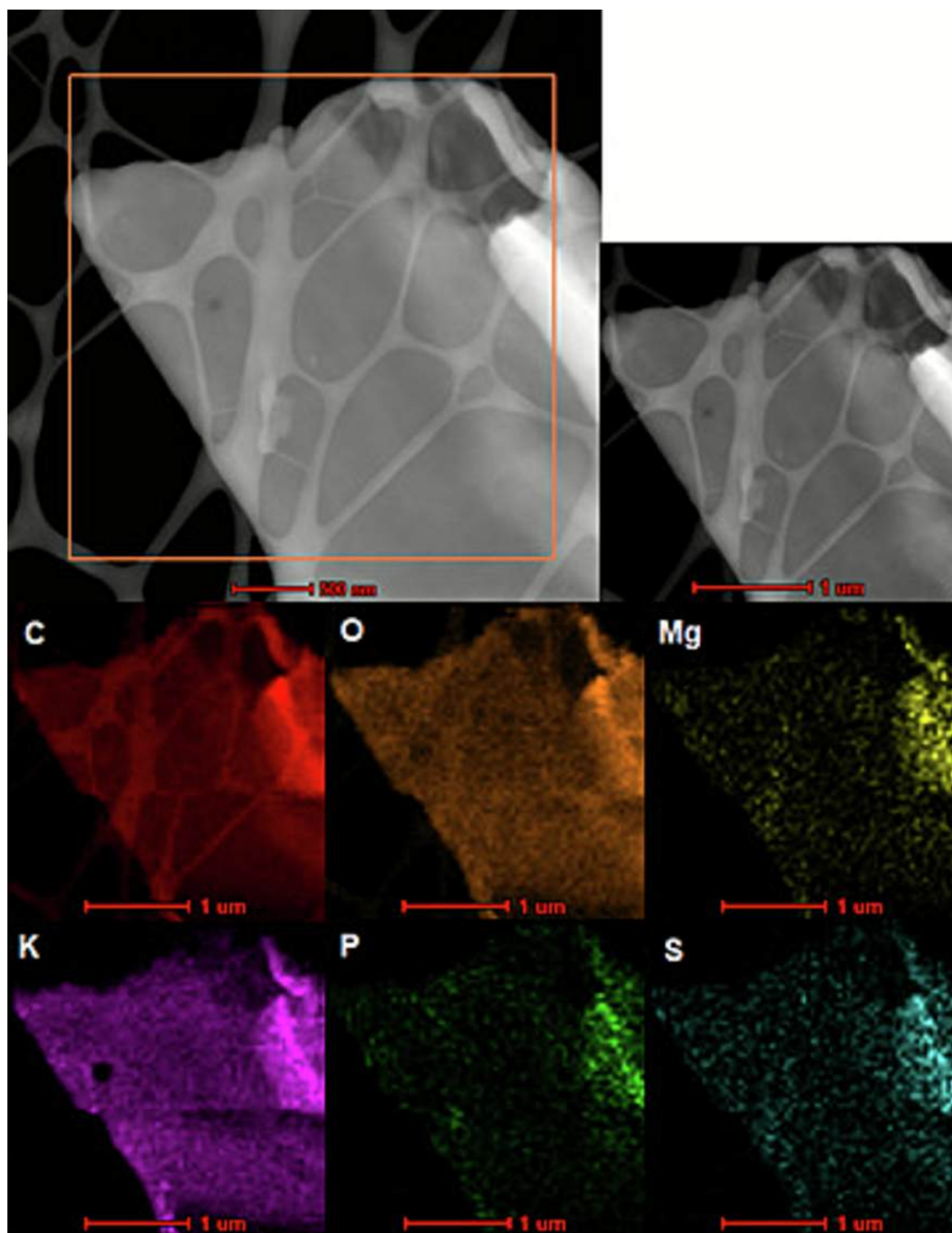


Fig. 7. Overall STEM-EDS analysis of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ STEM image and maps of individual elements C, O, Mg, K, P, and S in the scan area indicated by the box.

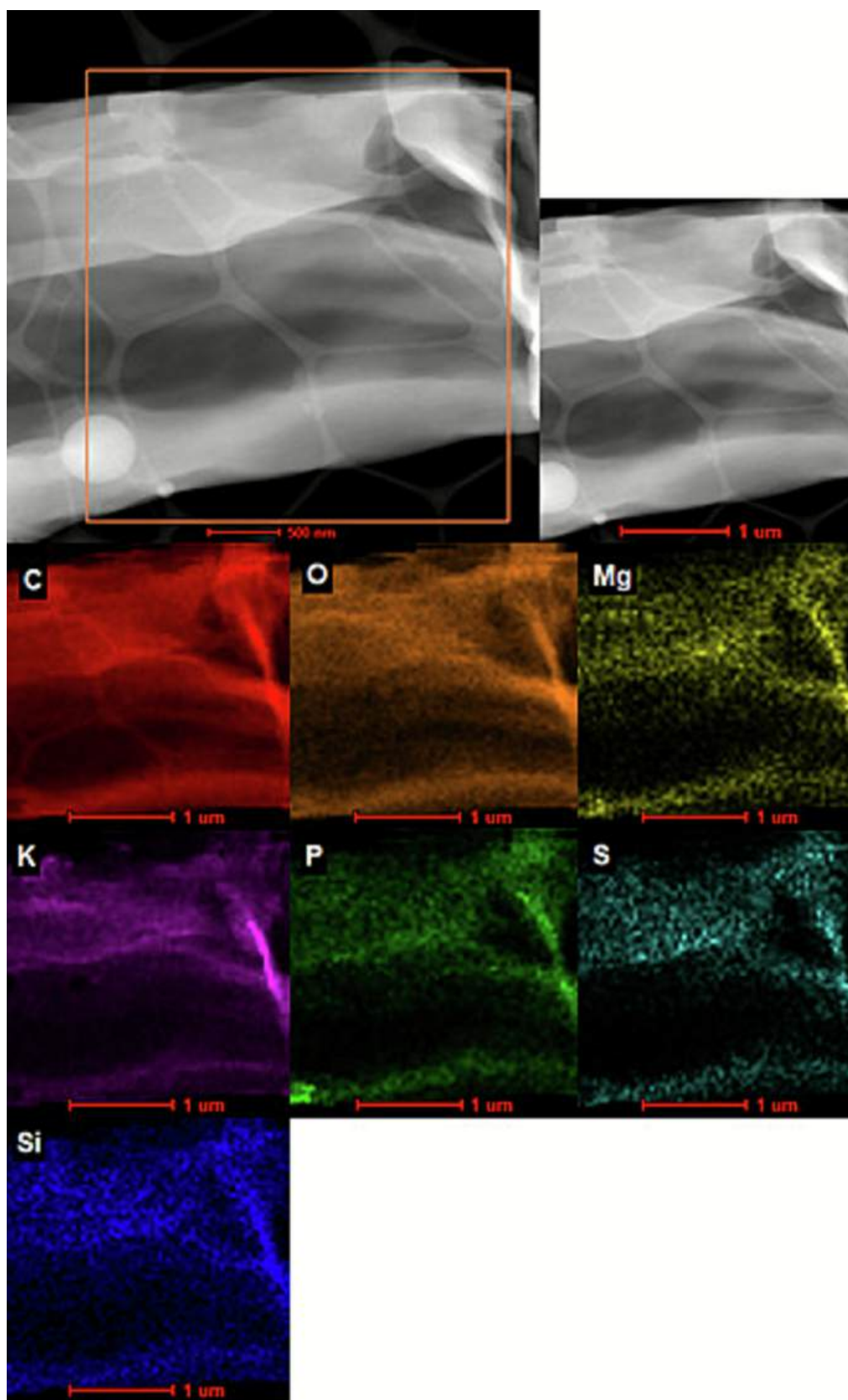


Fig. 8. Overall STEM-EDS analysis of FeHBED. STEM image maps of individual elements C, O, Mg, K, P, S, and Si in the scan area marked by the box.

distinct effects on mushroom growth, mineral composition, and metabolite levels, with $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ showing the highest iron accumulation, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ promoting biomass production, and FeHBED displaying unique effects on energy metabolism and antioxidant protection. Each iron form elicits a unique effect on biomass, iron accumulation, and the metabolic profile, highlighting the importance of considering these differences when developing strategies to enhance the nutritional quality of mushrooms and other biofortified organisms. These results suggest that iron biofortification can lead to the development of nutritionally enhanced *H. erinaceus* products, potentially addressing iron deficiency while maintaining the medicinal properties of mushrooms. Further research is warranted to optimise iron biofortification techniques and evaluate the bioavailability and health benefits of iron-enriched *H. erinaceus* in human diets.

CRediT authorship contribution statement

Klaudia Słyszcz: Writing – original draft, Visualization, Methodology, Investigation. **Marek Siwulski:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation, Conceptualization. **Barbara Frączczak:** Methodology, Investigation. **Adrian Wiater:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation. **Adam Waśko:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Methodology, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- Banerjee, S., Gupta, S., Raj, R., Gupta, M., Kumari, S., & Kaur, G. (2024). Unlocking the potential of lion's mane mushroom (*Herichium erinaceus*). *Journal of Applied and Natural Science*, 16(1), 39–50. <https://doi.org/10.31018/jans.v16i1.5224>
- Borodina, I., Kenny, L. C., McCarthy, C. M., Paramasivan, K., Pretorius, E., Roberts, T. J., S. A. Van Der Hoek, & Kell, D. B. (2020). The biology of ergothioneine, an antioxidant nutraceutical. *Nutrition Research Reviews*, 33(2), 190–217. Doi: <https://doi.org/10.1017/S0954422419000301>
- Budzyńska, S., Siwulski, M., Gasecka, M., Magdziak, Z., Kalač, P., Niedzielski, P., & Mleczek, M. (2022). Biofortification of three cultivated mushroom species with three Iron salts—Potential for a new Iron-rich superfood. *Molecules*, 27(7), 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules27072328>
- Buturi, C. V., Sabatino, L., Mauro, R. P., Navarro-le, E., Blasco, B., Leonardi, C., & Giuffrida, F. (2022). Iron biofortification of greenhouse soilless lettuce : An effective agronomic tool to improve the dietary mineral intake. *Agronomy*, 12(8), 1793. <https://doi.org/10.3390/agronomy12081793>
- Chen, Z., Wang, W., Abdul Razak, S. R., Han, T., Ahmad, N. H., & Li, X. (2023). Ferroptosis as a potential target for cancer therapy. *Cell Death and Disease*, 14(7). <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05930-w>
- Chong, P. S., Fung, M. L., Wong, K. H., & Lim, L. W. (2020). Therapeutic potential of *Herichium erinaceus* for depressive disorder. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010163>
- Deng, T., Yang, J., Sun, M., Zhang, Y., Pan, Y., & Huang, L. (2023). Distinct Roles of Ena ATP Family Proteins in Sodium Accumulation, Invasive Growth, and Full Virulence in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Fungi*, 9(5), 566. <https://doi.org/10.3390/jof9050566>
- Egressy-Molnár, O., Ouerdane, L., Györfi, J., & Dernovics, M. (2016). Analogy in selenium enrichment and selenium speciation between selenized yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Herichium erinaceus* (lion's mane mushroom). *Lwt*, 68, 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.028>
- Fu, T., & Shen, L. (2022). Ergothioneine as a natural antioxidant against oxidative stress-related diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.850813>
- Gasmi, A., Peana, M., Arshad, M., Butnariu, M., Menzel, A., & Björklund, G. (2021). Krebs cycle : activators, inhibitors and their roles in the modulation of carcinogenesis. *Archives of Toxicology*, 95(4), 1161–1178. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-02974-9>
- Gozzelino, R., & Arosio, P. (2016). Iron homeostasis in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1). <https://doi.org/10.3390/ijms17010130>
- Hanikenne, M., & Bouché, F. (2023). Iron and zinc homeostasis in plants : A matter of trade-offs. *Journal of Experimental Botany*, 74(18), 5426–5430. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad304>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., & Anee, T. I. (2017). Glutathione in plants : Biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(2), 249–268. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0422-2>
- Hu, T., Hui, G., Li, H., & Guo, Y. (2020). Selenium biofortification in *Herichium erinaceus* (lion's mane mushroom) and its in vitro bioaccessibility. *Food Chemistry*, 331(June), Article 127287. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127287>
- Jha, A. B., & Warkentin, T. D. (2020). Selenium biofortification of pulse crops: Status and future perspectives. *Plants*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/plants9010073>
- Jozífek, M., Praus, L., & Mař, J. (2025). Selenium uptake by *Herichium erinaceus* Basidiocarps on various substrates and their effect on growth and yield. *Agriculture*, 15(5), 1–21. <https://doi.org/10.3390/agriculture15050460>
- Kumari, A., & Chauhan, A. K. (2022). Iron nanoparticles as a promising compound for food fortification in iron deficiency anemia: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 59(9), 3319–3335. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05184-4>
- Latunde-Dada, G. O. (2024). Iron intake and human health. *Nutrients*, 16(6). <https://doi.org/10.3390/nu16060833>
- Marques, E., Darby, H. M., & Kraft, J. (2021). Benefits and limitations of non-transgenic micronutrient biofortification approaches. *Agronomy*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/agronomy11030464>
- Maryam, S., Ab, S., & Naher, L. (2022). Mushroom quality related with various substrates : bioaccumulation and translocation of heavy metals. *Journal of Fungi*, 8(42). <https://doi.org/10.3390/jof8010042>
- Niedzielski, P., Mleczek, M., Siwulski, M., Gasecka, M., Kozak, L., Rissmann, I., & Mikolajczak, P. (2014). Efficacy of supplementation of selected medicinal mushrooms with inorganic selenium salts. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 49(12), 929–937. <https://doi.org/10.1080/03601234.2014.951576>
- Philpott, C. C. (2006). Iron uptake in fungi : A system for every source. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763, 636–645. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.05.008>
- Qiu, Y., Lin, G., Liu, W., Zhang, F., Linhardt, R. J., Wang, X., & Zhang, A. (2024). Bioactive compounds in *Herichium erinaceus* and their biological properties: A review. *Food Science and Human Wellness*, 13(4), 1825–1844. <https://doi.org/10.26599/FSHW.2022.9250152>
- Rai, G. K., Kumar, P., Choudhary, S. M., Singh, H., Adab, K., Kosser, R., ... Roupheal, Y. (2023). Antioxidant Potential of Glutathione and Crosstalk with Phytohormones in Enhancing Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. <https://doi.org/10.3390/plants12051133>
- Rai, S., Kumar, P., Mankotia, S., Swain, J., & Satbhai, S. B. (2021). Plant Stress Iron homeostasis in plants and its crosstalk with copper, zinc, and manganese. *Plant Stress*, 1(March), Article 100008. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100008>
- Rzymiski, P., Niedzielski, P., Siwulski, M., Mleczek, M., Budzyńska, S., Gasecka, M., & Poniedziałek, B. (2017). Lithium biofortification of medicinal mushrooms *Agrocybe cylindracea* and *Herichium erinaceus*. *Journal of Food Science and Technology*, 54(8), 2387–2393. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2679-4>
- Sharma, P., Aggarwal, P., & Kaur, A. (2017). Biofortification: A new approach to eradicate hidden hunger. *Food Reviews International*, 33(1), 1–21. <https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1137309>
- Sheridan, K. J., Lechner, B. E., Keffe, G. O., Keller, M. A., Werner, E. R., Lindner, H., ... Doyle, S. (2016). Ergothioneine Biosynthesis and Functionality in the Opportunistic Fungal Pathogen, *Aspergillus fumigatus* (pp. 1–17). Nature Publishing Group, August. <https://doi.org/10.1038/srep35306>
- Singh, M., Kamal, S., & Sharma, V. P. (2022). Species and region-wise mushroom production in leading mushroom producing countries - China, Japan, USA, Canada and India. *Mushroom Research*, 30(2), 99. <https://doi.org/10.36036/mr.30.2.2021.119394>
- Słyszcz, K., Siwulski, M., Wiater, A., Tomczyk, M., & Waśko, A. (2024). Biofortification of mushrooms: A promising approach. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 29(19), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules29194740>
- Smith, A. D., Logeman, B. L., & Thiele, D. J. (2017). Copper acquisition and utilization in Fungi. *Annual Review of Microbiology*, 71, 597–623. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-030117-020444>
- Szućko-Kociuba, I., Trzeciak-Ryczek, A., Kupnicka, P., & Chlubek, D. (2023). Neurotrophic and neuroprotective effects of *Herichium erinaceus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21). <https://doi.org/10.3390/ijms242115960>
- Weger, H. G., Lam, J., Wirtz, N. L., Walker, C. N., & Treble, R. G. (2009). High stability ferric chelates result in decreased iron uptake by the green alga *Chlorella kessleri* owing to decreased ferric reductase activity and chelation of ferrous iron. *Botany*, 87, 922–931. <https://doi.org/10.1139/B09-063>
- Xiao, J., Park, Y. G., Guo, G., & Jeong, B. R. (2021). Effect of Iron source and medium pH on growth and development of *Sorbus commixta* in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 133. <https://doi.org/10.3390/ijms22010133>

- Xiong, R., He, R., Liu, B., Jiang, W., Wang, B., Li, N., & Geng, Q. (2021). Ferroptosis: A new promising target for lung Cancer therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8457521>
- Zhang, Y., & Fernie, A. R. (2023). *The Role of TCA Cycle Enzymes in Plants*. 2200238 pp. 1–12). <https://doi.org/10.1002/adbi.202200238>
- Zulfiqar, U., Ayub, A., Hussain, S., Ahmad, M., Rehman, A., Ishfaq, M., ... Yong, J. W. H. (2024). Iron biofortification in cereal crops: Recent progress and prospects. *Food and Energy Security*, 13(4), 1–28. <https://doi.org/10.1002/fes3.547>

Article

Impact of Iron Speciation on the Cytotoxicity and Gene Expression Profile of Biofortified *Hericium erinaceus* in Human Colorectal Adenocarcinoma

Klaudia Słyszcz, Kamila Rachwał , Ewa Baranowska-Wójcik , Dominik Sz wajgier , Jan Sadurski and Adam Waśko *

Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland; klaudia.kowalik@up.edu.pl (K.S.); kamila.rachwal@up.edu.pl (K.R.); ewa.baranowska@up.edu.pl (E.B.-W.); dominik.sz wajgier@up.edu.pl (D.S.); jan.sadurski@up.edu.pl (J.S.)

* Correspondence: adam.wasko@up.edu.pl; Tel.: +48-81-462-33-53

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is a major global health threat, necessitating the development of functional foods with chemopreventive potential. This study aimed to evaluate the modulation of the anticancer activity of *Hericium erinaceus* with different iron forms (FeCl_3 , FeSO_4 , and FeHBED) as it modulates its anticancer activity against HT-29 cells. The extracts were subjected to simulated in vitro digestion and analyzed for cytotoxicity (MTT), antioxidant capacity (DPPH), and morphological changes, alongside high-throughput RT-qPCR profiling of 92 cancer-related genes. The results demonstrated that iron speciation is critical, with FeHBED -biofortified extracts exhibiting the most potent concentration-dependent cytotoxic and antiproliferative effects. Treated cells displayed apoptotic morphology, including chromatin condensation and cell shrinkage. Molecular analysis revealed significant down-regulation of key oncogenes (HRAS, MYC), cell cycle regulators (CDK4), and migration markers (RHOA, ITGB1), whereas VEGFA was upregulated as a stress-induced response. In conclusion, biofortification with FeHBED significantly enhanced the anticancer potential of *H. erinaceus* by targeting specific proliferative and survival pathways. These findings highlight the potential of iron-biofortified mushrooms as a functional dietary component for colorectal cancer prevention.

Keywords: *Hericium erinaceus*; iron biofortification; colorectal cancer; HT-29 cells; iron speciation; FeHBED ; gene expression; molecular mechanisms; functional food



Academic Editors: David Barker and Francesco Cacciola

Received: 14 May 2026

Revised: 16 June 2026

Accepted: 24 June 2026

Published: 1 July 2026

Copyright: © 2026 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the [Creative Commons Attribution \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

1. Introduction

According to the latest data from the World Health Organization (WHO), there has been a significant increase in the number of malignant tumors. They are currently the second leading cause of death worldwide and represent one of the greatest health challenges of the 21st century. Colorectal cancer is one of the most commonly diagnosed malignant tumors and poses a serious threat to public health on a global scale. In 2020, nearly 1.9 million new cases were reported and almost 935,000 deaths were attributed to this disease [1]. Despite significant advances in the treatment of colorectal cancer in recent years, patient survival rates remain insufficient. This is associated with the presence of unfavorable prognostic factors, such as vascular invasion, a low lymphocyte-to-monocyte ratio, and late detection of the disease. In response to these limitations, personalized medicine, which takes into account the individual characteristics of the patient, genomic

profile, and biomarkers, is becoming increasingly important, allowing for more accurate selection of therapy and earlier intervention in people at risk [2].

For this reason, preventive healthcare and a diet based on a variety of products with proven health benefits play an important role. Particular attention should be paid *Hericium erinaceus* (Bull.) Persian, which shows promising biological potential. *H. erinaceus*, commonly known as Lion's Mane, is valued for its medicinal properties, which result from the presence of numerous bioactive compounds. These substances are being intensively studied for their potential health benefits, in particular their neuroprotective, antioxidant, and immunomodulatory effects. The most important compounds responsible for these effects include erinacines, hericenones, polysaccharides, and other secondary metabolites [3]. Erinacins and hericenones affect neurotrophic pathways by stimulating the expression of nerve growth factor (NGF) while also exhibiting strong anti-inflammatory and antioxidant effects. As a result, they contribute to increased protection of nerve cells against oxidative stress and damage [4]. Studies indicate that the neuroprotective effect of erinacines is associated with the activation of the Nrf2 pathway and the regulation of genes responsible for the protection and regeneration of neurons, which has been confirmed in vitro and in vivo [5]. These effects may be further supported by the modulation of the gut–brain axis, as *H. erinaceus*. s Supplementation has been shown to increase the diversity of the gut microbiota and the abundance of bacteria that produce short-chain fatty acids, which promotes gut protection and reduces inflammation [6]. Research indicates that bioactive compounds in *H. erinaceus* may influence key mechanisms regulating the growth and survival of cancer cells, showing potential in the context of colorectal cancer. This effect is associated, among other things, with the inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway and the reduction in epithelial–mesenchymal transition (EMT) [7]. Polysaccharides, including β -glucans present in Lion's Mane, exhibit antioxidant, immunomodulatory, and anticancer properties [8]. The strong antioxidant and anti-inflammatory properties of *H. erinaceus* result from the presence of numerous phenolic and flavonoid compounds, and their activity depends on the growth stage of the mushroom. These compounds contribute to the reduction in oxidative stress and inflammatory processes, which play an important role in the development of chronic diseases [9].

In light of these beneficial properties, there is growing interest in strategies aimed at enhancing the content and bioavailability of health-promoting compounds, particularly through the development of functional foods, which can be further improved using approaches such as biofortification. Biofortification involves deliberately increasing the nutrient content of food and is closely related to their bioavailability. Unlike conventional fortification, it can lead to better absorption of minerals by increasing their concentration, modifying their chemical forms to make them more absorbable, and adding compounds that promote absorption, such as polyphenols. The promotion of biofortification is an important strategy for combating hidden hunger and improving nutrition, especially in regions with limited access to a varied diet. In this context, the biofortification of mushrooms is a particularly promising and innovative direction due to their ability to accumulate macro- and micronutrients [10]. For example, selenium plays an important role in protecting against disease owing to its antioxidant properties, while zinc is essential for the proper functioning of the immune and nervous systems. In turn, iron-biofortified mushrooms can be an effective aid in preventing iron deficiency, which is one of the most common nutritional problems worldwide [11].

Among edible mushrooms, Lion's Mane has been identified as a promising candidate for biofortification due to its capacity to accumulate selected elements such as selenium, lithium, and iron. Studies have shown that *H. erinaceus* effectively accumulates selenium from the substrate and converts it into bioavailable organic forms. Among the selenium compounds studied, selenomethionine showed the strongest stimulating effect on fungal growth [12]. The results of this study indicate that biofortification of mushrooms with lithium, especially in the form of chloride, enables effective accumulation of this element without negatively affecting the growth or morphological characteristics of the fruiting bodies. Among the analyzed species, *H. erinaceus* showed the greatest bioaccumulation potential, and the lithium concentrations obtained suggest the possibility of covering a significant part of the recommended daily intake. These results justify further research on the bioavailability, safety, and potential use of biofortified Lion's Mane as a functional source of lithium in the diet [13]. Studies have shown that the ability of *H. erinaceus* to accumulate selenium is strongly dependent on the strain, type of substrate, and cultivation conditions. Moderate levels of Se supplementation promoted both effective bioaccumulation and improved yields, with selenomethionine being the dominant form of selenium in most strains. The results confirm the possibility of using biofortified lion's mane mushroom as a functional source of selenium and emphasize the importance of substrate selection and cultivation parameters in optimizing the content of this element [14]. Biofortification with various forms of iron increases its accumulation and affects the metabolism of the mushroom, with different sources of Fe producing different biological effects. These results confirm the possibility of enriching *H. erinaceus* with iron while maintaining its health-promoting properties [15].

Iron is a key element in the human body, playing an important role in various biological processes. Iron plays a fundamental role in the body, participating in the transport and storage of oxygen and in the energy processes occurring in the mitochondria. It is also essential for the proper functioning of enzymes involved in cellular metabolism, DNA synthesis, and the maintenance of genetic stability [16]. In addition, this element significantly influences the immune response by modulating the activity of cells in the innate and acquired immune systems [17].

Alterations in iron homeostasis may result in ferroptosis, a regulated form of cell death dependent on iron and lipid peroxidation, which plays an important role in the elimination of cancer cells. This process results from iron homeostasis disorders, increased oxidative stress, and antioxidant mechanism failure, and is a promising target in modern anticancer strategies. It manifests itself in the form of redox imbalance, increased concentrations of reactive oxygen species, and characteristic mitochondrial changes, such as damage to the outer membrane, matrix thickening, and reduction or loss of mitochondrial cristae [18]. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in cell membranes are particularly susceptible to peroxidation, which is facilitated by enzymes such as long-chain acyl-CoA synthetase family 4 (ACSL4) and arachidonic acid lipoxygenases [19]. Glutathione peroxidase 4 (GPX4) plays a key role in protecting cells from ferroptosis by neutralizing lipid peroxides, while its inhibition results in their accumulation and induction of ferroptosis [20]. Non-coding RNAs (ncRNAs) regulate ferroptosis by controlling the expression of genes related to iron metabolism and antioxidant mechanisms, thereby influencing the susceptibility of cancer cells to this type of cell death [21]. Despite the promising therapeutic potential of ferroptosis, this process plays a dual role in cancer. On the one hand, it can limit tumor growth, while on the other hand, it can promote progression and weaken the immune response. For this reason, a full understanding of the mechanisms of ferroptosis and its links to other cell death pathways is essential for the development of effective and safe anticancer strategies, which requires further research before clinical application [22].

The aim of this study was to investigate the effect of Lion's Mane extracts biofortified with iron in three different forms on the viability and morphology of colorectal cancer cells and on selected molecular mechanisms of cancer. This study is a continuation of the authors' previous work on the biofortification of *H. erinaceus*.

The innovative nature of this research deserves special attention, as no studies analyzing the biological properties of iron-biofortified Lion's Mane or the effect of different forms of this element on anticancer activity have been published to date.

The extracts were subjected to in vitro digestion, which allowed for the assessment of their potential bioavailability and biological activity after digestive processes. It was assumed that biofortification with iron in various forms could modulate the biological properties of *H. erinaceus*, leading to a reduction in cancer cell viability, morphological changes, and the regulation of molecular pathways, oxidative stress, and cell death.

The results obtained provide new data on the effect of biofortified natural products on colon cancer cells and indicate the potential preventive use of *H. erinaceus* while emphasizing the need for further in vivo studies, including clinical trials in humans.

2. Results

2.1. Cytotoxicity

In the conducted experiment, the in vitro digested extract was evaluated on HT-29 cells at concentrations of 50, 100, 200, 400, and 600 µg/mL. The cytotoxicity analysis performed using the MTT assay demonstrated that all tested extracts affected cell viability in a concentration-dependent manner; however, both the nature and magnitude of the effect varied depending on the applied biofortification method. The extract of *H. erinaceus* without biofortification exhibited moderate cytotoxicity, with a pronounced decrease in cell viability observed mainly at higher concentrations (400–600 µg/mL). In contrast, the extract biofortified with $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ showed comparable or even higher cell viability than the non-biofortified sample, indicating no cytotoxic effect on the tested cells. Biofortification with $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ resulted in a more pronounced cytotoxic effect, characterized by a gradual, dose-dependent decrease in cell viability, which was more evident than in the case of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and the non-biofortified extract. The most significant changes were observed for the extract biofortified with FeHBED, which exhibited the strongest cytotoxic activity among all tested variants. A substantial reduction in cell viability was already evident at the lowest tested concentration, and this effect intensified with increasing concentration, reaching the lowest values at the highest doses. Figure 1 shows the results of the experiment.

These findings indicate that FeHBED significantly enhances the biological activity of the extract, leading to an early and pronounced cytotoxic response. In summary, the applied biofortification strategy differentiates the cytotoxic properties of the extracts. FeHBED demonstrated the highest efficacy even at low concentrations, whereas FeCl_3 did not enhance cytotoxicity compared to the non-biofortified extract.

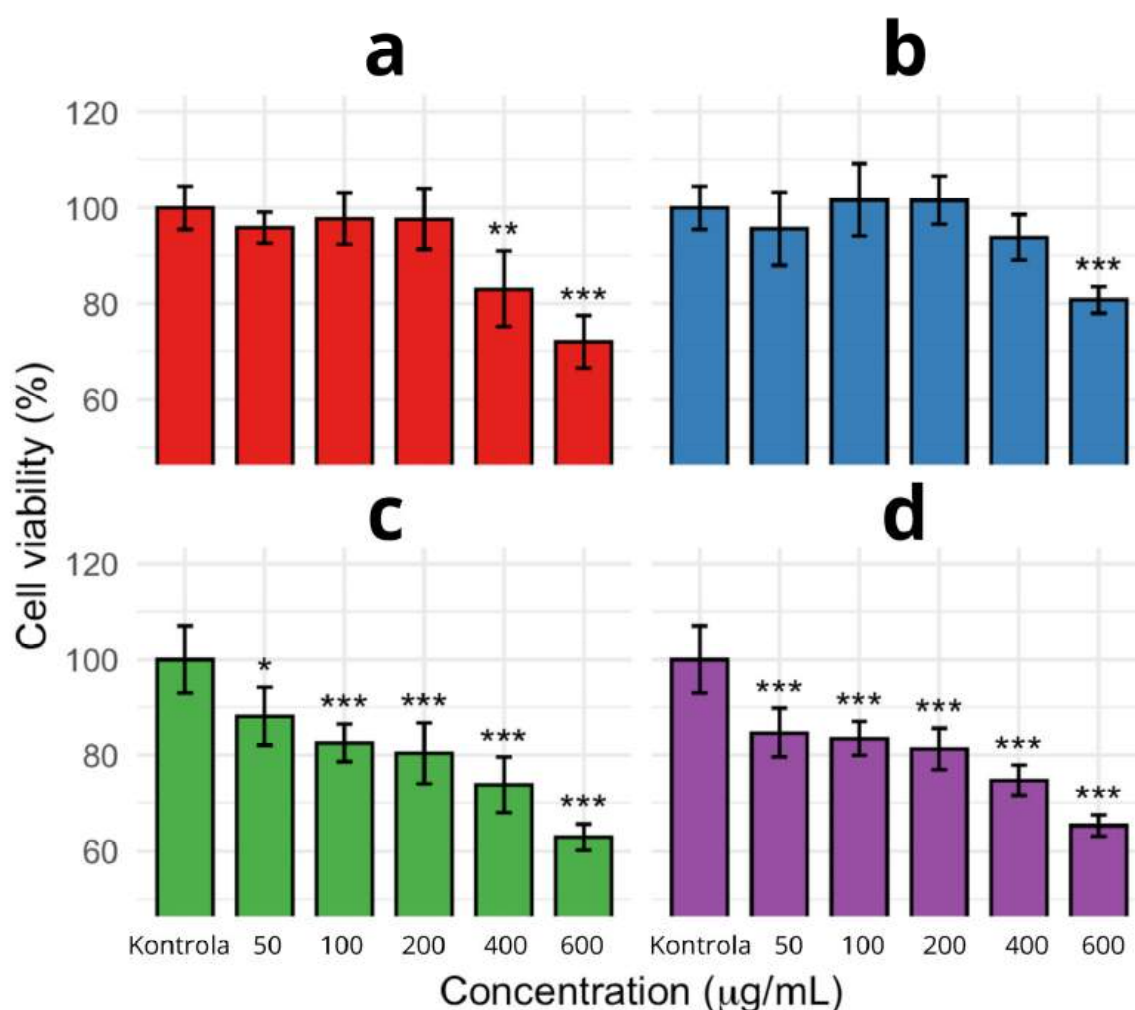


Figure 1. Effect of *Hericium erinaceus* extracts on the viability of HT-29 cells after 24 h, assessed by the MTT assay. The extract obtained from fruiting bodies biofortified with iron in the three forms of: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (b); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (c) and FeHBED (d) was compared with the extract from non-biofortified (untreated with any form of iron) fruiting bodies (a). Results are expressed as percentage of control (100% viability). Statistical significance: * $p < 0.01$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$; one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test ($n = 3$ independent experiments).

2.2. Antioxidant Properties

The antioxidant properties of *H. erinaceus* extracts were evaluated using the DPPH radical scavenging assay, and the results were expressed as Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC). Both the non-biofortified (raw) extract and the biofortified variants exhibited concentration-dependent antioxidant activity within the range of 50–600 µg/mL, as evidenced by the increase in TEAC values with increasing extract concentration. The non-biofortified extract demonstrated the highest antioxidant activity among the analyzed samples, reaching 28.29 µg/mL Trolox equivalents at a concentration of 600 µg/mL extract (Figure 2).

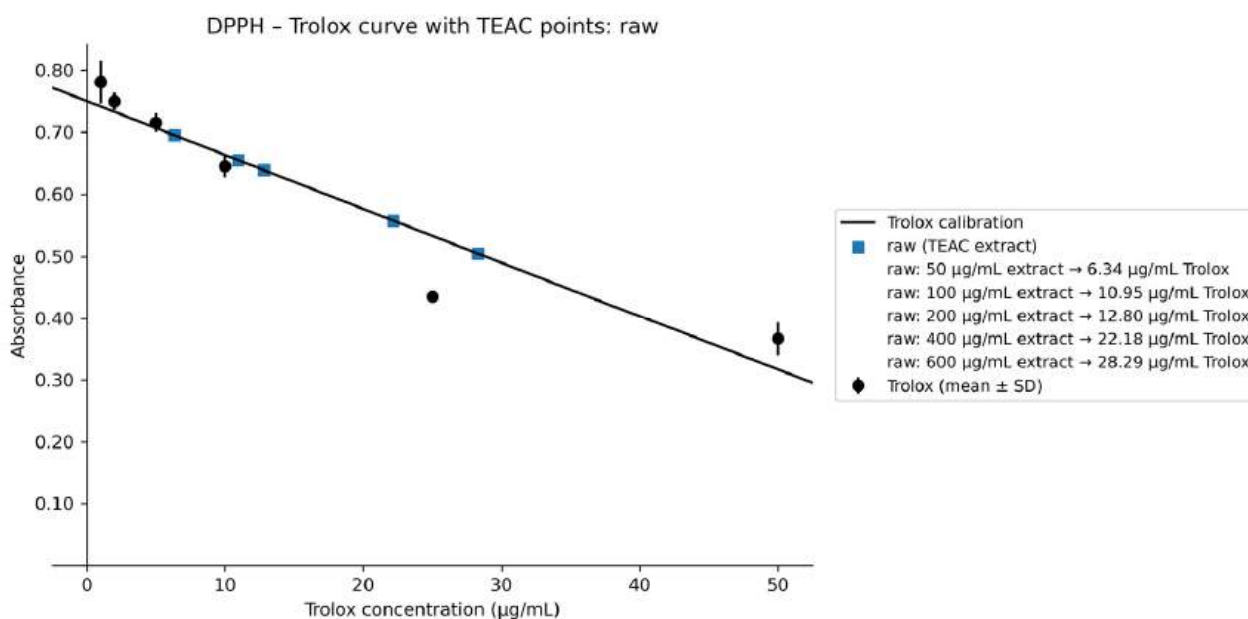


Figure 2. Antioxidant activity of the extract from *Hericium erinaceus* not treated with any form of iron, determined by the DPPH radical scavenging assay and expressed as Trolox equivalents ($\mu\text{g/mL}$).

Biofortification with $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ resulted in slightly lower TEAC values compared to the non-biofortified extract. Antioxidant activity increased from $4.30 \mu\text{g/mL}$ Trolox (at $50 \mu\text{g/mL}$ extract) to $26.75 \mu\text{g/mL}$ Trolox (at $600 \mu\text{g/mL}$ extract). Figure 3 shows the results of the experiment.

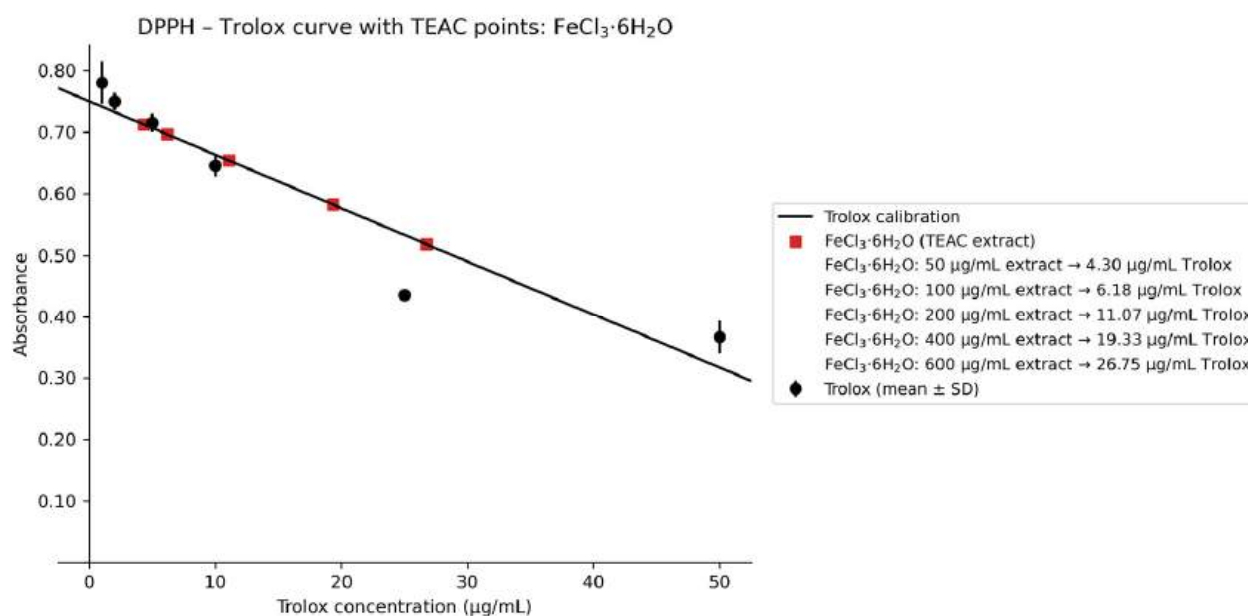


Figure 3. Antioxidant activity of the extract from *Hericium erinaceus* biofortified with $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, determined by the DPPH radical scavenging assay and expressed as Trolox equivalents ($\mu\text{g/mL}$).

In contrast, the $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -biofortified extract exhibited the lowest radical scavenging capacity among the tested variants, reaching a maximum value of $20.72 \mu\text{g/mL}$ Trolox at $600 \mu\text{g/mL}$ extract (Figure 4).

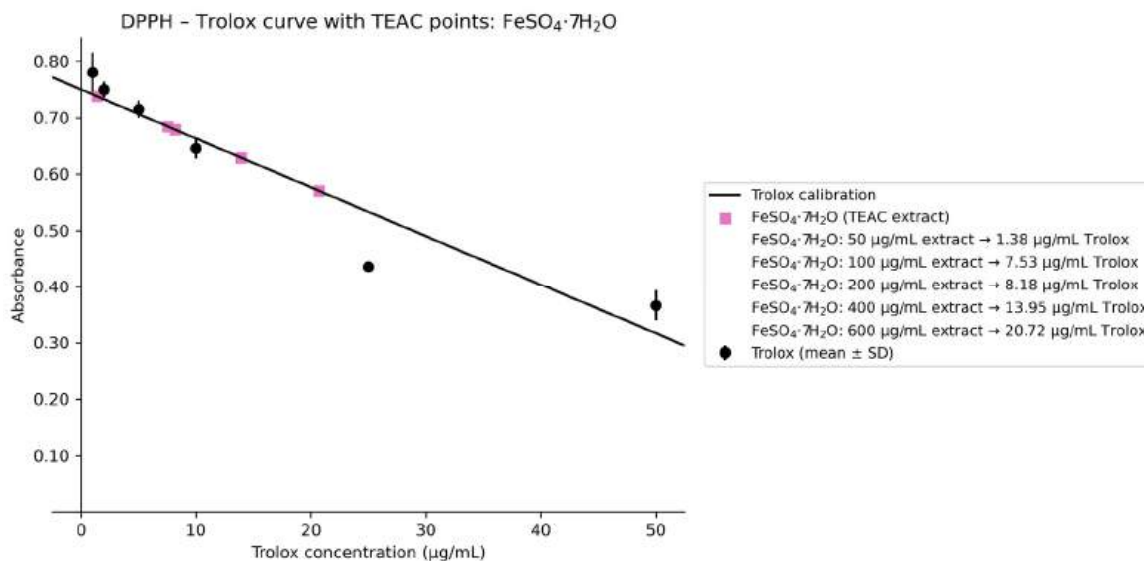


Figure 4. Antioxidant activity of the extract from *Hericium erinaceus* biofortified with $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, determined by the DPPH radical scavenging assay and expressed as Trolox equivalents ($\mu\text{g/mL}$).

A comparable level of activity to that of the non-biofortified extract was observed for the FeHBED-biofortified extract, which achieved 27.94 $\mu\text{g/mL}$ Trolox equivalents at the highest tested concentration, performing nearly identically to the raw extract (Figure 5).

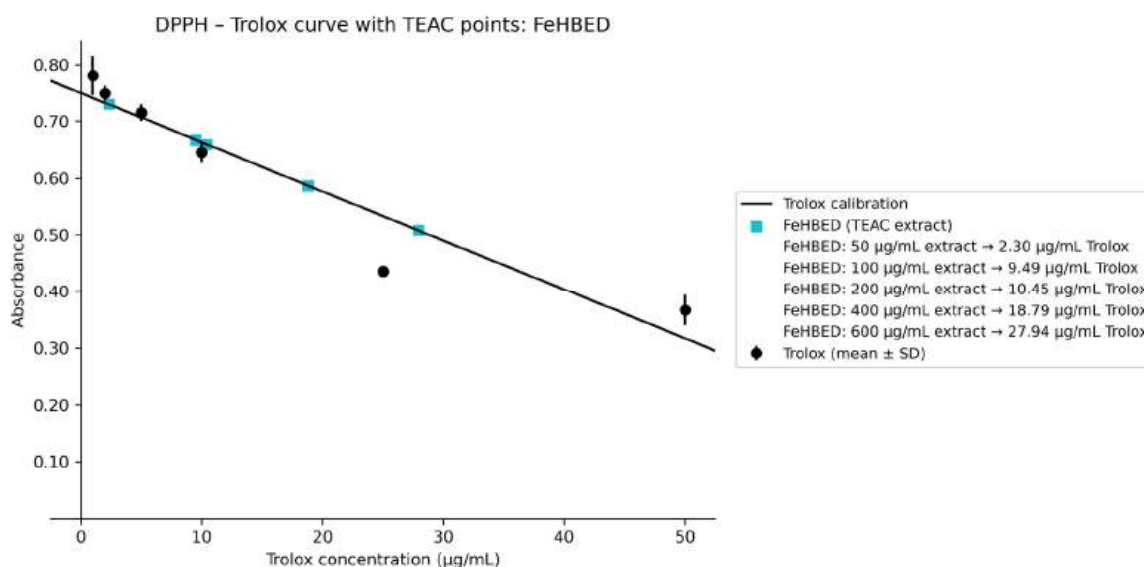


Figure 5. Antioxidant activity of the extract from *Hericium erinaceus* biofortified with FeHBED, determined by the DPPH radical scavenging assay and expressed as Trolox equivalents ($\mu\text{g/mL}$).

Overall, all extracts demonstrated clear dose-dependent antioxidant activity and a similar response pattern across the tested concentration range. The highest activity was observed for the non-biofortified and FeHBED-biofortified extracts, whereas biofortification with $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ was associated with relatively lower DPPH radical scavenging efficiency.

2.3. Cellular Morphology Analysis

Microscopic evaluation of HT-29 cells stained with May–Grünwald–Giemsa revealed pronounced, concentration-dependent morphological alterations following treatment with *H. erinaceus* extracts. Control cells (K) displayed typical epithelial morphology characterized by polygonal shape, intact monolayer organization, high confluency, and strong

cell–cell adhesion. Treatment with the non-biofortified extract at 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induced moderate morphological changes, including slight reduction in cell density and early signs of cytoplasmic shrinkage. At 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, more evident alterations were observed, such as decreased confluency, partial loss of adherence, and the presence of cells with condensed cytoplasm. Cells treated with extracts from fruiting bodies biofortified with $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ exhibited moderate cytotoxic features, particularly at 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, including reduced cell number, increased intercellular spaces, and morphological changes suggestive of early apoptotic-like alterations (Figure 6).

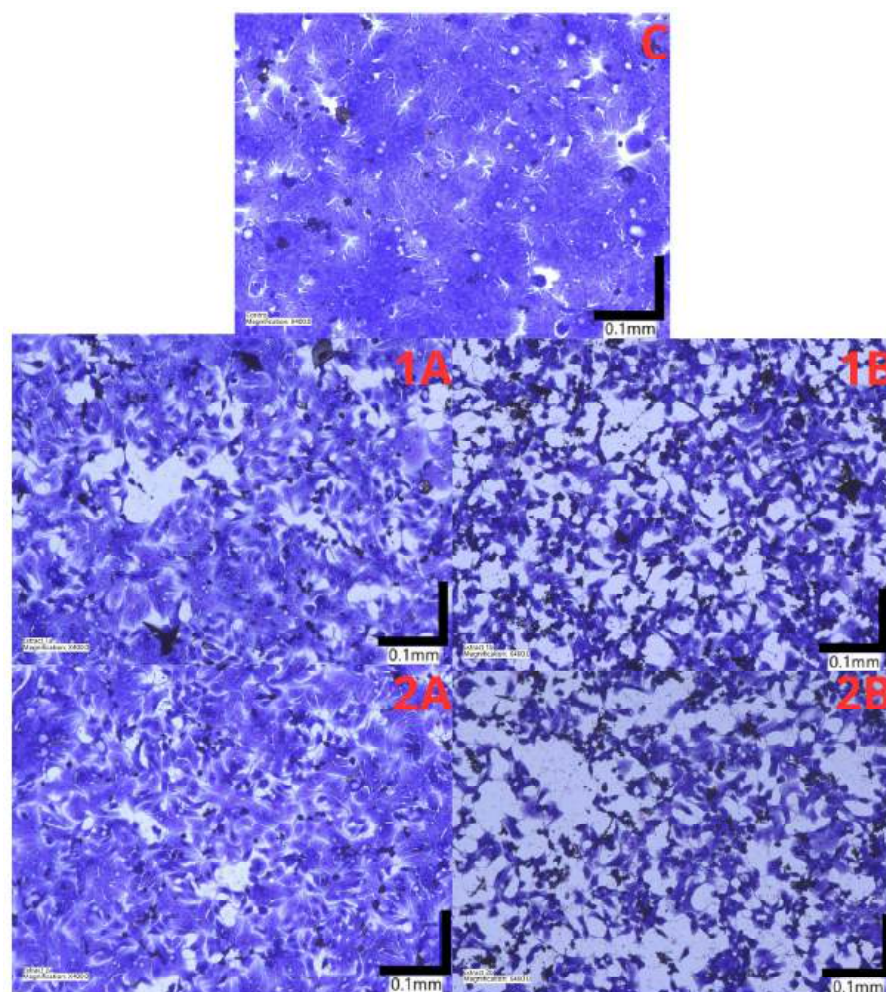


Figure 6. Changes in the morphology and number of HT-29 cells after treatment with *Hericium erinaceus* extracts. Images were acquired using a KEYENCE VHX-X1 microscope at 400 $\times$ magnification. (C) control; (1A) non-biofortified extract, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (1B) non-biofortified extract, 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (2A) *H. erinaceus* biofortified with $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (2B) *H. erinaceus* biofortified with $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

More pronounced cytotoxic effects were observed after treatment with extracts biofortified with $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and FeHBED. At 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a marked reduction in cell density and disruption of the monolayer structure were evident. At 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, cells displayed characteristic apoptotic-like morphology, including cell shrinkage, chromatin condensation, loss of adhesion, and fragmentation of the cell monolayer, indicating enhanced antiproliferative and pro-apoptotic activity (Figure 7).

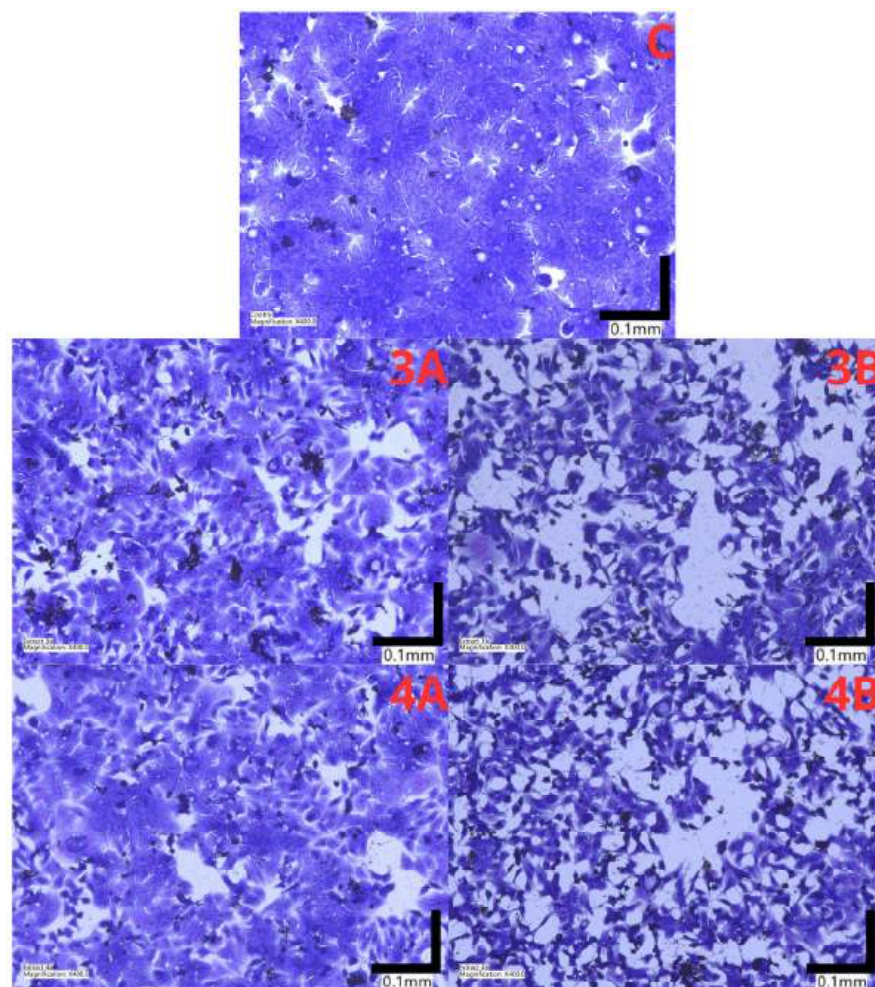


Figure 7. Changes in the morphology and number of HT-29 cells after treatment with *Hericium erinaceus* extracts. Images were acquired using a KEYENCE VHX-X1 microscope at 400× magnification. (C) control; (3A) *H. erinaceus* biofortified with $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 400 $\mu\text{g/mL}$; (3B) *H. erinaceus* biofortified with $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 600 $\mu\text{g/mL}$; (4A) *H. erinaceus* biofortified with FeHBED, 400 $\mu\text{g/mL}$; (4B) *H. erinaceus* biofortified with FeHBED, 600 $\mu\text{g/mL}$.

Overall, May–Grünwald–Giemsa staining confirmed that iron biofortification—particularly with $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and FeHBED—intensified the cytotoxic and morphological effects of *H. erinaceus* extracts on HT-29 cells compared to the non-biofortified and FeCl_3 -treated variants. In addition to qualitative observations, quantitative image analysis revealed a significant, concentration-dependent reduction in cell density. For the FeHBED-biofortified extract at 600 $\mu\text{g/mL}$, the number of adherent cells decreased by 71% compared to the control, while the percentage of cells displaying clear apoptotic-like features reached 46%. These quantitative data provide statistical support for the superior antiproliferative effect of the chelated iron variant observed in the morphological and cytotoxicity assays.

2.4. Expression of Genes Associated with Cancer of the Large Intestine

The FeHBED-biofortified extract at a concentration of 600 $\mu\text{g/mL}$ was selected for high-throughput molecular profiling because it elicited the maximum biological response in both cytotoxicity and morphological assays. As the highest tested dose, it provided the most robust experimental model to identify the specific signaling pathways and gene regulatory networks responsible for the potent anticancer effects observed in HT-29 cell. Based on the analyses of cytotoxicity, cell viability, morphology, and antioxidant capacity, the extract of *H. erinaceus* biofortified with chelated iron (FeHBED) at a concentration of

600 µg/mL was selected for further investigation of molecular mechanisms in human cancer cells. This variant exhibited the highest anticancer potential among all tested samples. The FeHBED-biofortified extract demonstrated the strongest cytotoxic effect compared to the non-fortified extract and samples treated with other iron forms. At the same time, its antioxidant capacity remained comparable to that of the crude extract. Morphological analysis revealed that, at a concentration of 600 µg/mL, treated HT-29 cells displayed characteristic features including cell shrinkage, chromatin condensation, loss of adhesion, and fragmentation of the cellular monolayer. These observations indicate pronounced antiproliferative activity. Staining with the May–Grünwald–Giemsa method confirmed that biofortification with FeHBED enhanced both cytotoxic and morphological effects of *H. erinaceus* extracts on HT-29 cells compared to non-biofortified variants and those treated with inorganic iron. Gene expression analysis performed using RT-qPCR demonstrated that treatment with the FeHBED-biofortified *H. erinaceus* extract (600 µg/mL) resulted in significant alterations in the expression levels of selected regulatory genes (Figure 8).

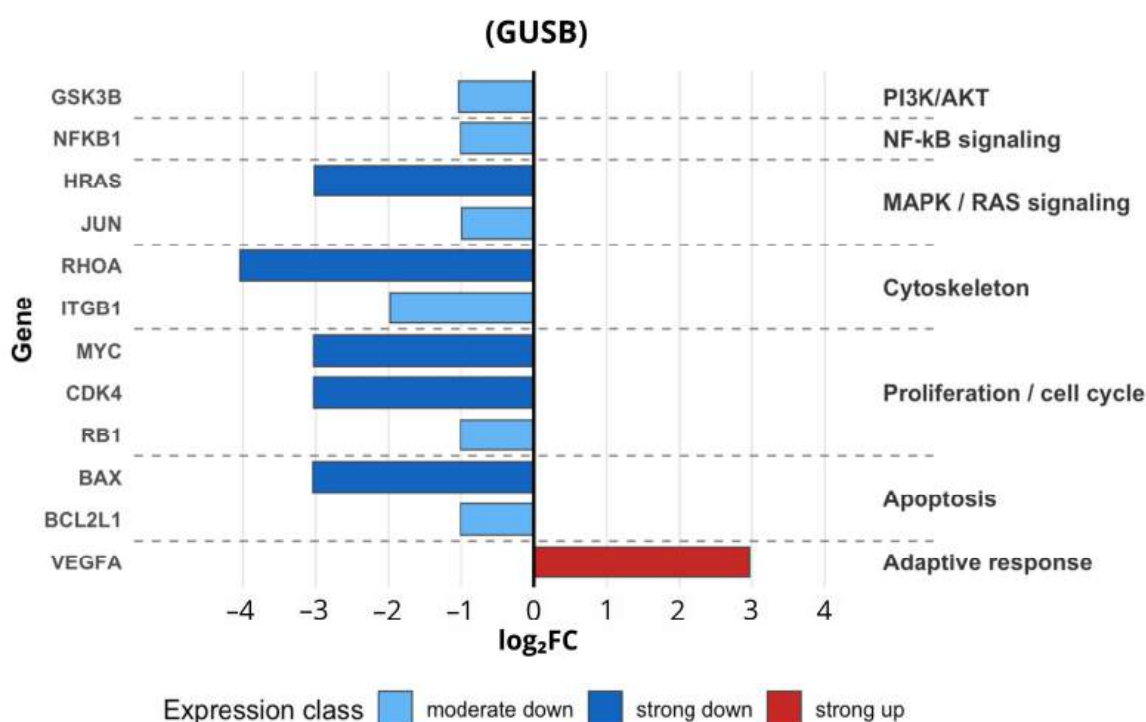


Figure 8. Relative gene expression ($\log_2FC$) in cells treated with *Hericium erinaceus* extract biofortified with FeHBED (600 µg/mL), determined by RT-qPCR and normalized to the reference gene GUSB. Color coding reflects the magnitude of regulation according to predefined $\log_2FC$ thresholds. From the original panel of 92 genes, 12 were selected for further analysis based on predefined quality and biological relevance criteria. Genes that did not show detectable expression, as well as those with cycle threshold (Ct) values above 37 at any stage of the experiment, were excluded to ensure data reliability. Among the remaining candidates, genes exhibiting the most significant changes in expression relative to the control group were prioritized. As a result, the final set of 12 genes represents those with the most robust and biologically meaningful differences in expression.

Expression levels were presented as $\log_2$ fold change ($\log_2FC$) relative to control cells after normalization to the reference gene GUSB. A total of 92 mRNAs associated with human cancer-related molecular pathways were analyzed in both control and treated samples. The selection of specific genes for detailed discussion was based on a combination of statistical magnitude—prioritizing those with a $\log_2FC \geq 0.5$ —and their established functional roles in the biological processes observed in this study, such as proliferation,

programmed cell death, and cellular motility. Among three candidate endogenous control genes (GAPDH, HPRT1, and GUSB), GUSB was selected as the most suitable reference gene due to its lowest variability across experimental conditions, as indicated by minimal standard deviations of Ct values. The strongest upregulation was observed for VEGFA ($\log_2\text{FC} = 2.97$), indicating a substantial increase in its transcription following treatment. Moderate downregulation ($\log_2\text{FC}$ between -0.5 and -1.5) was observed for JUN, RB1, NFKB1, BCL2L1, and GSK3B. A stronger decrease in mRNA levels ($\log_2\text{FC}$ between -1.5 and -2.99) was noted for ITGB1 ($\log_2\text{FC} = -1.98$). The most pronounced downregulation ($\log_2\text{FC} < -3$) was identified for HRAS, MYC, CDK4, BAX, and RHOA, indicating strong inhibition of their expression.

Overall, the obtained results suggest that the FeHBED-biofortified *H. erinaceus* extract induces a coordinated cellular response involving inhibition of proliferation and cell cycle progression, suppression of pro-survival and inflammatory signaling pathways, and reduction in cellular migratory potential. Simultaneously, activation of stress-related signaling pathways was observed. This integrated molecular response highlights the potential anti-cancer properties of the tested extract and supports its relevance as a promising candidate for further functional studies.

3. Discussion

The above study provides evidence that iron biofortification significantly affects the anticancer activity of *H. erinaceus* extracts against colorectal cancer cells. This was demonstrated by studies of cytotoxicity, antioxidant capacity, morphology, and expression of genes associated with cancer of the large intestine. The results showed clear differences depending on the chemical form of iron. The FeHBED-biofortified extract exhibited the strongest cytotoxic activity. This is the first study comparing different forms of iron used for the biofortification of *H. erinaceus* in the context of colorectal cancer research, highlighting the key role of iron speciation in modulating biological activity. It should be noted that these extracts were additionally subjected to in vitro digestion to better reflect their action in the human body. These results are consistent with previous reports indicating that *H. erinaceus* exhibits anticancer properties, primarily through mechanisms related to oxidative stress and apoptosis [23].

The cytotoxicity of the tested extracts was concentration-dependent, which is consistent with the literature describing the dose-dependent antiproliferative effects of bioactive compounds of fungal origin [24]. A significant observation, however, is the increased cytotoxicity of the FeHBED-biofortified extract, which caused a significant reduction in cell viability even at low concentrations. This effect can be attributed to the increased bioavailability of iron and its more efficient delivery into the cell, characteristic of chelated forms. Iron chelates maintain iron in a soluble and bioavailable form, facilitating its cellular uptake and increasing the pool of intracellular labile iron, which plays a key role in the generation of oxidative stress [25].

Elevated intracellular iron levels promote the formation of highly reactive hydroxyl radicals, leading to damage to proteins, lipids, and DNA. This mechanism is widely recognized as a key factor in the death of cancer cells induced by extracts enriched with metals and natural compounds [26]. The higher cytotoxicity of FeHBED compared to FeSO_4 and FeCl_3 can be explained by its greater stability and ability to effectively deliver active iron, thereby inducing oxidative stress.

While the DPPH results demonstrate a high chemical radical-scavenging potential for the FeHBED-biofortified extract in a cell-free system, these findings should not be directly equated with intracellular antioxidant protection. In the complex environment of a tumor cell, the presence of highly bioavailable iron (particularly in the FeHBED form) can shift the

role of these bioactive compounds from antioxidants to pro-oxidants, potentially fueling the Fenton reaction and generating reactive oxygen species. Consequently, the observed antioxidant capacity likely represents the chemical reactivity of the extract rather than a definitive intracellular redox mechanism, and the link between DPPH activity and the observed cytotoxic effect remains suggestive rather than causative [27].

The phenolic compounds present in *H. erinaceus* extracts can reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} , leading to increased production of reactive oxygen species. The FeHBED-biofortified extract may act as a pro-oxidant system within cells, even though it exhibits high antioxidant activity in vitro [25].

Morphological analysis confirms the involvement of oxidative stress-dependent mechanisms of cell death. Cell shrinkage, chromatin condensation, and loss of adhesion are characteristic of apoptosis. Studies show that *H. erinaceus* induces apoptosis via ROS-dependent mitochondrial pathways [24].

The dependence of cytotoxicity on the form of iron also suggests a possible role for iron-dependent cell death mechanisms, such as ferroptosis. Iron chelation may increase the susceptibility of cancer cells to iron-dependent oxidative death pathways. Increased availability of active iron, particularly in the case of FeHBED, may promote lipid peroxidation and activation of ferroptotic pathways, as confirmed by studies showing that iron supplementation enhances ferroptosis in cancer cells [28]. These observations, combined with the strong dependence of the cytotoxic effect on iron speciation, suggest a potential role for iron-dependent cell death mechanisms, such as ferroptosis. However, as specific markers such as GPX4 levels or lipid peroxidation were not evaluated in this study, the involvement of ferroptosis remains a hypothesis that requires further experimental validation. At this stage, our data primarily confirm an apoptotic-like mechanism accompanied by the selective modulation of oncogenic gene expression [29].

The effects of the FeCl_3 -biofortified extract further underscore the importance of using the appropriate form of iron. FeCl_3 provides Fe^{3+} , which is less bioavailable due to rapid hydrolysis and precipitation under physiological conditions, resulting in limited cellular uptake and poor biological activity. These results underscore that not only the presence of iron but also its chemical form critically determines biological effects [30].

It is important to consider that the enhanced anticancer activity of the FeHBED-biofortified extract may not be solely due to iron speciation itself, but rather to a synergy between the bioavailable iron and changes in the composition of bioactive mushroom metabolites. Our previous study demonstrated that FeHBED significantly alters the metabolic profile of *H. erinaceus* during growth. Therefore, the in vitro digestion process likely releases a unique profile of bioaccessible compounds that, in combination with stable chelated iron, target oncogenic pathways more effectively than inorganic iron forms. While the current study focuses on the functional cellular response to these digested extracts, the observed effects likely reflect this multifaceted interaction between iron speciation and fungal secondary metabolism.

The biological effects of biofortified *H. erinaceus* extracts observed in the present study seem to involve multiple interconnected cellular mechanisms affecting proliferation, survival signaling, and stress responses in HT-29 colorectal cancer cells.

These findings are consistent with the gene expression data obtained by RT-qPCR, which revealed the downregulation of several key regulators of cell cycle progression and oncogenic signaling, including HRAS, MYC, and CDK4. HRAS is a proto-oncogene belonging to the RAS family that activates major proliferative pathways such as MAPK/ERK and PI3K/AKT, which are essential for tumor cell growth and survival. Therefore, reduced HRAS expression may indicate suppression of proliferative signaling cascades [31]. Similarly, the transcription factor MYC, one of the most important drivers of tumor cell

proliferation and metabolic reprogramming, was also downregulated, which is commonly associated with the antiproliferative activity of anticancer compounds [32]. In addition, decreased expression of *CDK4*, encoding a key cyclin dependent kinase controlling the G1–S cell cycle transition, suggests that the extract may induce cell cycle arrest and exert cytostatic effects in HT-29 cells [33]. The inhibitory effect on tumor cell proliferation was accompanied by changes in genes associated with cell migration and invasive potential. Notably, significant downregulation of *RHOA* and *ITGB1* was observed. *RHOA* plays a critical role in cytoskeleton organization and regulation of cell motility, whereas integrin $\beta 1$ (*ITGB1*) mediates adhesion to the extracellular matrix and contributes to tumor cell invasion and metastasis [34]. The suppression of these genes may therefore indicate that the biofortified mushroom extract not only inhibits cell proliferation but may also reduce the migratory and invasive capacity of colorectal cancer cells.

The pronounced activity of the FeHBED-biofortified extract compared to other forms can be attributed to the high stability and water solubility of the HBED chelate. While inorganic iron forms, such as FeCl_3 , are prone to rapid hydrolysis and precipitation in the gastrointestinal environment, the FeHBED complex ensures superior bioavailability and more efficient cellular uptake of iron. This leads to a significant expansion of the intracellular labile iron pool, which is essential for fueling pro-oxidant reactions and subsequent molecular changes. Beyond simple iron delivery, our results suggest an alternative mechanism involving a speciation-dependent synergy: the FeHBED form likely interacts with *H. erinaceus* metabolites (e.g., erinacines and phenols) to create a more potent biological system that selectively downregulates key oncogenes like *HRAS* and *MYC*, a response not observed with less bioavailable iron forms.

Interestingly, despite the overall antiproliferative effect, the expression of *VEGFA* was upregulated in treated cells. In colorectal cancer cells, activation of the HIF-1 α –*VEGFA* signaling axis is a well-known response to metabolic stress [35]. HT-29 cells are particularly sensitive to metabolic disturbances, and increased *VEGFA* expression has frequently been reported following exposure to plant- or fungus-derived bioactive compounds that induce oxidative stress or mitochondrial dysfunction [36]. Therefore, the observed increase in *VEGFA* expression may represent a stress-induced adaptive response rather than a direct pro-tumorigenic effect, reflecting the activation of survival mechanisms in response to unfavorable intracellular conditions.

This explanation is supported by the simultaneous modulation of genes involved in pro-survival signaling. Moderate downregulation of *NFKB1* (nuclear factor kappa B subunit 1), encoding a central transcription factor regulating inflammatory signaling and cell survival, may increase the susceptibility of cancer cells to apoptosis [37]. In addition, decreased expression of the anti-apoptotic gene *BCL2L1* (Bcl-xL) suggests reduced anti-apoptotic protection of the cells. Although a decrease in *BAX* expression was also observed, this does not necessarily exclude apoptosis induction, as the activity of *BAX* is largely regulated at the post-translational level and depends on mitochondrial translocation and interactions with other BCL-2 family proteins [38]. The observed downregulation of *BAX* mRNA, while seemingly inconsistent with typical apoptosis induction, highlights the complexity of the cellular response to FeHBED-biofortified extracts. It is well established that *BAX* function is critically controlled by post-translational modifications and mitochondrial translocation, rather than by transcript levels alone. Furthermore, the simultaneous and significant suppression of anti-apoptotic *BCL2L1* and pro-survival *NFKB1* suggests a shift in the intracellular balance toward programmed cell death. Therefore, the morphological hallmarks observed such as chromatin condensation and cellular fragmentation likely reflect an apoptotic-like pathway triggered by the loss of survival signaling, even in the absence of *BAX* transcriptional upregulation. The selective modulation of gene expression

was further supported by the lack of significant changes in several regulatory genes, including *PTEN*, *MAPK1*, *RAC1*, *CDKN1B*, *CDKN2A*, and *NFKBIA*, suggesting that the extracts did not induce global transcriptional suppression but rather targeted specific signaling pathways associated with tumor cell proliferation, survival, and migration. Furthermore, the lack of significant changes in the expression of several key regulatory genes, such as *PTEN* and *MAPK1*, underscores the selective nature of the FeHBED-biofortified extract's action, indicating that the observed molecular alterations are not a result of non-specific global transcriptional suppression induced by high cytotoxicity.

The biological activity observed in this study may be attributed to the diverse bioactive compounds present in *H. erinaceus*. This medicinal mushroom contains numerous secondary metabolites, polysaccharides, phenolic compounds, and sterols, many of which have been reported to exert antioxidant and anticancer activities. Previous studies have shown that metabolites derived from *H. erinaceus* can induce oxidative stress, apoptosis, and cell cycle arrest in cancer cells [9]. Iron is an essential cofactor in numerous redox reactions and may promote the generation of reactive oxygen species through Fenton-type reactions, which catalyze the conversion of hydrogen peroxide into highly reactive hydroxyl radicals [39]. The resulting increase in ROS levels may contribute to cellular stress and stabilization of HIF-1 α , which in turn stimulates *VEGFA* transcription. This mechanism could explain the simultaneous observation of *VEGFA* upregulation and reduced proliferation of HT-29 cells [40].

It should be acknowledged that the present study was conducted using a single colorectal cancer model (HT-29), which may limit the generalizability of these findings owing to the unique genetic and metabolic characteristics of this cell line. Although the selective modulation of gene expression observed via RT-qPCR suggests a targeted effect rather than general toxicity, further studies involving additional cancer models (such as HCT116 or SW480) and normal colon epithelial cells are necessary. Such research will be crucial to definitively confirm the selectivity of biofortified *H. erinaceus* extracts and to further establish their translational potential as functional food components.

Taken together, the results suggest that biofortified *H. erinaceus* extracts exert a multifaceted biological effect on colorectal cancer cells, involving inhibition of proliferative signaling pathways, reduction in migration-related gene expression, and activation of stress-related adaptive responses. The combined action of mushroom-derived bioactive metabolites and iron-mediated redox modulation may therefore contribute to the observed cytostatic and potentially anti-metastatic effects in HT-29 cells.

4. Materials and Methods

4.1. Biofortification

The initial characteristics of the biofortified fruiting bodies, including iron accumulation levels and metabolic profiles, were established in our previous study (<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.147238>), ensuring the reproducibility and standardization of the material used for the current extraction and digestion processes. The aforementioned study detailed each stage of the process, including the preparation of microorganisms and spawn, substrate preparation, cultivation conditions and the preparation of carpophores [15]. For the biofortification process, three iron compounds were used as enrichment agents: iron(III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), iron(II) sulfate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), and bis(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine diacetic acid ferric potassium complex (FeHBED) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Each compound was introduced at a concentration corresponding to 10 mM Fe. A non-supplemented system without the addition of iron, served as the control.

4.2. Simulated In Vitro Gastrointestinal Digestion of *Hericium erinaceus* Extract

In vitro digestion was performed as described in our previously work [41]. The digested samples were centrifuged ($10,700 \times g$ for 30 min at 4 °C) and frozen at 80 °C for 24 h. Next, lyophilization was carried out in a Labconco freeze dryer (Labconco, Kansas City, MO, USA).

4.3. Cell Cultures

Experiments were performed using the human colorectal adenocarcinoma cell line HT-29 (ATCC® HTB-38™). The cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with either 10% or 2% fetal bovine serum (FBS). The culture medium was enriched with antibiotics, specifically penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL). Cells were incubated under standard culture conditions at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

4.4. Samples Preparation

The lyophilized samples were accurately weighed and subsequently dissolved in a mixture of RPMI 1640 culture medium and DMSO at a 1:1 ratio. Stock solutions were prepared at a concentration of 100 mg/mL. At the highest tested sample concentration, the DMSO content did not exceed 0.25%. According to our earlier findings, this level of DMSO does not exert cytotoxic effects within the experimental time frame applied in this study.

4.5. Cytotoxicity

MTT Assay

The MTT assay was used to evaluate cell viability and proliferative capacity. This method is based on the assessment of mitochondrial oxidoreductase activity. In metabolically active cells, the yellow tetrazolium salt (MTT) is reduced by mitochondrial succinate dehydrogenase to insoluble purple formazan crystals, resulting in a visible color shift from yellow to purple. Cells were seeded into 96-well plates at a density of 1×10^5 cells/mL. After 24 h, the culture medium was aspirated and replaced with fresh medium containing appropriate concentrations of the in vitro digested *H. erinaceus* extract. All biofortification variants were evaluated at 50, 100, 200, 400, and 600 µg/mL. Following a 24 h incubation period, either in the presence or absence of the tested extract, MTT solution (5 mg/mL in PBS) was added, and the plates were incubated for an additional 3 h to allow for formazan formation. The reaction was terminated by adding 10% SDS prepared in 0.01 N HCl to solubilize the crystals. After overnight incubation (24 h), absorbance was measured at 570 nm using a Varioskan™ LUX multimode microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The measured absorbance values, corresponding to the intensity of the purple coloration, were directly proportional to the number of viable cells [42]. The assay was conducted in three independent experiments, with six technical replicates per concentration in each run.

4.6. Antioxidant Properties

DPPH Method

The antioxidant activity of the tested compounds and preparations was evaluated using the DPPH radical scavenging assay. This method measures the ability of antioxidants to neutralize the stable DPPH radicals. The reaction involves the donation of a hydrogen atom to the nitrogen-centered free radical of DPPH, leading to the formation of the corresponding hydrazine. This process results in a decrease in absorbance and a visible color change from purple to yellow, associated with the reduction in DPPH [43].

The analysis was performed in 96-well microplates. Methanolic solutions of the tested samples and Trolox were prepared at appropriate dilutions. All biofortification variants were evaluated at concentrations of 50, 100, 200, 400, and 600 µg/mL. Trolox was used as the reference antioxidant (positive control), and methanol was used as the negative control. Subsequently, 100 µL of each dilution (samples, Trolox, or methanol) was added to the wells, followed by 100 µL of DPPH solution prepared in methanol at a concentration of 0.2 mg/mL. After incubation for 10 min at room temperature, absorbance was measured at 515 nm using a Varioskan™ LUX multimode microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The antioxidant capacity measurements were performed in three independent experimental series.

4.7. Cellular Morphology Analysis

May–Grünwald–Giemsa Staining

This procedure was employed to evaluate morphological alterations in cells following exposure to the tested substances. Cells were seeded into 24-well plates at a density of 5×10^5 cells/mL (1 mL per well). After 24 h of incubation in the presence or absence of the examined extracts, the culture medium was carefully aspirated, and the cells were subjected to May–Grünwald staining. All biofortification variants were evaluated at concentrations of 50, 100, 200, 400, and 600 µg/mL. Specifically, 1 mL of May–Grünwald solution was added to each well and incubated for 3 min at room temperature. Subsequently, 1 mL of deionized water was added, and after an additional 3 min incubation, the staining solution was removed. The wells were gently rinsed with deionized water and then stained with Giemsa solution diluted 1:20 for 30 min at room temperature. Following staining, the dye was discarded, the wells were washed again with 1 mL of deionized water and the plates were air-dried. Cellular morphology was documented using a KEYENCE VHX-X1 microscope (KEYENCE Corporation, Osaka, Japan).

4.8. Expression of Genes Associated with Cancer of the Large Intestine

4.8.1. RNA Isolation and Genomic DNA Removal from RNA Preparations

Total RNA was isolated from HT-29 cells cultured in RPMI medium supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS), as well as from cells grown in the same medium supplemented with *H. erinaceus* extract biofortified with FeHBED at a final concentration of 600 µg/mL. Following trypsinization, the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and stored at -70°C until further processing.

RNA was extracted using the GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 5×10^6 cells were lysed in 600 µL of lysis buffer supplemented with β-mercaptoethanol. The samples were mixed briefly, and 360 µL of ethanol was added. The lysates were then transferred to RNA purification columns and centrifuged at $12,000 \times g$. After sequential washing steps with the provided wash buffers, the RNA was eluted using nuclease-free water.

Residual genomic DNA was removed by DNase I treatment (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland), using 1 U of DNase per 1 µg of RNA. The digestion was carried out at 37°C for 30 min and terminated by adding EDTA to a final concentration of 5 mM. DNase was subsequently inactivated by incubation at 75°C for 10 min.

RNA concentration and purity were assessed spectrophotometrically using a NanoDrop 2000 instrument (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). The purified RNA was subsequently used for complementary DNA (cDNA) synthesis [44].

4.8.2. cDNA Synthesis and Quantitative Real-Time PCR

Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 µg of total RNA using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) following the manufacturer's protocol. Reverse transcription was performed at 42 °C for 60 min, and the reaction was terminated by heating the samples at 70 °C for 5 min. The resulting cDNA was used directly as a template for quantitative real-time PCR (qPCR).

Relative mRNA expression analysis was carried out using quantitative real-time PCR on a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Amplification reactions were performed with TaqMan™ Fast Advanced Master Mix in combination with a predesigned TaqMan™ Array Plate (Human Molecular Mechanisms of Cancer). The array included 92 assays targeting genes involved in molecular mechanisms of cancer, particularly those associated with p53 signaling pathways, as well as four candidate endogenous control genes. The PCR cycling conditions were as follows: initial incubation at 50 °C for 2 min, enzyme activation at 95 °C for 20 s, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 1 s and annealing/extension at 60 °C for 20 s. Gene expression was calculated with GUSB used as the reference gene. In the first step, ΔC_t values were determined as the difference between the C_t value of the target gene and the C_t value of the reference gene. Subsequently, $\Delta\Delta C_t$ values were calculated as the difference between the ΔC_t of the experimental sample and the ΔC_t of the control sample. Based on these values, fold change in gene expression was determined using the formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Additionally, $\log_2 FC$ values were calculated. Positive $\log_2 FC$ values were interpreted as upregulation, negative values as downregulation, and values close to zero as indicating no significant change relative to the control. The experiments were performed in three independent biological replicates ($n = 3$).

4.9. Statistical Analysis

All analyses were performed using the Python (version 3.12; Python Software Foundation, Wilmington, DE, USA) programming environment. Data processing and preparation were conducted with the Pandas library. The Trolox standard curve was fitted using linear regression with the ordinary least squares (OLS) method implemented in the statsmodels package. The significance of the calibration model was evaluated based on the coefficient of determination (R^2), the p -value, and the standard error of the slope.

The Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) for the analyzed samples was calculated by substituting the mean absorbance values into the linear regression equation of the calibration curve. The standard deviation of TEAC was determined using error propagation for a linear function, according to the following formula:

$$SD_{TEAC} = \frac{SD_{abs}}{|a|} \quad (1)$$

where a denotes the slope of the calibration curve.

Differences between groups were assessed using one-way analysis of variance (ANOVA), with a linear model fitted by the OLS method in statsmodels. The significance of the factor effect was tested at the $\alpha = 0.05$. Post hoc comparisons were performed using Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) test to identify pairs of groups that differed significantly from each other. All experiments were performed in at least three independent replicates ($n = 3$), and the results are presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of these independent trials. Data visualizations were generated using Matplotlib (version 3.11.0; Matplotlib Development Team), and statistical plots were prepared using Seaborn (version 0.13.2; Seaborn Development Team). The analysis script was executed from the command line using the Aargparse module.

Author Contributions: Conceptualization, K.S. and A.W.; methodology, K.S., D.S. and E.B.-W.; investigation, K.S., K.R. and E.B.-W.; data curation, K.S., K.R. and J.S.; writing—original draft preparation, K.S. and K.R.; writing—review and editing, A.W.; supervision, A.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research did not receive any external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Berbecka, M.; Berbecki, M.; Gliwa, A.M.; Szewc, M.; Sitarz, R. Managing Colorectal Cancer from Ethology to Interdisciplinary Treatment: The Gains and Challenges of Modern Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 2032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Menon, A.; Jalal, A.; Arshad, Z.; Nawaz, F.A.; Kashyap, R. Benefits, side effects, and uses of *Herichium erinaceus* as a supplement: A systematic review. *Front. Nutr.* **2025**, *12*, 1641246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hsu, C.-H.; Liao, E.-C.; Chiang, W.-C.; Wang, K.-L. Antioxidative Activities of Micronized Solid-State Cultivated *Herichium erinaceus* Rich in Erinacine A against MPTP-Induced Damages. *Molecules* **2023**, *28*, 3386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lee, K.-F.; Hsieh, Y.-Y.; Tung, S.-Y.; Teng, C.-C.; Cheng, K.-C.; Hsieh, M.-C.; Huang, C.-Y.; Lee, K.-C.; Lee, L.-Y.; Chen, W.-P.; et al. The Cerebral Protective Effect of Novel Erinacines from *Herichium erinaceus* Mycelium on In Vivo Mild Traumatic Brain Injury Animal Model and Primary Mixed Glial Cells via Nrf2-Dependent Pathways. *Antioxidants* **2024**, *13*, 371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Friedman, M. Chemistry, Nutrition, and Health-Promoting Properties of *Herichium erinaceus* (Lion’s Mane) Mushroom Fruiting Bodies and Mycelia and Their Bioactive Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7108–7123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Lagunas-Rangel, F.A.; Jonsson, J.; Jackevica, L.; Fredriksson, R.; Dambrova, M.; Schiöth, H.B. Statins regulate kinase signaling by causing changes in phosphorylation, rather than through changes in gene expression or direct inhibition: Evidence in colorectal cancer. *Front. Pharmacol.* **2025**, *16*, 1653702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Liu, J.; Wang, W.; Hu, Q.; Wu, X.; Xu, H.; Wang, M.; Su, A.; Xie, M.; Yang, W. Bioactivities and molecular mechanisms of Bioactivities and molecular mechanisms of polysaccharides from *Herichium erinaceus*. *J. Future Foods* **2022**, *2*, 103–111. [[CrossRef](#)]
9. Qiu, Y.; Lin, G.; Liu, W.; Zhang, F.; Linhardt, R.J.; Wang, X.; Zhang, A. Bioactive compounds in *Herichium erinaceus* and their biological properties: A review. *Food Sci. Hum. Wellness* **2024**, *13*, 1825–1844. [[CrossRef](#)]
10. Słyszczak, K.; Siwulski, M.; Wiater, A.; Tomczyk, M.; Waśko, A. Biofortification of Mushrooms: A Promising Approach. *Molecules* **2024**, *29*, 4740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Budzyńska, S.; Siwulski, M.; Gąsecka, M.; Magdziak, Z.; Kalač, P.; Niedzielski, P.; Mleczek, M. Biofortification of Three Cultivated Mushroom Species with Three Iron Salts—Potential for a New Iron-Rich Superfood. *Molecules* **2022**, *27*, 2328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Hu, T.; Hui, G.; Li, H.; Guo, Y. Selenium biofortification in *Herichium erinaceus* (Lion’s Mane mushroom) and its in vitro bioaccessibility. *Food Chem.* **2020**, *331*, 127287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Rzymiski, P.; Niedzielski, P.; Siwulski, M.; Mleczek, M.; Budzyńska, S.; Gąsecka, M.; Poniedziałek, B. Lithium biofortification of medicinal mushrooms *Agrocybe cylindracea* and *Herichium erinaceus*. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54*, 2387–2393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Jozífek, M.; Praus, L.; Matějka, J.; Jablonský, I.; Koudela, M. Selenium Uptake by *Herichium erinaceus* Basidiocarps on Various Substrates and Their Effect on Growth and Yield. *Agriculture* **2025**, *15*, 460. [[CrossRef](#)]
15. Słyszczak, K.; Siwulski, M.; Frąszczak, B.; Wiater, A.R.; Waśko, A. Comparative Iron biofortification in *Herichium erinaceus*: A study of different ionic forms and their uptake efficiency. *Food Chem.* **2026**, *405*, 147238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Del Vecchio, L.; Girelli, D.; Vinchi, F.; Cozzolino, M.; Elliott, S.; Mark, P.B.; Valenti, L.; Qian, C.; Guo, Q.; Qian, Z.-M.; et al. Iron biology. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2024**, *39*, 1404–1415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ni, S.; Yuan, Y.; Kuang, Y.; Li, X. Iron Metabolism and Immune Regulation. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 816282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

18. Zeng, L.; Liu, X.; Geng, C.; Gao, X.; Liu, L. Ferroptosis in cancer (Review). *Oncol. Lett.* **2024**, *28*, 304. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Chen, J.; Chen, X. Editorial: Ferroptosis as new therapeutic targets in cancer: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 1019395. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Chen, F.; Kang, R.; Tang, D.; Liu, J. Ferroptosis: Principles and significance in health and disease. *J. Hematol. Oncol.* **2024**, *17*, 41. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Xie, B.; Guo, Y. Molecular mechanism of cell ferroptosis and research progress in regulation of ferroptosis by noncoding RNAs in tumor cells. *Cell Death Discov.* **2021**, *7*, 101. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Zhou, Q.; Meng, Y.; Li, D.; Yao, L.; Le, J.; Liu, Y.; Sun, Y.; Zeng, F. Ferroptosis in cancer: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2024**, *9*, 55. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Tung, S.Y.; Lee, K.F.; Hsieh, Y.Y.; Cheng, K.C.; Lee, K.C.; Lee, L.Y.; Chen, W.P.; Chen, C.C.; Teng, C.C.; Hsieh, M.C.; et al. A Novel Erinacine S Derivative from *Hericium erinaceus* Overcomes Chemoresistance in Colorectal Cancer Cells by Enhancing TRAIL/TNFR1/DR5 Expression through Histone Acetylation. *Int. J. Med. Sci.* **2025**, *22*, 4278–4294. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Hou, X.X.; Liu, J.Y.; Li, Z.Y.; Chang, M.C.; Guo, M.; Feng, C.P.; Shi, J.Y. Fruiting body polysaccharides of: *Hericium erinaceus* induce apoptosis in human colorectal cancer cells via ROS generation mediating caspase-9-dependent signaling pathways. *Food Funct.* **2020**, *11*, 6128–6138. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Yuan, Y.; Ni, S.; Zhuge, A.; Li, B.; Li, L. Iron Regulates the Warburg Effect and Ferroptosis in Colorectal Cancer. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 614778. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Zhang, J.; Wang, Y.; Zhou, Y.; He, Q.Y. Jolkinolide B induces apoptosis of colorectal carcinoma through ROS-ER stress-Ca²⁺-mitochondria dependent pathway. *Oncotarget* **2017**, *8*, 91223–91237. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Wong, F.C.; Chai, T.T.; Tan, S.L.; Yong, A.L. Evaluation of bioactivities and phenolic content of selected edible mushrooms in Malaysia. *Trop. J. Pharm. Res.* **2013**, *12*, 1011–1016. [\[CrossRef\]](#)
28. Wang, R.; Xing, R.; Su, Q.; Yin, H.; Wu, D.; Lv, C.; Yan, Z. Knockdown of SFRS9 Inhibits Progression of Colorectal Cancer Through Triggering Ferroptosis Mediated by GPX4 Reduction. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 683589. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Xia, W.; Lv, Y.; Zou, Y.; Kang, Z.; Li, Z.; Tian, J.; Zhou, H.; Su, W.; Zhong, J. The role of ferroptosis in colorectal cancer and its potential synergy with immunotherapy. *Front. Immunol.* **2024**, *15*, 1526749. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Galaris, D.; Barbouti, A.; Pantopoulos, K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **2019**, *1866*, 118535. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. McDonald, R.A.; Varela-Ramirez, A.; Ashley, A.K. RESEARCH CHALLENGES IN STAGE III AND IV RAS-ASSOCIATED CANCERS: A Narrative Review of the Complexities and Functions of the Family of RAS Genes and Ras Proteins in Housekeeping and Tumorigenesis. *Biology* **2025**, *14*, 936. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Venkateswaran, N.; Conacci-Sorrell, M. MYC leads the way. *Small GTPases* **2020**, *11*, 86–94. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Crozier, L.; Foy, R.; Mouery, B.L.; Whitaker, R.H.; Corno, A.; Spanos, C.; Ly, T.; Gowen Cook, J.; Saurin, A.T. CDK4/6 inhibitors induce replication stress to cause long-term cell cycle withdrawal. *EMBO J.* **2022**, *41*, EMBJ2021108599. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Costa, P.; Scales, T.M.E.; Ivaska, J.; Parsons, M. Integrin-Specific Control of Focal Adhesion Kinase and RhoA Regulates Membrane Protrusion and Invasion. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e74659. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Zhang, J.; Deng, Y.T.; Liu, J.; Gan, L.; Jiang, Y. Role of transforming growth factor- β 1 pathway in angiogenesis induced by chronic stress in colorectal cancer. *Cancer Biol. Ther.* **2024**, *25*, 2366451. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Kang, Y.; Li, H.; Liu, Y.; Li, Z. Regulation of VEGF-A expression and VEGF-A-targeted therapy in malignant tumors. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2024**, *150*, 221. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Cartwright, T.; Perkins, N.D.; L Wilson, C. NFKB1: A suppressor of inflammation, ageing and cancer. *FEBS J.* **2016**, *283*, 1812–1822. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Vogler, M.; Braun, Y.; Smith, V.M.; Westhoff, M.A.; Pereira, R.S.; Pieper, N.M.; Anders, M.; Callens, M.; Vervliet, T.; Abbas, M.; et al. The BCL2 Family: From Apoptosis Mechanisms to New Advances in Targeted Therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2025**, *10*, 91. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Abe, C.; Miyazawa, T.; Miyazawa, T. Current Use of Fenton Reaction in Drugs and Food. *Molecules* **2022**, *27*, 5451. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Takala, H.; Saarnio, J.; Wiik, H.; Ohtonen, P.; Soini, Y. HIF-1 α and VEGF are associated with disease progression in esophageal carcinoma. *J. Surg. Res.* **2011**, *167*, 41–48. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Szwajgier, D.; Paduch, R.; Kukuła-Koch, W.; Polak-Berecka, M.; Waśko, A. Study on Biological Activity of Bread Enriched with Natural Polyphenols in Terms of Growth Inhibition of Tumor Intestine Cells. *J. Med. Food* **2020**, *23*, 181–190. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Kowalik, K.; Paduch, R.; Strawa, J.W.; Wiater, A.; Wlizio, K.; Wasko, A.; Wertel, I.; Pawłowska, A.; Tomczykowa, M.; Tomczyk, M. *Potentilla alba* Extracts Affect the Viability and Proliferation of Non-Cancerous and Cancerous Colon Human Epithelial Cells. *Molecules* **2020**, *25*, 3080. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

43. Gulcin, İ.; Alwasel, S.H. DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes* **2023**, *11*, 2248. [[CrossRef](#)]
44. Rachwał, K.; Niedźwiedź, I.; Waśko, A.; Laskowski, T.; Szczepkowski, P.; Kukula-Koch, W.; Polak-Berecka, M. Red Kale (*Brassica oleracea* L. ssp. *acephala* L. var. *sabellica*) Induces Apoptosis in Human Colorectal Cancer Cells In Vitro. *Molecules* **2023**, *28*, 6938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.