

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна

## ФУНКЦІОНУВАННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ *ASPERGILLUS VERSICOLOR* З РАДІОАДАПТИВНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ ЗА ДІЇ ІОНІЗУЮЧОГО ОПРОМІНЕННЯ

Вперше у штамі виду *Aspergillus versicolor* виявлено меланінові пігменти. Іонізуюче опромінення практично не впливало на синтез меланіну у штамі *A. versicolor* з радіоадаптивними властивостями та стимулювало його синтез у контрольного штаму, який таких властивостей не проявляв. У досліджених штамів виявлено високий (від 100 до 720 од. м $\mu$ <sup>-1</sup>білка) рівень активності супероксиддисмутази. Опромінення в експоненційній фазі росту практично не впливало чи підвищувало активність супероксиддисмутази (СОД) у штамі з радіоадаптивними властивостями та пригнічувало її активність у контрольного штаму. Опромінення в стаціонарній фазі супроводжувалося пригніченням активності СОД у штамі з радіоадаптивними властивостями та суттєвим (в 2 рази) підвищенням активності СОД у контрольного штаму і штаму *A. versicolor* 101, що не проявляв радіотропізму. У досліджених штамів позаклітинна каталазна активність (1,5-37 ммоль  $\times$  хв<sup>-1</sup>  $\times$  м $\mu$ <sup>-1</sup> білка) перевищувала більш ніж на порядок внутрішньоклітинну (8-230 мкмоль  $\times$  хв<sup>-1</sup>  $\times$  м $\mu$ <sup>-1</sup> білка).

**К л ю ч о в і с л о в а:** *Aspergillus versicolor*, меланін, супероксиддисмутаза, каталаза, іонізуюче опромінення, радіоадаптивні властивості.

У попередніх дослідженнях нами встановлено, що серед грибів, виділених із зони відчуження ЧАЕС, на другому місці за кількістю здатних адаптуватися до значних доз опромінення після виду *Cladosporium cladosporioides* був *Aspergillus versicolor* [3]. Штами останнього проявляли не тільки резистентність до дії значних доз іонізуючого опромінення, а й були здатні позитивно реагувати на дію опромінення, тобто реалізовувати радіоадаптивні властивості (радіотропізм, радіостимуляцію та адаптивну відповідь) [21, 22]. Літературні відомості щодо адаптаційного потенціалу мікроскопічних грибів, зокрема широко розповсюдженого *A. versicolor*, в умовах хронічного опромінення практично відсутні, а такі дані матимуть незаперечну значущість для оцінки віддалених наслідків дії хронічного опромінення як на *A. versicolor*; так і, до певної міри, на мікобіоту в цілому. Раніше було показано, що суттєву роль у радіорезистентності грибів, а також в реалізації радіоадаптивних властивостей у темнопігментованих видів, відіграють меланінові пігменти, яким притаманні радіопротекторні і антиоксидантні властивості [9,10]. У літературі є дані щодо провідної ролі антиоксидантних ферментів у захисті клітин дріжджів та бактерій від впливу іонізуючої радіації [17]. Дані щодо можливих механізмів, які беруть участь у реалізації радіоадаптивних властивостей у світлопігментованого виду *A. versicolor* відсутні. Раніше було встановлено, що у темнопігментованих мікроміцетів меланіни, які є неферментативною складовою антиоксидантної системи, відіграють суттєву роль в реалізації радіоадаптивних властивостей цих грибів [9,10]. Нами було зроблено припущення, що і у *A. versicolor* в реалізацію радіоадаптивних властивостей вносить свій вклад не тільки ферментативна антиоксидантна система, а можливо, і неферментативна складова, зокрема, меланіни. Залишалось не вирішеним питання, чи наявні меланіни у клітинній стінці *A. versicolor*. Відомо, що у багатьох видів роду *Aspergillus*, зокрема, *A. niger*; *A. fumigatus*, *A. carbonarius* є меланінові пігменти, дані щодо їх наявності у *A. versicolor* в доступній нам літературі відсутні [18].

Метою даної роботи було встановлення наявності меланінових пігментів у *A. versicolor* та дослідження впливу іонізуючого опромінення на їх синтез та активність супероксиддисмутази та каталази у штамі з радіоадаптивними властивостями.

**Матеріали і методи.** Об'єктами дослідження були штами мікроскопічних грибів виду *Aspergillus versicolor*, які зберігались в колекції відділу фізіології і систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

У роботі використано три штами *A. versicolor*, вилучені з різних за рівнем радіаційного забруднення приміщень об'єкта «Укриття», які проявляли радіоадаптивні властивості, та один штаму із чистого відносно радіонуклідів приміщення (контроль), що таких властивостей не мав. Характеристику штамі наведено в табл. 1.

© Т.І. Тугай, 2011

Культивування грибів проводили при  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  на модифікованому рідкому середовищі Чапека, яке містило 20 г/л глюкози упродовж 15 діб. Засів проводили суспензією конідій з концентрацією  $1 \times 10^6$  кон/мл середовища в кількості 10 % (об'ємна частка). Посівний матеріал вирощували упродовж 10 діб на агаризованому середовищі (сусло-агарі).

Культивування мікроміцетів в умовах хронічного опромінення проводили на раніше сконструйованій нами модельній установці, як описано у праці [9]. Потужність експозиційної дози на поверхні модельної установки становила 3мР/год, на 8-му добу росту грибів (експоненційна фаза) інтегральна поглинута доза становила 1,5 Гр, а на 15-ту добу (стаціонарна фаза) – 3 Гр.

По закінченню культивування біомасу мікроміцетів шляхом двоступеневої фільтрації відділяли від культуральної рідини і в останній визначали активність позаклітинної каталази.

Відділену біомасу багаторазово промивали від залишків культуральної рідини дистильованою водою. Клітини руйнували за допомогою розтирання у рідкому азоті та суспендували в 0,15 М калій-фосфатному буфері (рН 7,0).

Таблиця 1

**Характеристика досліджуваних штамів *Aspergillus versicolor***

Номер штаму	Місце і час виділення	Радіоактивність субстрату на час виділення (мР/год)	Наявність тропічних реакцій	Наявність радіостимуляції
55	Приміщення об'єкту "Укриття", 2003	250	наявні	наявна
99	- " -	70 000	наявні	наявна
101	- " -	100 000	відсутні	наявна
432	Київ, житлове приміщення, 2003	Фоновий рівень	відсутні	відсутня

Від залишків клітин звільнялись шляхом центрифугування отриманого дезінтеграту при 8000 об/хв. і в супернатанті визначали внутрішньоклітинну активність каталази та СОД. Із осаду екстрагували пігменти загальноприйнятим для екстракції меланінів методом лужного гідролізу – розчином 2 % NaOH упродовж 24 год з коефіцієнтом розбавлення 1:10 як описано [1]. Отриманий екстракт підкислювали до рН 2 концентрованою HCl і утворений осад пігменту відділяли центрифугуванням при 6000 об/хв упродовж 15 хв. Таку процедуру повторювали двічі. Отриманий осад розчиняли в 2 % NaOH, після чого діалізували розчин пігменту проти дистильованої води, потім висушували до постійної ваги при  $65^\circ\text{C}$ . Отриманий пігмент використовували для подальших досліджень його фізико-хімічних властивостей. Рівень синтезу меланінових пігментів виражали відношенням ваги виділених пігментів до маси абсолютно сухої біомаси (АСБ), яку визначали ваговим методом при висушуванні до постійної маси при температурі  $65^\circ\text{C}$ .

Каталазну активність визначали спектрометричним методом, суть якого полягає у здатності перекису водню утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс при довжині хвилі 410 нм [4]. Коефіцієнт молярної екстинції перекису водню –  $22,2 \times 10^3 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ . Активність зовнішньоклітинної каталази виражали в ммольях, а внутрішньоклітинної – в мкмольях розкладеного  $\text{H}_2\text{O}_2 \times \text{хв}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$  білка.

Активність супероксиддисмутази (СОД) визначали спектрофотометричним методом при довжині хвилі 406 нм за ступенем гальмування реакції окислення кверцетину [5]. За одиницю активності СОД приймали таку кількість білка, яка інгібувала швидкість реакції окислення кверцетину на 50% від максимальної активності ферменту і перераховували на 1 мг білка супернатанту. Концентрацію білка у пробах визначали за методом Bradford, використовуючи як стандарт альбумін сироватки бика [14].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням пакету програм Sigma Stat-2.0 та представляли графічно за допомогою програми Microsoft Excel. Відмінності середніх показників вважали достовірними при рівні значимості  $p < 0,05$ .

**Результати та їх обговорення.** У попередніх дослідженнях нами було встановлено, що ряду штамів *A. versicolor* притаманний комплекс радіоадаптивних властивостей (табл. 1) [11].

Нашим завданням було дослідити чи є взаємозв'язок між особливостями функціонування їх антиоксидантної системи і реалізацією радіоадаптивних властивостей у цих штамів.

Перш за все поставало питання, чи беруть участь у реалізації радіоадаптивних властивостей у цього виду грибів меланінові пігменти. Переважно наявність меланінових пігментів характерна для темнопігментованих видів мікроскопічних грибів, які належать, зокрема, до родини *Dematiaceae*. На теперішній час виявлено меланінові пігменти у ряду видів, що відносяться до родини *Moniliaceae* – *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. sydowi*, *Penicillium marneffeii*, *Paecilomyces variotii* [1, 20, 23].

Як показали наші дослідження, 0,1 % розчини виділених з досліджуваних штамів *A. versicolor* пігментних препаратів в 0,1n NaOH в присутності 10 % пероксиду водню окислювались і знебарвлювались упродовж доби. При додаванні перманганату калію забарвлення лужних розчинів змінювалось із світло-коричневого на зелене, а потім знебарвлювалось і випадав осад.

Спектр поглинання отриманих пігментних препаратів в 0,1n NaOH в УФ та видимій частині спектру мав вигляд кривої без явно виражених характеристичних максимумів поглинання, що характерно для меланінів грибного походження (рис. 1.) Отже фізико-хімічні характеристики досліджених пігментів свідчать, що штам *A. versicolor* продукували меланіни, які у грибів, як відомо, є складовою неферментативної антиоксидантної системи [1, 6].

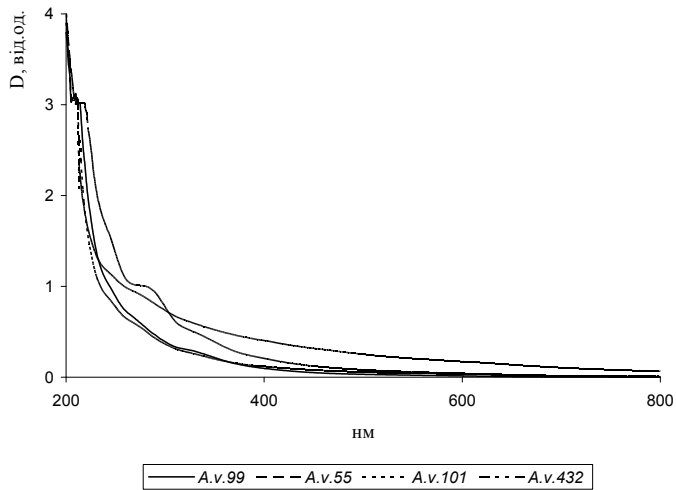


Рис.1. Спектри поглинання пігментів *Aspergillus versicolor* (A.v. – *Aspergillus versicolor*)

На наступному етапі досліджували вплив іонізуючого опромінення на синтез пігментів у штамів *A. versicolor*, що перебували в експоненційній і стаціонарній фазі росту.

Експерименти показали, що опромінення в експоненційній фазі росту штамів *A. versicolor* 55, *A. versicolor* 99 з властивостями радіотропізму і радіостимуляції не впливало на синтез меланіну, проте у штаму *A. versicolor* 432, виділеного з чистих територій, що не проявляв радіоадаптивних реакцій, за таких умов спостерігали активацію синтезу меланіну (табл. 2). Штам *A. versicolor* 101, у якого відсутній радіотропізм та виявлена радіостимуляція, характеризувався значним вихідним (до опромінення) вмістом меланіну, а опромінення у експоненційній фазі росту супроводжувалось суттєвим його зниженням (практично у два рази).

У стаціонарній фазі росту (табл. 2) у контрольного штаму *A. versicolor* 432 за дії опромінення спостерігали активацію синтезу меланіну. Опромінення практично не впливало на накопичення меланіну у штамів *A. versicolor* 55 і *A. versicolor* 99, а у штаму *A. versicolor* 101 дещо пригнічувало його синтез.

Таким чином, серед досліджених штамів *A. versicolor* іонізуюче опромінення виявилось індуктором синтезу меланінових пігментів лише у контрольного штаму, який не проявляв радіоадаптаційних властивостей, що, можливо, є його захисною реакцією на дію опромінення [6].

У світлопігментованих штамів із радіоадаптивними властивостями, на відміну від темнопігментованих, у стаціонарній фазі росту не виявлено активації синтезу меланіну під впливом опромінення [10].

Такі відмінності у синтезі меланінових пігментів у темно- та світлопігментованих грибів, на нашу думку, зумовлені тим, що у темнопігментованих грибів з радіоадаптивними властивостями при попередній дії радіації (в зоні відчуження) був сформований достатній вихідний рівень меланіну для захисту організму за дії опромінення, що запобігає проникненню радіації у клітину, який був необхідним пристосуванням до життя в умовах інтенсивної радіації. А у контрольних штамів, що вперше зазнали впливу опромінення має місце зворотна залежність, а опромінення являється індуктором синтезу додаткової кількості пігменту, тобто спостерігається посилення пігментації із збільшенням радіації, подібні результати були отримані при опроміненні ряду грибів УФ- світлом [6].

На наступному етапі було проведено дослідження функціонування основних ферментів антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази (СОД) та каталази у *A. versicolor*; як у умовах опромінення, так і за його відсутності (контроль), що має важливе значення для з'ясування їхньої ролі в формуванні радіоадаптивних властивостей досліджуваних мікроміцетів.

Встановлено, що досліджувані штами *A. versicolor* мали високий вихідний (за відсутності опромінення) рівень загальної активності СОД, при цьому у штамів з радіоадаптивними властивостями в обох фазах росту він був вище, ніж у контрольного штаму, за виключенням *A. versicolor* 101 в стаціонарній фазі росту (табл. 3).

У досліджених штамів *A. versicolor* виявлено такий саме високий рівень активності СОД, як і у штамів виду *Paecilomyces lilacinus*, біоіндикатора високого рівня радіоактивного забруднення в зоні відчуження [12] та суттєво (більше ніж у два рази) вищий ніж у фітопатогенних та токсичних штамів видів *Fusarium equiseti*, *F. decemcellulare*, *A. flavus*, *A. niger*, сапрофітних видів *A. nidullans*, *A. terreus* та у меланінівмісних штамів *Cladosporium cladosporioides*, *Hormoconis resinae*, що проявляли радіоадаптивні властивості [9, 10, 13, 15]. У досліджених штамів *A. versicolor* рівень активності СОД в експоненційній та стаціонарній фазах росту не залежав від наявності чи відсутності у них радіоадаптивних властивостей (табл. 3). Різне співвідношення активності СОД у цих фазах росту, за даними літератури, виявлено у ряду видів грибів. Так, у контрольних штамів *P. lilacinus*, *C. cladosporioides* активність СОД була однаковою в експоненційній та стаціонарній фазах росту [7, 10, 12]. У *Fusarium decemcellulare* та *F. equiseti*, у штамів *C. cladosporioides* та *P. lilacinus* з радіоадаптивними властивостями в стаціонарній фазі рівень активності СОД був вдвічі вищий ніж в експоненційній.

Таблиця 2

**Вплив іонізуючого опромінення на синтез меланінових пігментів  
*Aspergillus versicolor***

Штам	Пігмент (мкг/г АСБ) у штамів	
	неопромінених	опромінених
Експоненційна фаза		
<i>A. versicolor</i> 432	70 ± 4	91 ± 5
<i>A. versicolor</i> 55	30 ± 2	29 ± 1
<i>A. versicolor</i> 99	35 ± 2	32 ± 2
<i>A. versicolor</i> 101	221 ± 11	121 ± 6
Стаціонарна фаза		
<i>A. versicolor</i> 432	111 ± 5	151 ± 7
<i>A. versicolor</i> 55	17 ± 0,9	17 ± 0,8
<i>A. versicolor</i> 99	17 ± 0,9	16,9 ± 0,9
<i>A. versicolor</i> 101	30 ± 1	25 ± 1

**Примітка:** АСБ – абсолютно суха біомаса;

На відміну від них, у патогенних видів *A. flavus*, *A. niger* та сапрофітів *A. nidullans*, *A. terreus* внутрішньоклітинна активність СОД була найвищою на початку експоненційної фази росту грибів [15].

Основоючись на вищевикладеному, можна вважати, що співвідношення активності СОД в різних фазах росту у грибів не залежить від патогенних чи сапрофітних властивостей, наявності чи відсутності радіоадаптивних властивостей, а визначається штамовими та видовими особливостями. В експоненційній фазі росту опромінення практично не впливало чи підвищувало активність СОД у штамів з радіоадаптивними властивостями та пригнічувало

її активність у контрольного штаму. В стаціонарній фазі при дії опромінення виявлено пригнічення активності СОД у штамів з радіоадаптивними властивостями та суттєве (в 2 рази) підвищення активності СОД у контрольного штаму і штаму *A. versicolor* 101, що не проявляв радіотропізму.

Підсумовуючи отримані дані можна стверджувати, що опромінення індукувало різні зміни в активності СОД у штамів *A. versicolor* з радіоадаптивними властивостями і контрольного, що свідчить про взаємозв'язок між реалізацією радіоадаптивних властивостей і функціонуванням цього ферменту у досліджуваних грибів. Рівень вихідної активності СОД у досліджених штамів *A. versicolor* значно вищий (в 2-3 рази), порівняно з відомим для багатьох видів грибів, що, на нашу думку, може бути одним з механізмів антиоксидантного захисту, який забезпечує радіоадаптивні властивості цього виду щодо дії іонізуючого опромінення [10, 12, 13, 15].

Таблиця 3

**Вплив іонізуючого опромінення на активність супероксиддисмутази**

*Aspergillus versicolor*

Штам	Активність (од/мг білка) у штамів	
	неопромінених	опромінених
	Експоненційна фаза	
<i>A. versicolor</i> 432	120 ± 6	93 ± 4
<i>A. versicolor</i> 55	235 ± 6	210 ± 7
<i>A. versicolor</i> 99	201 ± 10	258 ± 13
<i>A. versicolor</i> 101	736 ± 36	703 ± 35
	Стаціонарна фаза	
<i>A. versicolor</i> 432	251 ± 12	404 ± 20
<i>A. versicolor</i> 55	236 ± 11	202 ± 10
<i>A. versicolor</i> 99	341 ± 17	197 ± 9
<i>A. versicolor</i> 101	101 ± 5	222 ± 11

Слід зазначити, що у експоненційній фазі росту у контрольного штаму на фоні зниження активності СОД спостерігали підвищення синтезу меланіну. Виходячи з даних літератури про власну здатність меланіну до дисмутації супероксидних радикалів, можна стверджувати, що меланін в такому випадку компенсує активність СОД, тобто відбувається взаємодоповнююча відповідь клітини спрямована на захист від надлишку активних форм кисню [2]. Такого роду залежність між активністю СОД і наявністю меланінових пігментів була виявлена і у *C.cladosporioides* та *Cryptococcus neoformans* [10, 16]. У літературі є відомості про те, що іонізуюче випромінювання слугувало індуктором активності загальної активності СОД, яка захищала клітини від надлишку активних форм кисню у дріжджів, *C.cladosporioides* [10, 17].

У всіх досліджених штамів *A. versicolor* було виявлено значний рівень позаклітинної каталазної активності (табл. 4). Найвищу активність спостерігали у контрольного штаму *A. versicolor* 432, що не мав радіоадаптивних властивостей в обох фазах росту, та у *A. versicolor* 101, що не проявляв радіотропізму, в стаціонарній фазі.

У штамів, що проявляли всі радіоадаптивні властивості (табл. 1), рівень активності був в кілька разів нижче, ніж у контрольного. Найменший рівень позаклітинної каталазної активності виявлений у *A. versicolor* 55. Іонізуюче опромінення слугувало у них індуктором активності цього ферменту, у штаму *A. versicolor* 55 спостерігали суттєве (біля 4 разів) підвищення активності ферменту в обох фазах росту, а у *A. versicolor* 99 – в 2,5 рази в стаціонарній фазі росту, при цьому опромінення пригнічувало активність цього ферменту у контрольного штаму в обох фазах росту.

Найвища внутрішньоклітинна каталазна активність виявлена у контрольного штаму в обох фазах росту, порівняно зі штамми з радіоадаптивними властивостями (табл. 5). Іонізуюче опромінення в експоненційній фазі росту пригнічувало активність ферменту практично у всіх штамів, а в стаціонарній фазі росту спостерігали як пригнічення, так і ріст активності цього ферменту. Слід зазначити, що у досліджених штамів рівень позаклітинної каталазної актив-

ності виявився більш ніж на порядок вищим за такий внутрішньоклітинного ферменту. Проте і рівень внутрішньоклітинної каталазної активності у досліджених штамів *A. versicolor* у кілька разів вищий за відомий у *Neurospora crassa* та близький до такого у *Blakeslea trispora* [2].

Отримані дані, на нашу думку, свідчать про здатність досліджених штамів *A. versicolor* знешкоджувати надлишок перекису водню ще до проникнення його в клітину грибів, що узгоджується з даними літератури про високу стабільність відносно перекису водню у світлопігментованих грибів роду *Penicillium*, які продукують позаклітинну каталазу [8]. Аналогічно високий рівень позаклітинної каталази був виявлений і у *Paecilomyces lilacinus* [12]. На противагу цьому, як було встановлено, у темнопігментованих штамів *Cladosporium cladosporioides* та *Hormoconis resinaea* практично відсутня позаклітинна каталазна активність [10].

Таблиця 4

**Вплив іонізуючого опромінення на позаклітинну каталазну активність у *Aspergillus versicolor***

Штам	Активність (ммоль/хв мг білка) у штамів	
	неопроміненних	опроміненних
Експоненційна фаза		
<i>A. versicolor</i> 432	16,0 ± 0,8	13,92 ± 1,1
<i>A. versicolor</i> 55	2,1 ± 0,1	10,12 ± 1,1
<i>A. versicolor</i> 99	8,0 ± 0,4	1,52 ± 0,1
<i>A. versicolor</i> 101	2,0 ± 0,1	2,02 ± 0,1
Стационарна фаза		
<i>A. versicolor</i> 432	37,0 ± 1,9	12,5 ± 0,5
<i>A. versicolor</i> 55	5,0 ± 0,3	22,5 ± 0,8
<i>A. versicolor</i> 99	5,0 ± 0,3	12,6 ± 0,6
<i>A. versicolor</i> 101	30,1 ± 1,5	14,6 ± 0,7

Таблиця 5

**Вплив іонізуючого опромінення на внутрішньоклітинну каталазну активність у *Aspergillus versicolor***

Штам	Активність (мкмоль/хв мг білка) у штамів	
	неопроміненних	опроміненних
Експоненційна фаза		
<i>A. versicolor</i> 432	100 ± 5	60 ± 2
<i>A. versicolor</i> 55	60 ± 3	52 ± 2
<i>A. versicolor</i> 99	20 ± 1	8 ± 0,3
<i>A. versicolor</i> 101	30 ± 1	37 ± 1
Стационарна фаза		
<i>A. versicolor</i> 432	230 ± 11	143 ± 1
<i>A. versicolor</i> 55	120 ± 6	154 ± 1
<i>A. versicolor</i> 99	50 ± 2	22 ± 1
<i>A. versicolor</i> 101	10 ± 0,5	14 ± 0,5

У контрольного штаму опромінення пригнічувало активність і зовнішньоклітинної і внутрішньоклітинної каталази, при цьому індукувало синтез меланінових пігментів, які, як відомо з літератури, здатні проявляти каталазну активність [2]. Отримані дані свідчать про те, що реалізація адаптації до дії опромінення у світлопігментованих та темнопігментованих мікроміцетів відбувається різними шляхами.

Таким чином, нами встановлено, що досліджені штами *A. versicolor* мали в своєму складі меланінові пігменти, які приймали участь в функціонуванні їх антиоксидантної системи. У досліджених штамів виявлений високий рівень активності СОД і позаклітинної каталази,

порівняно з відомими в літературі для мікроскопічних грибів. Опромінення практично не впливало на синтез меланінів та СОД у штамів з радіоадаптивними властивостями. У контрольного штаму іонізуюче опромінення в експоненційній фазі росту пригнічувало активність СОД та каталази і одночасно було індуктором синтезу меланіну, який, за даними літератури, здатен проявляти як СОД так і каталазну активність. Можливо, саме спроможність цих грибів швидко і специфічно здійснювати багатьма шляхами трансдукцію сигналів активних форм кисню, що утворюються при дії опромінення, забезпечує їх здатність не тільки до виживання у несприятливих умовах, а і до формування у них радіоадаптаційних властивостей.

Автор висловлює свою щирю вдячність д-р ф.-м. наук В.О. Желтоножському і Л.В. Садовнікову, співробітникам Інститут ядерних досліджень НАН України за допомогу в проведенні досліджень з опромінення грибів.

**Т.И. Тугай**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины, Киев*

## **ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ *ASPERGILLUS VERSICOLOR* С РАДИОАДАПТИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ**

Резюме

Впервые у штаммов *Aspergillus versicolor* выявлены меланиновые пигменты. Ионизирующее облучение практически не влияло на синтез меланина у штаммов *A. versicolor* с радиоадаптивными свойствами и стимулировало его синтез у контрольного штамма, который таких свойств не проявлял. У исследованных штаммов выявлено высокий (от 100 до 720 ед. мг<sup>-1</sup> белка) уровень активности супероксиддисмутазы. Облучение в экспоненциальной фазе роста практически не влияло или повышало активность супероксиддисмутазы (СОД) у штаммов с радиоадаптивными свойствами и угнетало ее активность у контрольного штамма. Облучение в стационарной фазе сопровождалось снижением активности СОД у штаммов с радиоадаптивными свойствами, и существенным (в 2 раза) повышением активности СОД у контрольного штамма и штамма *A. versicolor* 101, который не проявлял радиотропизма. У исследованных штаммов внеклеточная каталазная активность (1,52 - 37,04 ммоль × мин<sup>-1</sup> × мг<sup>-1</sup> белка) превышала более чем на порядок внутриклеточную (8 - 230 мкмоль × мин<sup>-1</sup> × мг<sup>-1</sup> белка).

*Ключевые слова:* *Aspergillus versicolor*, меланин, супероксиддисмутаза, каталаза, ионизирующее облучение, радиоадаптивные свойства.

**Т.И.Тугай**

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,*

*National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

## **FUNCTIONING OF ANTIOXIDANT SYSTEM *ASPERGILLUS VERSICOLOR* WITH RADIOADAPTIVE PROPERTIES UNDER EXPOSURE OF RADIATION**

S u m m a r y

Melanin pigments were revealed for the first time in *Aspergillus versicolor* strains. Ionizing irradiation practically did not influence melanin synthesis in *A. versicolor* strains with radioadaptive properties and stimulated its synthesis in the control strain, which did not show such properties. High level of superoxide dismutase activity (from 100 up to 720 U/mg of protein) was revealed in the investigated strains. The irradiation in exponential phase of growth did not practically influence or raised activity of superoxide dismutase (SOD) in the strains with radioadaptive properties and oppressed its activity in the control strain. The irradiation in a stationary phase was accompanied by a decrease of SOD activity in the strains with radioadaptive properties, and essential (2 times) increase of SOD activity in the control strain and strain *A. versicolor* 101, which did not show radiotropism. The extracellular catalase activity (1.52-37.04 mmol · min<sup>-1</sup> · mg<sup>-1</sup> protein) exceeded by more than an order the intracellular one (8-230 mol · min<sup>-1</sup> · mg<sup>-1</sup> protein) in the investigated strains.

The paper is presented in Ukrainian.

**К е у о р д s:** *Aspergillus versicolor*, melanin, superoxide dismutase, catalase, ionization radiation, radioadaptive properties.

**T h e a u t h o r ' s a d d r e s s:** *Tugay T.I.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Бабичья В.Г., Щерба В.В., Филимонова Т.В., Григорчук Е.А. Меланиновые пигменты грибов *Paecilomyces variotii* и *Aspergillus carbonarius* // Прикл.биохим.микробиол. – 2000. – **36**, № 2. – С. 153 – 159.
2. Гесслер Н.Н., Аверьянов А.А., Белозерская Т.А. Активные формы кислорода в регуляции развития грибов // Биохимия. – 2007. – 72, № 10. – С. 1342 – 1363.
3. Жданова Н.Н., Захарченко В.А., Тугай Т.И., Карпенко Ю.В., Наконечная Л.Т., Павличенко А.К., Желтоножский В.А., Жидков А.В., О.Ф. Сенюк Грибное поражение помещений объекта «Укрытие» // Проблемы безпеки атомних електростанцій і Чорнобиля. – 2005. 3., ч.1. – С. 78 – 86.
4. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Методы определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1988. – №1. – С.16 – 19.
5. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. мед. химии. – 1990. – **36**, №2. – С.88 – 91.
6. Лях С.П., Рубан Е.Л. Микробные меланины. – М.: Наука, 1972. – 242 с.
7. Меденцев А.Г., Аринбасарова А.Ю., Акименко В.К. Адаптация фитопатогенного гриба *Fusarium decemcellulare* к окислительному стрессу // Микробиология. – 2001. – **70**, № 1. – С. 34 – 38.
8. Павловская Ж.И., Михайлова Р.В., Мороз И.В., Еремин А.Н. Устойчивость *Penicillium piceum* F-648 к действию пероксида водорода в условиях кратковременного и длительного окислительного стресса // Прикл.биохим. микробиол. – 2003. – **39**, №1. – С. 31 – 36.
9. Тугай Т.И., Жданова Н.Н., Желтоножский В.А., Садовников Л.В., Л.М.Садовникова, Бузарова Е.И. Влияние пролонгированного действия ионизирующего излучения на активность полифенолоксидазы и тирозиназы и на синтез меланина у *Hormoconis resinae* // Ядерна фізика та енергетика. – 2006. – № 2(18). – С. 82 – 87.
10. Тугай Т.И. Вплив низьких доз іонізуючого випромінювання на синтез меланінових пігментів та активність каталази і супероксиддисмутаз у *Cladosporium cladosporioides* // Укр. біохім. журн. – 2007. – **79**, № 6. – С. 93 – 99.
11. Тугай Т.И. Ріст *Aspergillus versicolor* (Vuill.)Tiraboschi під впливом різних доз іонізуючого опромінення в умовах модельних систем // Укр. ботан. журн. – 2008. – **65**, № 5. – С. 723 – 732.
12. Тугай Т.И. Вплив іонізуючого опромінення на активність ферментів антиоксидантного захисту *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samsom // Мікробіол. журн. – 2011. – **73**, №1. – С. 29 – 35.
13. Ayar-Kayali H., Tarhan L. The effect of cultural conditions on the variations of SOD, CAT and GSH-Px activities and LPO levels in the filamentous fungus *Fusarium equiseti* // Turk.J.Chem. – 2004. – **28**, N 2. – P. 213 – 222.
14. Bredford M.M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding // J. Analytical Biochemistry. – 1976. – **72**, N 1-2. – P. 248 – 254.
15. Holdom M.D., Hay R.J., Hamilton A.J. The Cu,Zn superoxide dismutases of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidullans*, *Aspergillus terreus*: purification and biochemical comparison with the *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase // Infect.Immun. – 2006. – **64**, N 8. – P.3326 – 3332.
16. Jacobson E.S., Hove E., Emery H.S. Antioxidant function of melanin in black fungi// Infect.Immun. – 1995. – **63**, N 12. – P.4944 – 494.
17. Lee J.H., Choi I.Y., Kil I.S., Kim S.Y., Yang E.S., Park J.-W. Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast // BBA. – 2001. – **1526**, N 2. – P. 191 – 198.
18. Pihet M., Vandeputte P., Tronchin G., Renier G., Saulnier P., Georgeault S., Mallet R., Chabasse D., Symoens F., Bouchara J-P. Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia // BMC Microbiol. – 2009. – **9** – P.177.
19. Thiagarajan A., Saravanakumar K., Kaviyarsan V. Optimization of extracellular peroxidase production from *Coprinus* sp. // Indian. J. Sci. Technol. – 2008. – **1**, N 7. – P. 1 – 5.
20. Tsai H-F., Wheeler M.H., Chang Y.C., Kwon-Chung K.J. A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* // J. Bacteriol. – 1999. – **181**, N 20. – P. 6469 – 6477.
21. Tugay T., Zhdanova N.N., Zheltonozhsky V., Sadovnikov L., Dighton J. The influence of ionizing radiation on spore germination and emergent hyphal growth response reactions of microfungi // Mycologia. – 2006. – **98**, N4. – P. 521 – 527.
22. Zhdanova N.N., Tugay T., Dighton J., Zheltonozhsky V., McDermott P. Ionizing radiation attracts soil fungi // Mycol.Res. – 2004. – **108**, N 9. – P. 1089 – 1096.
23. Youngchim S., Hay R.J., Hamilton A.J. Melanization of *Penicillium marneffeii* in vitro and in vivo // Microbiology. – 2005. – **151**, N.1 – P. 291 – 299.

Отримано 19.10.2010