

А. В. Тугай<sup>1</sup>, Т. І. Тугай<sup>1</sup>, В. О. Желтоножський<sup>2</sup>, М. В. Желтоножська<sup>2</sup>,  
Л. В. Садовніков<sup>2</sup>, Г. В. Пономаренко<sup>1</sup>, О. Б. Поліщук<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ

<sup>2</sup> Інститут ядерних досліджень НАН України, Київ

<sup>3</sup> Національний технічний університет України

«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Київ

## РАДІАЛЬНИЙ РІСТ ТА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ У ТРЬОХ ПОСТРАДІАЦІЙНИХ ГЕНЕРАЦІЯХ *CLADOSPORIUM CLADOSPORIODES*

Було досліджено швидкість радіального росту та активність ферментів антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази (СОД), каталази, пероксидази – у трьох пострадіаційних генераціях двох штамів *Cladosporium cladosporioides*: контрольного та з радіоадаптивними властивостями. Установлено, що за параметром збільшення швидкості радіального росту гормезисний ефект більш виражений у пострадіаційних генераціях контрольного штаму, ніж у генераціях штаму з радіоадаптивними властивостями. Проте у ферментативній системі антиоксидантного захисту суттєвий гормезисний ефект виявлено у трьох пострадіаційних генераціях штаму з радіоадаптивними властивостями, який проявлявся у зростанні до 2 разів СОД активності та збільшенні пероксидазної активності у 4 рази.

**Ключові слова:** хронічне опромінення, пострадіаційні генерації *Cladosporium cladosporioides*, швидкість радіального росту, ферменти антиоксидантного захисту.

Через 30 років після Чорнобильської аварії актуальним залишилось дослідження віддалених наслідків дії хронічного опромінення на мікобіоту, яка є постійною й активною компонентою біогеоценозу. У попередніх дослідженнях було встановлено, що у 80 % мікроміцетів, що були виділені із зони відчуження ЧАЕС (далі - зона відчуження), тобто тривалий час знаходились в умовах хронічного опромінення, сформувались нові радіоадаптивні властивості, які полягали в позитивній реакції на дію великих доз опромінення, – позитивний радіотропізм, стимуляція гіфального росту [1 - 5]. Особливої уваги потребує дослідження адаптації до хронічного іонізуючого випромінювання в мікроміцетах – організмах з досить швидким ростом, що здатні утворювати кілька пострадіаційних генерацій упродовж одного року.

Вивчення характеру змін фізіолого-біохімічних властивостей у пострадіаційних генераціях опромінених мікроміцетів, ступеня їхнього прояву та стабільності дасть додаткову інформацію для прогнозів щодо віддалених наслідків дії хронічного опромінення на мікобіоту. Нові дані щодо адаптації пострадіаційних генерацій мікроміцетів матимуть незаперечну цінність для виявлення змін у цій важливій ланці біогеоценозу, що впливає, зокрема, на швидкість міграції радіонуклідів у ґрунті, і, відповідно, включення їх у трофічні ланцюги. Одним із видів мікроміцетів, який часто виділявся з ґрунту впродовж багаторічного моніторингу мікобіоти зони відчуження був *C. cladosporioides*, що здатен «розпушувати»

паливні частинки в модельних умовах [6]. На сьогоднішній день питання про наслідування цих властивостей у пострадіаційних генераціях мікроміцетів із радіоадаптивними властивостями, зокрема *C. cladosporioides*, є відкритим і потребує детального вивчення.

Метою роботи було вивчення швидкості радіального росту та активності ключових ферментів антиоксидантного захисту (каталази, пероксидази, СОД) у трьох пострадіаційних генераціях опромінених у модельних умовах батьківських штамів *C. cladosporioides* з радіоадаптивними властивостями та контрольного.

### Матеріали та методи

Об'єктами дослідження були два штами *C. cladosporioides* (Fr.) de Vries з колекції культур мікроміцетів відділу фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України: *C. cladosporioides* 4061 – контрольний, що був виділений із ґрунту в Київській області у 2003 р. за фонового рівня радіоактивного випромінювання ( $3,1 \cdot 10^{-9}$  Кл/кг), та *C. cladosporioides* 4 – опромінений, що був виділений з ґрунту 10-км зони ЧАЕС у 1986 р., загальною питомою активністю  $3,6 \cdot 10^5$  Бк/кг, та проявляв радіоадаптивні властивості.

Для проведення довгострокових досліджень у контрольованих умовах була застосована модифікована модельна установка, яка є прикладом комбінованого (лабораторно-польового) дослі-

© А. В. Тугай, Т. І. Тугай, В. О. Желтоножський, М. В. Желтоножська,  
Л. В. Садовніков, Г. В. Пономаренко, О. Б. Поліщук, 2017

дження, тобто в лабораторних умовах було імітовано хронічне опромінення низької інтенсивності ґрунту зони відчуження. Модельна установка являє собою короб прямокутної форми, укритий із внутрішніх боків свинцевим захистом товщиною 100 мм, в який поміщено пластикові емності з ґрунтом, що утворюють рівну площадку. Короб поміщали в термостат для проведення досліджень при температурі  $25 \pm 2$  °С. Ґрунт із 5-км зони відчуження слугував джерелом іонізуючого випромінювання, основним дозотворюючим елементом був  $^{137}\text{Cs}$  з рівнем забруднення  $3,06 \cdot 10^6$  Бк/м<sup>2</sup>, з відповідною енергією  $\gamma$ -квантів  $E_\gamma = 0,662$  МеВ. Експозиційна доза на висоті 10 см від поверхні становила  $7,7 \cdot 10^{-7}$  Кл/кг. На площадку встановлювали чашки Петрі з посіяними методом уколу на поживне середовище сусло-агар культури досліджуваних мікроміцетів для отримання їхніх опроміненних генерацій. Було проведено практичне дослідження  $\beta$ -спектрів іонізуючого опромінення при проходженні крізь досліджувані зразки (чашка Петрі з агаризованим середовищем). Установлено, що грибна біомаса опромінюється як  $\gamma$ -квантами з енергією 662 кеВ і рентгенівськими променями барію, так і комптонівськими електронами, а також електронами при розпаді  $^{90}\text{Y}$ . У даному випадку неможливо використати загальні формули для розрахунку доз, оскільки основна доза утворюється саме за рахунок вторинних електронів. Для даного випадку поглинання електронів дає приблизно в 300 разів більшу дозу, ніж  $\gamma$ -кванти. Використовуючи ці дані та припускаючи рівномірне накопичення у зразку грибної маси за весь період експозиції, було оцінено, що поглинена доза (ПД) становить 5-6 Гр на генерацію при опроміненні впродовж місяця. Маса сусло-агару становить 110 г, а маса пророслого міцелію за час дослідження – приблизно 3,5 - 4,0 г.

За допомогою цієї модельної установки було отримано три генерації опроміненних мікроміцетів від двох батьківських штамів: перша була відсівом з опроміненої впродовж 30 діб (при ПД = 6 Гр); друга – після відсіву першої генерації та опроміненні впродовж 30 діб (ПД = 6 Гр); третя – після такого ж опромінення при отриманні другої генерації (ПД = 6 Гр). Дослідження проводили в порівняльному аспекті відсіяних від опроміненних генерацій відповідних пострадіаційних генерацій із відсіяними від неопроміненних генерацій цих штамів, експерименти проводили одночасно. Кількісні показники кожного з досліджуваних параметрів в неопроміненних генераціях обох батьківських штамів приймали за 100 %. Фоновий рівень контрольних умов експерименту становив  $3,1 \cdot 10^{-9}$  Кл/кг.

Для дослідження швидкості радіального росту кожний штам культивували на двох агаризованих поживних середовищах різного складу: оптимальному (20 г/л глюкози) сусло-агарі (СА) та лімітованому за джерелом вуглецю голодному агарі (ГА), що дало змогу визначити ступінь адаптації досліджених штамів не тільки до хронічного опромінення, а й до дефіциту поживних речовин. Тривалість дослідження з визначення радіальної швидкості росту становила 25 - 28 діб.

При дослідженні особливостей функціонування антиоксидантної системи культивування всіх отриманих генерацій проводили при  $25 \pm 2$  °С на модифікованому рідкому середовищі Чапека, що містило 20 г/л глюкози. Засів проводили суспензією конідій у поживному середовищі, яку готували з розрахунку  $1 \cdot 10^6$  конідій/мл. Суспензію конідій вносили в кількості 10 % до об'єму поживного середовища (10 мл суспензії на 100 мл середовища). Біомасу мікроміцетів відділяли фільтруванням крізь капроновий фільтр із подальшим багаторазовим промиванням від залишків культуральної рідини дистильованою водою. Клітини руйнували розтиранням у рідкому азоті та суспендували в 0,15 М калій-фосфатному буфері (рН 7,0). Від залишків клітин звільнялись за допомогою центрифуги ОПн-8 при 8000 об/хв.

Критерієм оцінки ростових процесів був такий інтегральний показник для мікроскопічних грибів, як швидкість радіального росту ( $K_r$ ) [7]. СОД активності визначали за методом [8], каталазну – за методом [9]. Пероксидазну активність визначали з використанням прийнятої методики [10]. Кількість білка визначали за методом [11]. Швидкість радіального росту та ферментативну активність пострадіаційних генерацій виражали у відсотках по відношенню до відповідних величин в неопроміненних генераціях цих штамів, які приймали за 100 %.

Усі вимірювання проводили у трикратній повторюваності.

Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням програми Statistica 6.0. Статистичну значимість відмінностей середніх величин установлювали за допомогою t-критерію Стьюдента ( $p \leq 0,05$ ).

## Результати

При оцінці екологічних ризиків, які отримує біогеоценоз на величезних територіях, унаслідок дії хронічного опромінення найбільш актуальним у теперішній час є впровадження комбінованого (лабораторно-польового) підходу для дослідження [12]. Для хронічного опромінення

досліджених мікроміцетів у лабораторних умовах створено й використано своєрідний міні-полігон зони відчуження з відповідним комплексом радіонуклідів.

Дослідження було проведено в порівняльному аспекті у трьох опромінених у модельних умовах генераціях батьківського штаму *C. cladosporioides* 4 з радіоадаптивними властивостями та трьох генераціях контрольного штаму *C. cladosporioides* 4061, що таких властивостей не проявляв. За 100 % приймали швидкість радіального росту в

неопромінених генераціях цих же штамів.

При культивуванні на СА виявлено різний характер зміни швидкості радіального росту ( $K_r$ ) у пострадіаційних генераціях у *C. cladosporioides* 4061 та *C. cladosporioides* 4 (табл. 1).

У першій та другій пострадіаційних генераціях контрольного штаму *C. cladosporioides* 4061 при рості на СА було виявлено, що  $K_r$  практично не відрізнялась від величини в неопромінених генераціях та у 3 рази зростала у третій генерації.

Таблиця 1. Відносна швидкість радіального росту пострадіаційних генерацій штамів *C. cladosporioides* при культивуванні на двох поживних середовищах, %

Штам <i>C. cladosporioides</i>	Вихідна	Перша генерація	Друга генерація	Третя генерація
СА				
4061 (з ґрунту $3,1 \cdot 10^{-9}$ Кл/кг, не проявляв радіоадаптивних властивостей)	100 ± 5	106 ± 6	92 ± 5	301 ± 13*
4 (з ґрунту $3,6 \cdot 10^5$ Бк/кг, проявляв радіоадаптивні властивості)	100 ± 5	139 ± 7*	101 ± 5	123 ± 8*
ГА				
4061 (з ґрунту $3,1 \cdot 10^{-9}$ Кл/кг, не проявляв радіоадаптивних властивостей)	100 ± 5	144 ± 7*	64 ± 3*	64 ± 3*
4 (з ґрунту $3,6 \cdot 10^5$ Бк/кг, проявляв радіоадаптивні властивості)	100 ± 5	151 ± 8*	102 ± 5	109 ± 6

\* Статистично достовірні зміни при  $p \leq 0,05$ .

У пострадіаційних генераціях *C. cladosporioides* 4 з радіоадаптивними властивостями спостерігали інший характер змін  $K_r$  – незначну стимуляцію в першій та третій генераціях, яка не перевищувала 139 ± 7 % та 123 ± 8 % відповідно, та відсутність змін у другій.

За культивування на ГА зміни  $K_r$  у генераціях *C. cladosporioides* 4061 різноспрямовані – від збільшення до 144 ± 7 % у першій до зменшення до 64 ± 3 % у другій та третій. У генераціях *C. cladosporioides* 4 менш виражені зміни - виявлено зростання  $K_r$  у першій генерації до 151 ± 8 % та відсутність змін у другій та третій генераціях.

Отже, при рості на СА у третій пострадіаційній генерації контрольного штаму виявлено суттєвий гормезисний ефект – збільшення у 3 рази швидкості радіального росту, а в першій та третій пострадіаційних генераціях штаму з радіоадаптивними властивостями – підвищення  $K_r$  менше, ніж 1,4 рази. Достовірні зміни у швидкості радіального росту виявлено в усіх пострадіаційних

генераціях контрольного штаму і лише в одній генерації штаму з радіоадаптивними властивостями, що може свідчити про можливе наслідкування адаптивних властивостей досліджуваних мікроміцетів у процесі зміни генерацій, тобто на філогенетичному рівні.

Аналіз отриманих даних виявив, що як при культивуванні на СА, так і на ГА в пострадіаційних генераціях штаму з радіоадаптивними властивостями зміни швидкості радіального росту проявлялись в її достовірному підвищенні (гормезисний ефект). У пострадіаційних генераціях контрольного штаму, при культивуванні на СА, спостерігався виражений гормезисний ефект – збільшення швидкості радіального росту у третій генерації у 3 рази, а при культивуванні на ГА виявлено як збільшення в першій генерації, так і зменшення у другій та третій генераціях, що може свідчити про те, що після опромінення у трьох генераціях контрольного штаму ще не сформувався рівень адаптації до дії цього чинни-

ка, який реалізувався би чи у відсутності впливу, чи в активації ростових процесів, як це відбувається в пострадіаційних генераціях штаму з радіоадаптивними властивостями, виділеного із зони відчуження.

Виявлена активація росту в низці пострадіаційних генерацій може мати практичне значення при потенційному застосуванні цих штамів у технологіях, спрямованих на біоремедіацію забруднених об'єктів. Крім того, такі властивості опромінених генерацій *C. cladosporioides* виду відомого продуценту біологічно активних сполук, зокрема меланінів [13 - 17], можуть бути використані для розробки способів інтенсифікації синтезу меланінових пігментів.

Одним із шляхів пристосування організму до оксидативного стресу, що формується внаслідок утворення підвищеної кількості активних форм кисню за дії іонізуючого опромінення, є зміни у функціонуванні ферментативної складової системи антиоксидантного захисту. При визначенні СОД активності у трьох пострадіаційних генераціях контрольного штаму *C. cladosporioides* 4061 було виявлено як пригнічення, так і активацію

цього ферменту (рис. 1). Зміни СОД активності мали нелінійний характер, їхня амплітуда була від -15 до +25 %, по відношенню до цієї активності в неопромінених генераціях відповідно. У трьох пострадіаційних генераціях *C. cladosporioides* 4, на відміну від пострадіаційних генерацій контрольного штаму, спостерігали виражений гормезисний ефект – лінійне збільшення СОД активності від першої до третьої генерації, яке становило 130, 155 та 200 % відповідно.

Отримані дані свідчать про те, що в пострадіаційних генераціях батьківських штамів (із радіоадаптивними властивостями та контрольного) виявлено відмінності наслідування і при цьому більш виражений гормезисний ефект за збільшенням СОД активності виявлено в пострадіаційних генераціях штаму з радіоадаптивними властивостями.

При дисмутації супероксиданіону за дії СОД утворюється пероксид водню, який є субстратом для каталази, тому наступним кроком було дослідження каталазної активності у трьох пострадіаційних генераціях двох батьківських штамів *C. cladosporioides* (рис. 2).

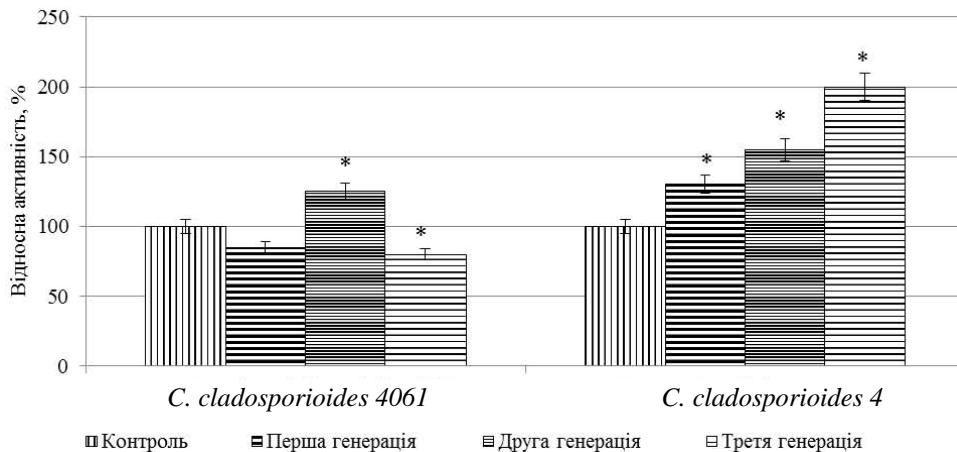


Рис. 1. СОД активність у трьох пострадіаційних генераціях штамів *C. cladosporioides* 4061 та *C. cladosporioides* 4. \* – статистично достовірні зміни при  $p \leq 0,05$ .

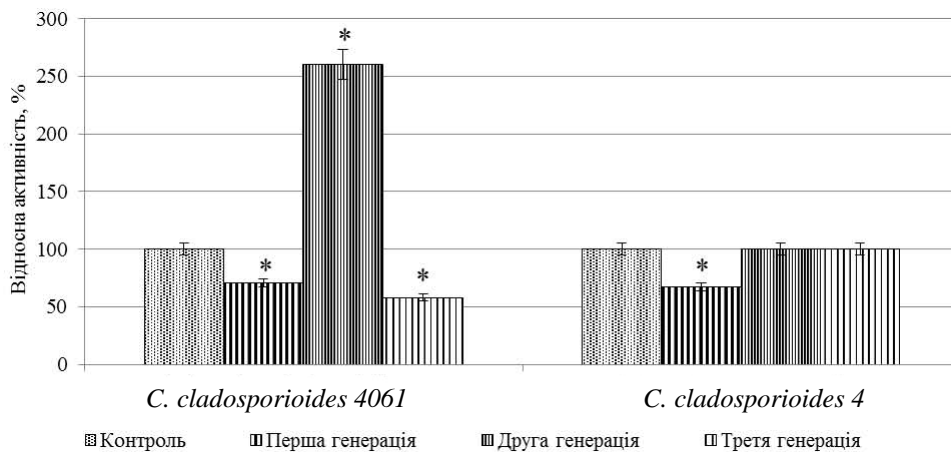


Рис. 2. Каталазна активність у трьох пострадіаційних генераціях штамів *C. cladosporioides* 4061 та *C. cladosporioides* 4. \* – статистично достовірні зміни при  $p \leq 0,05$ .

У пострадіаційних генераціях контрольного штаму *C. cladosporioides 4061* зміни каталазної активності мали нелінійний характер, подібний до змін СОД активності, проте амплітуда змін каталазної активності була вища, ніж у СОД активності. Найбільші зміни каталазної активності виявлено у другій генерації *C. cladosporioides 4061*, а величина збільшення активності цього ферменту становила 260 %, у той час як зростання СОД активності було вдвічі нижчим – не перевищувало 125 %.

Нами виявлено менш виражені зміни каталазної активності в пострадіаційних генераціях штаму з радіоадаптивними властивостями

*C. cladosporioides 4* на відміну від значних змін СОД активності. Каталазна активність зменшувалась на 30 % лише у першій генерації та залишалась незмінною у другій та третій генераціях по відношенню до неопромінених генерацій цього штаму. Слід зазначити, що характер змін каталазної та СОД активності в пострадіаційних генераціях цього штаму суттєво відрізнявся.

Пероксид водню, що є субстратом для каталази, також регулює пероксидазну активність, тому нами було проведено вивчення впливу іонізуючого опромінення на зміну активності цього ферменту в пострадіаційних генераціях батьківських штамів *C. cladosporioides* (рис. 3).

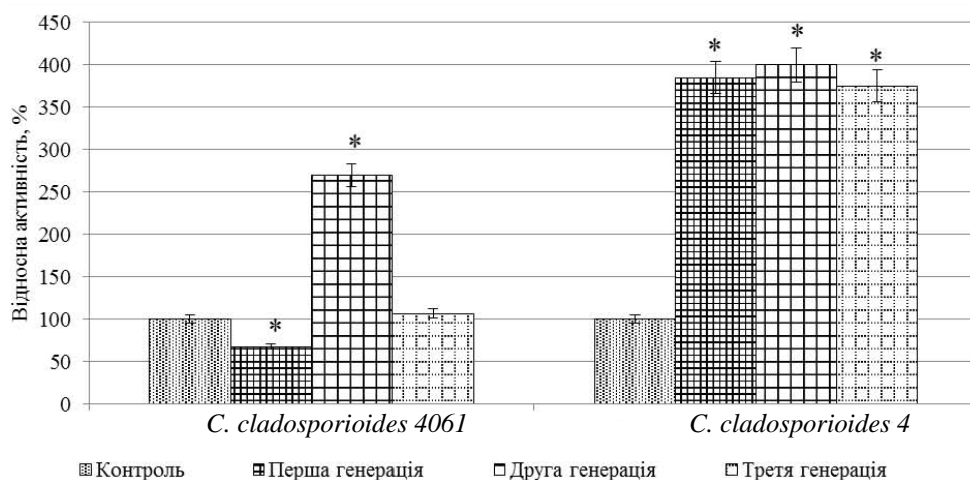


Рис. 3. Пероксидазна активність у трьох пострадіаційних генераціях штамів *C. cladosporioides 4061* та *C. cladosporioides 4*. \* – статистично достовірні зміни при  $p \leq 0,05$ .

У пострадіаційних генераціях контрольного штаму *C. cladosporioides 4061* характер змін пероксидазної активності був подібний до змін у СОД активності у цих генераціях. Зміни пероксидазної активності мали нелінійний характер зі зменшенням на 30 % у першій генерації, збільшенням (на 170 %) у другій генерації та практично досягали контрольного рівня у третій.

Установлено, що характер змін пероксидазної активності в пострадіаційних генераціях штаму з радіоадаптивними властивостями *C. cladosporioides 4* суттєво відрізнявся від змін у них каталазної активності. У всіх трьох пострадіаційних генераціях цього штаму виявлено збільшення пероксидазної активності майже до 400 %, тобто в генераціях цього штаму на фоні збільшення СОД активності спостерігається збільшення саме пероксидазної, а не каталазної активності.

Підвищення пероксидазної активності у грибів пов'язують зі збільшенням як фітопатогенних, так і патогенних для людини властивостей, а сприйнятливості до дії активних форм кисню (джерелом яких може бути іонізуюче випромінювання), зокрема пероксиду водню, є певним

маркером ступеня їхнього прояву [18]. Отримані дані мають важливе значення як з точки зору необхідності моніторингу вірулентної здатності цих видів в умовах підвищеного радіаційного фону, так і при використанні отриманих даних у підборі умов культивування для підвищення синтезу ними біологічно активних сполук.

Виходячи з того, що СОД, каталаза та пероксидаза пов'язані між собою ферменти, відповідно й особливості їхнього функціонування в системі антиоксидантного захисту в пострадіаційних генераціях контрольного штаму і штаму з радіоадаптивними властивостями пов'язані як зі змінами активності цих ферментів, так і зі змінами співвідношення їхньої активності (табл. 2).

У досліджених пострадіаційних генераціях контрольного штаму *C. cladosporioides 4061* співвідношення активностей каталаза/СОД суттєво відрізняються – величина їхнього співвідношення менша одиниці в першій та третій генераціях, а у другій генерації більш ніж у 2 рази перевищує величини співвідношення в неопромінених генераціях цього штаму. У пострадіаційних генераціях штаму з радіоадаптивними

Таблиця 2. Співвідношення активностей каталаза/СОД та пероксидаза/СОД у трьох пострадіаційних генераціях штамів *C. cladosporioides* 4061 та *C. cladosporioides* 4

Співвідношення ферментативних активностей	<i>C. cladosporioides</i> 4061			<i>C. cladosporioides</i> 4		
	Перша генерація	Друга генерація	Третя генерація	Перша генерація	Друга генерація	Третя генерація
Каталаза/СОД	0,84	2,03	0,73	0,52	0,65	0,5
Пероксидаза/СОД	0,8	2,16	1,34	2,96	2,58	1,88

властивостями виявлено сталі зміни у співвідношенні активностей цих ферментів – у всіх генераціях співвідношення близьке за величиною і становить 0,5 - 0,65 по відношенню до активності неопромінених генерацій цього штаму, що може свідчити про наявність адаптації до опромінення у генерацій батьківського штаму, яка може унаслідуватися в усіх досліджених генераціях. Виявлені величини співвідношення цих ферментів, за одним виключенням, нижче одиниці, що свідчить про те, що збільшення СОД активності не призводило до подібного збільшення каталазної активності.

Установлено, що зміни співвідношення активностей пероксидаза/СОД у пострадіаційних генераціях контрольного штаму *C. cladosporioides* мають нестабільний характер, відрізняються за спрямованістю – менше одиниці в першій, більш ніж 2,1 у другій і 1,34 у третій генераціях, що може свідчити про відсутність сформованої адаптації до хронічного опромінення генерацій як у вихідному штамі, так і в нащадків. У пострадіаційних генераціях штаму *C. cladosporioides* з радіоадаптивними властивостями співвідношення активностей пероксидаза/СОД було більш стабільним – його величина перевищувала значення в неопромінених генераціях у діапазоні від 2,9 до 1,8 раза. Слід зазначити, що співвідношення активностей пероксидаза/СОД перевищувало одиницю в кілька разів, що свідчить про те, що зростання пероксидазної активності суттєво перевищувало зростання СОД активності в досліджених генераціях за одним виключенням.

Виявлені закономірності суттєво відрізняються від отриманих у попередніх дослідженнях у пострадіаційних генераціях виду *Hormoconis resiniae* та *Aspergillus versicolor* [7, 19]. У трьох пострадіаційних генераціях штаму з радіоадаптивними властивостями *H. resiniae* 61 зміни співвідношення активностей каталаза /СОД та пероксидаза/СОД мали подібний характер і становили 2, 1,5, 3,75 та 2,7, 1,25, 3,1 відповідно. Інший характер змін цих співвідношень виявлено в пострадіаційних генераціях *A. versicolor*. У трьох пострадіаційних генераціях штаму з радіоадаптивними властивостями *A. versicolor* 99 зміни співвідношення активностей каталаза/СОД та пероксидаза/СОД становили 0,47, 1,3, 9,62 та

0,08, 2,69, 0,3 відповідно, тобто зміни в генераціях відрізнялись майже на порядок.

Отримані дані щодо активності ферментів антиоксидантного захисту та співвідношення активності взаємопов'язаних ферментів у пострадіаційних генераціях свідчать про суттєві зміни ферментативної складової антиоксидантної системи в досліджуваних мікроміцетах, що визначає її провідну роль у формуванні адаптації до дії опромінення, яке є джерелом надлишку активних форм кисню.

Детальний аналіз співвідношення активностей взаємопов'язаних ферментів антиоксидантного захисту в пострадіаційних генераціях штаму з радіоадаптивними властивостями дозволив виявити певні закономірності: співвідношення для каталаза/СОД нижче одиниці в усіх трьох генераціях та близьке за величиною (0,5 - 0,65); співвідношення пероксидаза/СОД вище одиниці і теж близьке за величиною в усіх генераціях (1,88 - 2,96); формування однотипової відповіді може бути свідченням наслідування радіоадапційних властивостей батьківського штаму. Співвідношення активностей цих ферментів у пострадіаційних генераціях контрольного штаму коливається в широких межах – каталаза/СОД 0,73 - 2,03, а пероксидаза/СОД 0,8 - 2,16. Його величина в різних генераціях має значення як нижче так і вище одиниці, що свідчить про додаткові порушення у скорегованій дії взаємопов'язаних ферментів, що може бути ознакою відсутності єдиної адаптивної стратегії в цих штамах та бути свідченням того, що впродовж трьох пострадіаційних генерацій не відбулося формування єдиної відповіді на дію опромінення у «нащадків» контрольного штаму.

Отже, аналіз результатів щодо змін у функціонуванні ферментативної складової антиоксидантної системи в пострадіаційних генераціях дослідженого виду *C. cladosporioides* та отриманих у попередніх дослідженнях даних щодо характеру змін у пострадіаційних генераціях *H. resiniae* та *A. versicolor* дозволяє стверджувати, що саме ця система відіграє значну роль в адаптації до хронічного опромінення в пострадіаційних генераціях мікроміцетів. Проте встановлено, що не існує універсальних механізмів адаптації ферментативної складової антиоксидантної си-



стеми в пострадіаційних генераціях різних видів мікроміцетів, а вони є унікальними і притаманними кожному окремому виду. При цьому пострадіаційним генераціям мікроміцетів притаманна значна варіабельність як у змінах активності ключових ферментів антиоксидантного захисту, так і у співвідношеннях активностей взаємопов'язаних ферментів. У пострадіаційних генераціях досліджених грибів реакції-відповіді на попереднє опромінення проявляються не тільки в певних змінах активності їхніх антиоксидантних ферментів, а й у варіабельності всієї ферментативної складової антиоксидантної системи в цілому, що свідчить про збільшення їхнього адаптаційного потенціалу по відношенню до хронічного опромінення.

Таким чином, у пострадіаційних генераціях контрольного штаму *C. cladosporioides* 4061 і у штаму *C. cladosporioides* 4 з радіоадаптивними властивостями виявлено нелінійний характер змін у швидкості радіального росту, гормезисний ефект (до 3 разів збільшення  $K_r$ ) більш виражений у пострадіаційних генераціях контрольного

штаму. Найбільший гормезисний ефект при дослідженні активностей ключових ферментів антиоксидантного захисту виявлено в усіх трьох пострадіаційних генераціях штаму з радіоадаптивними властивостями – збільшення СОД активності від 1,3 до 2 разів, яке супроводжувалось збільшенням пероксидазної активності в 4 рази. У пострадіаційних генераціях контрольного штаму гормезисний ефект значно менш виражений та проявлявся лише у одній генерації – максимальне збільшення СОД активності у 1,25 раза, а пероксидазної активності – у 2,7 раза. Отже, у пострадіаційних генераціях, як і в батьківському штамі *C. cladosporioides* із радіоадаптивними властивостями, проявляється здатність до суттєвого збільшення активності ферментів антиоксидантної системи, що сприяє потужному захисту клітин за дії підвищеної кількості активних форм кисню, що утворюються за дії хронічного опромінення і свідчить про одну з провідних ролей цієї системи захисту в реалізації адаптації досліджених пострадіаційних генерацій мікроміцетів.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Тугай Т.И., Жданова Н.Н., Редчиц Т.И. и др. Влияние ионизирующего излучения малой интенсивности на проявления реакции радиотропизма у грибов // 36. наук. праць Ін-ту ядерних дослідж. - 2003. - № 10 (2). - С. 72 - 79.
2. Tugay T.I., Zhdanova N.N., Zheltonozhsky V.A. et al. The influence of ionizing radiation on spore germination and emergent hyphal growth response reactions of microfungi // *Mycologia*. - 2006. - No. 4 (98). - P. 521 - 527.
3. Tugay T.I., Zhdanova N.N., Zheltonozhsky V.A. et al. Effects of ionizing radiation on the antioxidant system of microscopic fungi with radioadaptive properties found in the Chernobyl exclusion zone // *Health Physics – Radiation Safety Journal*. - 2011. - Vol. 101, No. 4. - P. 375 - 382.
4. Zhdanova N.N. Tugay T.I., Dighton J. et al. Ionizing radiation attracts soil fungi // *Mycol. Res.* - 2004. - Vol. 108, No. 9. - P. 1089 - 1096.
5. Жданова Н.Н., Захарченко В.А., Василевская А.И. и др. Микобиота Украинского Полесья. Последствия Чернобыльской катастрофы. - Киев: Наук. думка, 2013. - 383 с.
6. Жданова Н.Н., Захарченко В.А., Тугай Т.И. и др. Грибное поражение помещений объекта «Укрытие» // *Проблеми безпеки атомних електростанцій і Чорнобиля*. - 2005. - Вип. 3, ч. 1. - С. 78 - 86.
7. Кочкина Г.А., Мирчинк Е.Г., Кожевин П.А. и др. Радиальная скорость роста колоний грибов в связи с их экологией // *Микробиология*. - 1978. - № 5 (47). - С. 964 - 965.
8. 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. - № 2 (36). - С. 88 - 91.
9. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Методы определения активности каталазы // *Лабораторное дело*. - 1988. - № 1. - С. 16 - 19.
10. Thiyagarajan A., Saravanakumar K., Kaviyaran V. Optimizaton of extracellular peroxidase production from *Coprinus* sp. // *Int. J. of Science and Tech.* - 2008. - No. 7 (1). - P. 1 - 5.
11. 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. - No. 72. - P. 248 - 254.
12. Garnier-Laplace J., Alonzob F., Adam-Guillerminb C. Establishing relationships between environmental exposures to radionuclides and the consequences for wildlife: inferences and weight of evidence // *ICRP*. - 2013. - P. 295 - 303.
13. Plonka P. M., Grabacka M. Melanin synthesis in microorganisms - biotechnological and medical aspects // *Acta Biochim. Pol.* - 2006. - Vol. 53, No. 3. - P. 429 - 443.
14. Latge J.P., Bouziane H., Diaquin M. Ultrastructure and composition of the conidial wall of *Cladosporium cladosporioides* // *Can. J. Microbiol.* - 1988. - Vol. 34, No. 12. - P. 1325 - 1329.
15. Тугай Т.И., Тугай А.В. Патент на корисну модель № 71518 Україна, С 12 М 1/16. Спосіб скринінгу мікроміцетів, що продукують меланінові пігменти з високим рівнем антиоксидантної активності; заявник та власник Інститут мікробіології і віру-

- сології ім. Д. К. Заболотного НАН України - № 1201203395; заявл. 21.03.2012б; опубл. 10.07.2012; Бюл. № 13.
16. *Тугай Т.І., Тугай А.В., Желтоножський В.О. та ін.* Патент на корисну модель № 73184 Україна, С 12 N 1/14. Спосіб одержання меланінових пігментів; заявник та власник Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України - № 1201203789; заявл. 28.03.2012; опубл. 10.09.2012в, Бюл. № 17.
17. *Mir A.A., Park S-Y., Sadat Md. A. et al.* Systematic characterization of the peroxidase gene family provides new insights into fungal pathogenicity in *Magnaporthe oryzae* // *Scientific Reports*. - 2015. - Vol. 5. - Article number: 11831.
18. *Тугай А., Тугай Т., Лукашов Д.* Вплив хронічного опромінення на фізіолого-біохімічні властивості трьох опромінених «поколінь» *Aspergillus versicolor* // *Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка. Серія «Біологія»*. - 2015. - Т. 70, № 2. - С. 77 - 81.

**А. В. Тугай<sup>1</sup>, Т. І. Тугай<sup>1</sup>, В. А. Желтоножский<sup>2</sup>, М. В. Желтоножская<sup>2</sup>,  
Л. В. Садовников<sup>2</sup>, А. В. Пономаренко<sup>1</sup>, Е. Б. Полищук<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев*

<sup>2</sup> *Институт ядерных исследований НАН Украины, Киев*

<sup>3</sup> *Национальный технический университет Украины*

*«Киевский политехнический институт имени Игоря Сикорского», Киев*

### РАДИАЛЬНЫЙ РОСТ И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В ТРЕХ ПОСТРАДИАЦИОННЫХ ГЕНЕРАЦИЯХ *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES*

Была установлена скорость радиального роста и активность ферментов антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, пероксидазы – в трех пострadiaционных генерациях двух штаммов *Cladosporium cladosporioides*: контрольного и с радиоадаптивными свойствами. Установлено, что гормезисный эффект по параметру увеличения скорости радиального роста более выражен в пострadiaционных генерациях контрольного штамма, чем в генерациях штамма с радиоадаптивными свойствами. Однако в ферментативной системе антиоксидантной защиты значительный гормезисный эффект выявлен только у трех пострadiaционных генерациях штамма с радиоадаптивными свойствами, который проявлялся в увеличении до 2 раз СОД активности и до 4 раз пероксидазной активности.

*Ключевые слова:* хроническое облучение, пострadiaционные генерации *Cladosporium cladosporioides*, скорость радиального роста, ферменты антиоксидантной защиты.

**A. V. Tugay<sup>1</sup>, T. I. Tugay<sup>1</sup>, V. A. Zheltonozhsky<sup>2</sup>, M. V. Zheltonozhskaya<sup>2</sup>,  
L. V. Sadovnikov<sup>2</sup>, G. V. Ponomarenko<sup>1</sup>, O. B. Polischuk<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

<sup>2</sup> *Institute for Nuclear Research, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

<sup>3</sup> *National Technical University of Ukraine*

*«Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute», Kyiv*

### RADIAL GROWTH AND ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN THE THREE POST-RADIATION *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES* GENERATIONS

Radial growth rate and activity of antioxidant enzymes - superoxide dismutase (SOD), catalase and peroxidase – in three post-radiation generations of two strains of *Cladosporium cladosporioides*: control and with radioadaptive properties were investigated. It was established that hormesis effect by the increase rate of radial growth is more pronounced in post-radiation generations of the control strain than in the generations of strain with radioadaptive properties. However, in enzymatic antioxidant defense system significant hormesis effect is revealed only in three post-radiation generations' strain with radioadaptive properties, which appears in the increase up to 2 times in SOD activity and the peroxidase activity up to 4 times.

*Keywords:* chronic radiation, post-radiation generation of *Cladosporium cladosporioides*, adaptation, antioxidant enzymes.

#### REFERENCES

1. *Tugay T.I., Zhdanova N.N., Retchits T.I. et al.* Influence of low level ionizing irradiation on spread of radiotropism among fungi // *Zbirnyk naukovykh prats' Instytutu yadernykh doslidzhen'*. - 2003. - No. 10 (2). - P. 72 - 79. (Rus)
2. *Tugay T.I., Zhdanova N.N., Zheltonozhsky V.A. et al.* The influence of ionizing radiation on spore germination and emergent hyphal growth response reactions of microfungi // *Mycologia*. - 2006. - No. 4 (98). - P. 521 - 527.
3. *Tugay T.I., Zhdanova N.N., Zheltonozhsky V.A. et al.* Effects of ionizing radiation on the antioxidant system of microscopic fungi with radioadaptive properties found in the Chernobyl exclusion zone // *Health*



- Physics – Radiation Safety Journal. - 2011. - Vol. 101, No. 4. - P. 375 - 382.
4. Zhdanova N.N., Tugay T.I., Dighton J. et al. Ionizing radiation attracts soil fungi // *Mycol. Res.* - 2004. - Vol. 108, No. 9. - P. 1089 - 1096.
  5. Zhdanova N.N., Zakharchenko V.A., Vasilevskaya A.I. et al. Mycobiota Ukrainian Polesie. The consequences of the Chernobyl accident // Kyiv: Naukova Dumka, 2013. - 383 p. (Rus)
  6. Zhdanova N.N., Zakharchenko V.A., Tugay T.I. et al. Fungi lesion of inner locations object shelter // *Problemy bezpeky atomnykh elektrostantsii i Chornobylya.* - 2005. - Iss. 3, p. 1. - P. 78 - 86. (Rus)
  7. Kochkina G.A., Mirchink T.G., Kozhevnik P.A. et al. Radial growth rate of fungal colonies in respect of their ecology // *Mikrobiologiya.* - 1978. - No. 5 (47). - P. 964 - 965. (Rus)
  8. Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Kovaleva Zh.V. // *Voprosy meditsinskoj khimii.* - 1990. - No. 2 (36). - P. 88 - 91. (Rus)
  9. Koroliuk M.A., Ivanova L.I., Maiorova I.G., Tokarev V.E. Methods of catalase activity determining // *Laboratornoe delo.* - 1988. - No. 1. - P. 16 - 19. (Rus)
  10. Thiagarajan A., Saravanakumar K., Kaviyarasan V. Optimizatoin of extracellular peroxidase production from *Coprinus* sp. // *Int. J. of Science and Tech.* - 2008. - No.7 (1). - P. 1 - 5.
  11. 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. - No. 72. - P. 248 - 254.
  12. Garnier-Laplace J., Alonzob F., Adam-Guillerminb C. Establishing relationships between environmental exposures to radionuclides and the consequences for wildlife: inferences and weight of evidence // *ICRP.* - 2013. - P. 295 - 303.
  13. Plonka P. M., Grabacka M. Melanin synthesis in microorganisms - biotechnological and medical aspects // *Acta Biochim. Pol.* - 2006. - Vol. 53, No. 3. - P. 429 - 443.
  14. Latge J. P., Bouziane H., Diaquin M. Ultrastructure and composition of the conidial wall of *Cladosporium cladosporioides* // *Can. J. Microbiol.* - 1988. - Vol. 34, No. 12. - P. 1325 - 1329.
  15. Tugay T.I., Tugay A.V. Patent for Utility Model No. 71518 Ukraine, C 12 M 1/16. Micromycetes screening method for producing melanin pigments with high antioxidant activity; the applicant and the owner of the Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine - No. u 201203395; applicant. 21.03.2012; published 10.07.20126, bulletin No. 13. (Ukr)
  16. Tugay T.I., Tugay A.V., Zheltonozhsky V.A. et al. Patent for Utility Model No. 73184 Ukraine, C 12 N 1/14. A method for producing melanin pigments; the applicant and the owner of the Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine - No. u 201203789; applicant. 28.03.2012; published 10.09.2012B, bulletin. No. 7. (Ukr)
  17. Mir A. A., Park S-Y., Sadat Md. A. et al. Systematic characterization of the peroxidase gene family provides new insights into fungal pathogenicity in *Magnaporthe oryzae* // *Scientific Reports.* - 2015. - Vol. 5. - Article number: 11831.
  18. Tugay A., Tugay T., Lukashov D. Influence of low chronic exposure on physiological and biochemical properties of three irradiated generations *Aspergillus versicolor* // *Visnyk Kyivskogo natsional'nogo universytetu imeni Tarasa Shevchenka. Seriya "Biologiya".* - 2015. - Vol. 70, No. 2. - P. 77 - 81. (Ukr)

Надійшла 15.11.2016

Received 15.11.2016