

ВЛИЯНИЕ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗЫ И ТИРОЗИНАЗЫ И НА СИНТЕЗ МЕЛАНИНА У *HORMOCONIS RESINAE*

Т. И. Тугай¹, Н. Н. Жданова¹, В. А. Желтоножский², Л. В. Садовников²,
М. Л. Садовникова², Е. И. Бузарова¹

¹Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев

²Институт ядерных исследований НАН Украины, Киев

Изучено влияние малых доз радиации на активность полифенолоксидазы и тирозиназы и на синтез меланина у штаммов *Hormoconis resiniae* 61 и 801, выделенных из объекта «Укрытие» и чистой относительно радионуклидов территории соответственно. Выявлены значительные изменения активности полифенолоксидазы и тирозиназы у исследуемых штаммов, которые зависели от фазы роста грибов и наличия у них радиоадаптационных свойств. Под влиянием облучения наблюдалась активация синтеза меланина, более выраженная у штамма, выделенного из объекта «Укрытие».

Введение

В последние годы постоянно обсуждаются вопросы, связанные с действием радиации в малых дозах. Согласно литературным данным [1] будем считать, что к малым дозам, полученным от воздействия ионизирующего излучения, можно отнести дозы, при которых еще не проявляются детерминированные биологические дефекты на клеточном уровне, т.е. поглощенная доза менее 20 сГр, хотя даже при дозе 0,1 сГр уже наблюдаются стохастические клеточные эффекты [1]. Именно с такими уровнями поглощенных доз мы сталкиваемся при проведении радиоэкологических исследований объектов из 5- и 10-километровой зоны ЧАЭС.

Как было показано нами ранее, у микромицетов, выделенных в течение 18 лет после аварии из радиоактивно загрязненных территорий ближней зоны ЧАЭС и внутренних помещений объекта «Укрытие», под воздействием повышенного радиационного фона сформировался ряд ранее не известных радиоадаптивных и радиотропных свойств [2 - 5]. Такие позитивные реакции грибов по отношению к действию ионизирующей радиации, прежде всего, могут обеспечиваться особенностями функционирования их антиоксидантных систем, позволяющих проявлять не только радиорезистентные свойства, а также и свойства радиационного гормезиса [3 - 8]. Данные о влиянии малых доз радиации на микромицеты в литературе практически отсутствуют. Как известно, у ряда микромицетов и, в частности, у представителей рода *Hormoconis resiniae* в клеточной стенке грибов находятся меланиновые пигменты, обладающие, благодаря своей структуре, радиопротекторными и антиоксидантными свойствами [9 - 11]. Наличие этих пигментов, по всей видимости, может быть одной из причин

столь высокого уровня радиорезистентности, которым обладают эти грибы [6, 7].

В связи с этим представляло особый интерес изучить влияние пролонгированного действия ионизирующего излучения на активность ферментов, катализирующих синтез меланина у представителей вида микромицетов *Hormoconis resiniae*, который по данным многолетнего мониторинга микробиоты внутренних помещений объекта «Укрытие» относится к часто встречающимся в этих помещениях видам и характеризуется высоким уровнем радиорезистентности [7, 8].

Целью данной работы было исследование влияния пролонгированного действия ионизирующего излучения низкой интенсивности на активность вне- и внутриклеточной полифенолоксидазы и тирозиназы; на синтез меланина у штаммов *Hormoconis resiniae*, выделенных из чистых и радиоактивно загрязненных территорий соответственно. Исследования проводили в логарифмической и стационарной фазах роста грибов, чтобы оценить функционирование этих ферментов под воздействием малых доз радиации в разных циклах развития культур грибов.

Материалы и методы

Объектами исследования были два темнопигментированных штамма *Hormoconis resiniae* 61 и 801, хранящихся в коллекции отдела физиологии и систематики микромицетов ИМВ НАН Украины на специальной среде (сусло-агаре) при температуре 4 °С.

Hormoconis resiniae 801 выделен из «чистых», относительно радионуклидов, территорий Донецкой области. *Hormoconis resiniae* 61 выделен из внутренних помещений объекта «Укрытие» с уровнем экспозиционной дозы до 300 мР/ч.

Грибы были выращены на жидкой среде Чапека с 20 г/л глюкозы. Время культивирования 8 и 15 сут, что соответствовало середине логарифмической и стационарной фаз роста.

Тирозиназную активность определяли по спектрофотометрической методике [12] при длине волны 475 нм, используя в качестве субстрата 2 мМ раствор тирозина в 50 мМ натрий-калий-фосфатном буфере при pH = 6,0. Полифенолоксидазную активность определяли по этой же методике, но при длине волны 410 нм; в качестве субстрата использовался 2 мМ раствор катехола в ацетатном буфере с pH = 5,5.

Облучения проводились на модельной системе, имитирующей радиоактивные почвы 5-километровой зоны ЧАЭС (рис. 1). Для этого были отобраны образцы почвы в ближней зоне ЧАЭС (район «Рыжего леса»), проведен отжиг и приготовлена проба с равномерным распределением радионуклидов по площадке 0,7 м². Суммарный уровень загрязнения радионуклидами чернобыльского происхождения (¹³⁷Cs, ⁹⁰Sr и незначительная, относительно цезия, примесь ¹⁵⁴Eu и ¹⁵⁵Eu) составил $(5 \pm 1) \cdot 10^7$ Бк/м². Мощность экспозиционной дозы (по гамма-излучению) на поверхности модельной площадки по данным дозиметрии составила (для воздуха) на уровне центра массы раствора в колбе $(3,5 \pm 0,5)$ мР/ч, что соответствует мощности эффективной эквивалентной дозы для литра воды $(0,77 \pm 0,10)$ мЗв/ч. Учитывая общую массу и объем раствора, при его удельной плотности, равной 1, для нашей модельной системы мощность интегральной поглощенной дозы для 8 л составляла приблизительно 6,1 мГр/ч, с учетом самопоглощения в объеме образца, которое составляет не более 5 %.

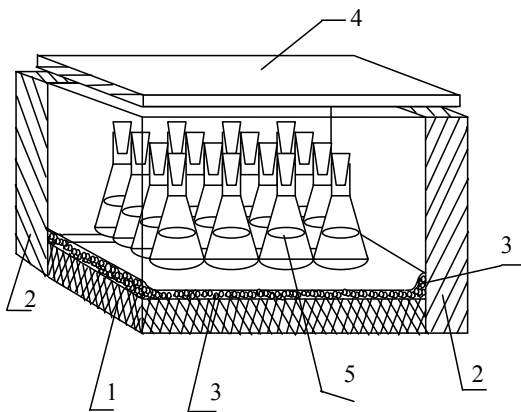


Рис. 1. Модельная система для облучения микрогрибов: 1 - слой радиоактивной почвы $A = 5 \times 10^7$ Бк/м²; 2 - биологическая защита (свинец, 100 мм); 3 - пенопластовый короб термостата (термостатирование (18 ± 1) °С); 4 - крышка термостата; 5 - колбы с раствором суспензий конидий грибов.

После 8 сут облучения интегральная поглощенная доза была $\approx 1,2$ Гр, а при 15 сут облучения $\leq 2,2$ Гр.

Что касается измерения активности ферментов, то за условную единицу активности принимали прирост оптической плотности в 1 мл реакционной смеси, пересчитанной на 1 мг вносимого белка.

Белок определяли по методу Бредфорда [13].

Выделение меланинов проводили, отделяя фильтрованием и промывая дистиллированной водой, затем разрушали растиранием с кварцевым песком, центрифугировали при 6000 об/мин и в надосадочной жидкости проводили исследование активностей внутриклеточных ферментов и водорастворимой фракции меланинов, а осадок использовали для выделения меланиновых пигментов, растворимых в щелочи. Экстракцию меланина проводили 2 %-ным раствором NaOH в течение 24 ч при постоянном перемешивании. Затем проводили двукратную фильтрацию для устранения нерастворенных частиц, после чего осаждали пигменты подкислением щелочного экстракта концентрированной HCl до pH = 2,0 и осадок отделяли центрифугированием (6000 об/мин). Осадок растворяли в NaOH, после чего проводили диализ растворенного пигмента против дистиллированной воды и высушивали до постоянной массы при 65 °С. Полученный осадок пигментов был использован для дальнейших исследований его физико-химических свойств.

Результаты и обсуждение

Изучено влияние пролонгированного действия ионизирующего излучения чернобыльских выбросов, преимущественно изотопа ¹³⁷Cs на вне- и внутриклеточные активности ферментов тирозиназы и полифенолоксидазы у штаммов *Hormoconis resinae* 61, выделенного из объекта «Укрытие», и *H. resinae* 801 - контрольного, выделенного из «чистых», относительно радионуклидов, территорий, а также его влияние на синтез меланинов у этих штаммов. Полученные данные представлены на (рис. 2).

В стационарной фазе роста грибов пролонгированное действие излучения не оказывало влияния на вне- и внутриклеточную активности полифенолоксидазы у штамма *H. resinae* 61, выделенного из радиационнозагрязненных зон. Что же касается штамма, выделенного из «чистых» территорий (в плане загрязнения техногенными радионуклидами), то отмечено существенное увеличение внеклеточной и ингибирование внутриклеточной полифенолоксидазной активности в сравнении с контролем (контрольные

образцы выращивались в идентичных условиях освещения и температуры, но без облучения).

Под влиянием ионизирующего излучения отмечено различное изменение полифенолоксидазной активности в логарифмической и стационарной фазах роста у исследуемых штаммов (см. рис. 2). У штамма *H. r. 61*, выделенного из радиоактивных территорий ЧАЭС, выявлена, в

сравнении с контролем (без облучения), активация фермента в логарифмической и ингибирование в стационарной фазах роста. У штамма *801*, выделенного из «чистых» мест, под влиянием облучения отмечено ингибирование полифенолоксидазной активности как в логарифмической, так и в стационарной фазах роста в сравнении с контролем (т.е. без облучения).

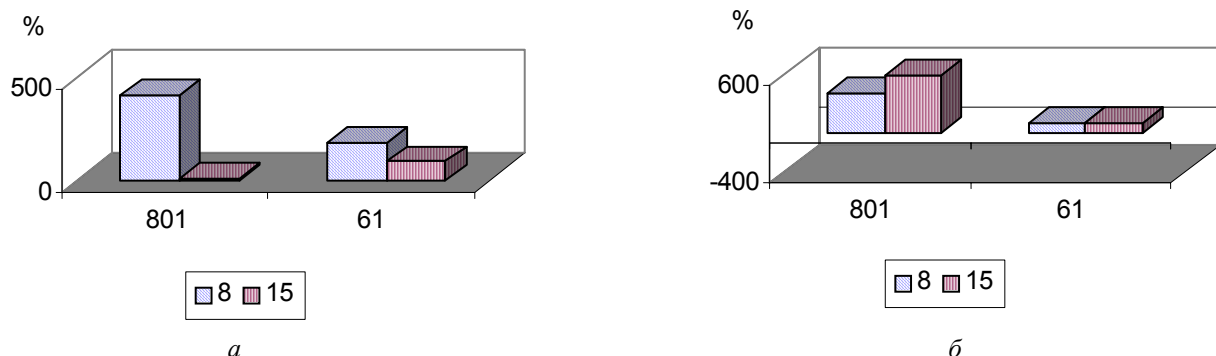


Рис. 2. Влияние радиации в модельной системе на активность внеклеточной (а) и внутриклеточной (б) полифенолоксидазы штаммов *Hormoconis resiniae 61* и *801* в логарифмической и стационарной фазах роста (на 8-е и 15-е сутки культивирования). Активность выражена в процентах по отношению к контролю (т. е. без облучения).

Под влиянием облучения в сравнении с контролем (без облучения) наблюдается изменение уровня вне- и внутриклеточной полифенолоксидазной и тирозиназной активностей у этих грибов. Оба эти фермента принимают участие в синтезе меланина, в норме они функционируют взаимосвязано. Очевидно, что для нормального метаболизма существенно сохранение определенного соотношения между активностями этих ферментов (рис. 3).

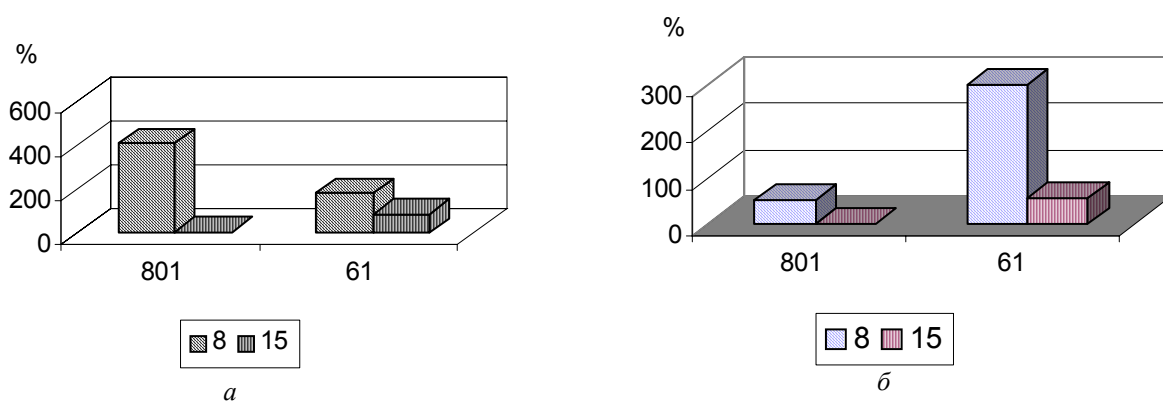


Рис. 3. Влияние малых доз радиации на внутриклеточную активность тирозиназы штаммов *Hormoconis resiniae 61* и *801* в логарифмической (а) и стационарной (б) фазах роста (на 8-е и 15-е сутки культивирования). Активность выражена в процентах по отношению к контролю (без облучения).

Представляло интерес исследовать соотношение активностей этих ферментов в контроле (без облучения) и под действием облучения у штаммов *H. resiniae 61* и *801*, выделенных из радиоактивно загрязненных и «чистых» территорий соответственно.

Исследовано влияние облучения на синтез меланина в логарифмической и стационарной фазах роста у штаммов, обладающих и необла-

дающих радиотропными свойствами. Полученные данные представлены на (рис. 4).

В логарифмической фазе роста отмечены значительные различия в соотношении тирозиназной/полифенолоксидазной активностей. Эти различия у исследуемых штаммов увеличиваются в несколько раз в стационарной фазе роста, однако при этом следует отметить, что изменения происходят преимущественно у штамма, выделенно-

го из «чистых» относительно радионуклидов территорий, в то время как соотношение активности исследуемых ферментов у штамма, выделенного из помещений с повышенным радиоактивным фоном, практически остается неизменным (см. рис. 4).

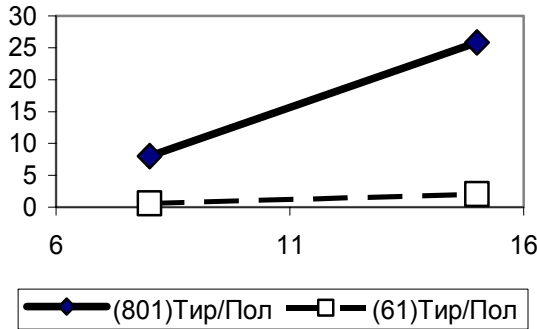


Рис. 4. Изменение соотношения внутриклеточной тирозиназы к полифенолоксидазе в сравнении с контролем (по осям отложены: Y - тирозиназа, X - полифенолоксидаза).

Под влиянием облучения наблюдается некоторое увеличение синтеза меланина у контрольно-

го штамма, не обладающего радиотропными свойствами, и значительное увеличение синтеза меланина в сравнение с контролем (без облучения) (рис. 5).

Очевидно, что излучение низкой интенсивности оказывало различное влияние на активности полифенолоксидазы и тирозиназы, ферментов, катализирующих синтез меланина, у штаммов, выделенных из помещений объекта «Укрытие» и из «чистых», относительно радионуклидов, территорий. Выявлено и разное изменение соотношения этих ферментов под действием излучения у этих штаммов. Такое воздействие малых доз радиации на активность ферментов, катализирующих синтез меланиновых пигментов, привело к увеличению их синтеза по отношению к контрольным образцам (без облучения). Увеличение же синтеза меланиновых пигментов может быть одним из проявлений радиоадаптационных свойств у исследуемых штаммов к условиям культивации на территориях с повышенным уровнем радиоактивного загрязнения, величина которого лежит в пределах малых доз, о которых говорилось в начале работы.

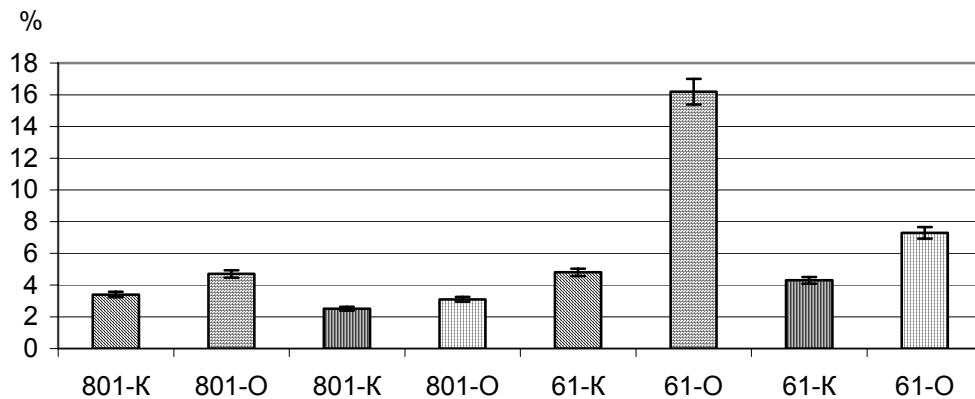


Рис. 5. Влияние относительно малых доз радиации на синтез меланина штаммами *Hormoconis resinae* 61 и 801 в логарифмической и стационарной фазах роста (на 8-е и 15-е сутки): К – контроль (без облучения); О – опыт (облучение).

- ▨ - контроль на 8-е сутки;
- ▤ - опыт на 8-е сутки;
- ▧ - контроль на 15-е сутки;
- ▩ - опыт на 15-е сутки.

Таким образом, установлен комплексный ответ на действие малых доз радиации у исследуемых штаммов микромицетов, который зависел от наличия или отсутствия как радиотропных свойств, так и от фазы их роста.

Большие амплитуды колебаний исследуемых ферментативных активностей (в три - пять раз)

под действием облучения свидетельствуют о значимости этих ферментов в функционировании антиоксидантной системы исследуемых штаммов микрогрибов, благодаря этому осуществляется нормальный уровень их жизнедеятельности. Как правило, увеличение полифенолоксидазной активности сопровождалось уменьшением

ем тирозиназной активности в соответствующих фазах роста грибов и наоборот. Последнее может свидетельствовать о включении прямых и обратных связей для поддержания гомеостаза при действии малых доз облучения.

Мы можем сделать вывод о том, что под влиянием пролонгированного действия облучения низкой интенсивности на территориях, подвергшихся радиационному заражению в пределах малых экспозиционных доз, у штаммов почвенных микромицетов *Hormoconis resinae 61* и

801 могут вырабатываться радиоадаптивные свойства, связанные с активацией синтеза меланина благодаря повышению активности ферментов полифенолоксидазы и тирозиназы.

Отметим, что исследования проведены на модельной системе, созданной из почвы «Рыжего леса», в которой отсутствует непосредственный контакт микрогрибов с радиоактивной почвой. Это позволило исключить влияние биохимических факторов внешней среды на процессы метаболизма микромицетов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Biological effects at low radiation doses – Models, Mechanisms and Uncertainties. Report to the General Assambley // 48 session of UNSCEAR. Vienna, 12 - 16 April, 1999.*
2. *Жданова Н.Н., Лашко Т.Н., Редчиц Т.И. и др. Взаимодействие почвенных микромицетов с "горячими" частицами в модельной системе // Микробиол. журн. - 1991. - Т. 53, № 4. - С. 9 - 17.*
3. *Жданова Н.Н., Редчиц Т.И., Крендясова В.Г. и др. // Микология и фитопатология. - 1994. - Т. 28, № 5. - С. 8 - 13.*
4. *Тугай Т.И., Жданова Н.Н., Редчиц Т.И. и др. Влияние ионизирующего излучения малой интенсивности на проявления реакции радиотропизма у грибов // Зб. наук. праць Ін-ту ядерних досл. - 2003. - № 2 (10) - С. 72 - 79.*
5. *Тугай Т.И., Желтоножский В.А., Садовников Л.В. Ответные реакции грибов на действие ионизирующего излучения // Там же. - 2004. - № 2 (13). - С. 132 - 138.*
6. *Zhdanova N.N., Tugay T., Dighton J. et al. Ionizing radiation attracts soil fungi // Mycol. Res. - 2004. - Vol. 108, No. 9. - P. 1089 - 1096.*
7. *Тугай Т.И., Жданова Н.Н., Желтоножский В.А. и др. Ответные реакции грибов, выделенных из различных по уровню радиоактивного загрязнения*
8. *Жданова Н.Н., Захарченко В.А., Тугай Т.И. и др. Грибное поражение помещений объекта «Укрытие» // Проблемы безпеки АЕС і Чорнобіля. - 2005. - Вип. 3, ч. 1. - С. 78 - 86.*
9. *Жданова Н.Н., Василевская А.И. Меланинсодержащие грибы в экстремальных условиях // К.: Наук. думка, 1988. - С. 150.*
10. *Butler M.J., Day A.W. Fungal melanins: a review // Can. J. Microbiol. - 1998. - Vol. 44. - P. 1115 - 1136.*
11. *Щерба В.В., Бабицкая В.Г., Курченко В.П. и др. Антиоксидантные свойства меланиновых пигментов грибоного происхождения // Приклад. биохимия и микробиология. - 2000. - Т. 36, № 5. - С. 569 - 574.*
12. *Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений // Л.: Агропромиздат, 1987. - С. 143 - 170.*
13. *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. - Vol. 72. - P. 248 - 254.*

ВПЛИВ ПРОЛОНГОВАНОЇ ДІЇ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА АКТИВНІСТЬ ПОЛІФЕНОЛОКСИДАЗИ ТА ТИРОЗИНАЗИ І НА СИНТЕЗ МЕЛАНІНУ В *HORMOCONIS RESINAE*

Т. І. Тугай, Н. М. Жданова, В. О. Желтоножський, Л. В. Садовніков,
М. Л. Садовнікова, Є. І. Бузарова

Вивчено вплив малих доз радіації на активність поліфенолоксидази та тирозинази і на синтез меланіну в штамів *Hormoconis resinae 61* та *801*, зразки яких виділено з об'єкта «Укриття» та чистої відносно радіонуклідів території відповідно. Виявлено значні зміни активності поліфенолоксидази та тирозинази в досліджуваних штамів, які залежали від фази росту грибів та наявності радіоадаптаційних властивостей. Під впливом опромінення спостерігалась активація синтезу меланіну, яка була значно більша у штаму, виділеного з об'єкта «Укриття».

**INFLUENCE LONG TIME IONIZING IRRADIATION ON POLYPHENOLOXIDASE
AND TYROSINASE ACTIVITY AND ON MELANIN SYNTHESIS *HORMOCONIS RESINAE*****T. I. Tugay, N. N. Zhdanova, V. A. Zheltonozhsky, L. V. Sadovnikov,
M. L. Sadovnikova, O. I. Buzarova**

Influence of small doses irradiation on *Hormoconis resinae* 61 and 801, which were isolated from inner location of Shelter and clean area accordingly polyphenoloxidase and tyrosinase activity and melanin synthesis were studied. Considerable changes of polyphenoloxidase and tyrosinase activity investigated strains were shown, which depended on fungi growth phase and the presence of radioadaptive properties. Melanin synthesis activation under exposure of radiation was shown predominantly of strain isolated from inner location of Shelter.

Поступила в редакцию 17.03.06,
после доработки – 17.08.06.