

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»

Факультет природничих наук
Кафедра біології

Кваліфікаційна робота
освітній ступінь – бакалавр

на тему **«ХАРАКТЕРИСТИКА РІВНЯ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ
ЛІПІДІВ У ШТАМІВ *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES* З
РАДІОТРОПІЗМОМ»**

Виконала: студентка 4-го року навчання
спеціальності 091— біологія
Боковенко Лариса Ігорівна

Керівники
Тугай Т.І.,
доктор біологічних наук, старший наук.
спів.
Інституту мікробіології та вірусології ім.
Д.К. Заболотного НАН України
Фуртат І.М.,
кандидат біологічних наук, доцент
кафедри біології НаУКМА
Рецензент
Білявська Л.О.,
доктор біологічних наук, провідний наук.
спів. Інституту мікробіології та
вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН
України

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК
Пасічник Т.В.
«__» червня 20__ року

Київ – 2020

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ _____	4
ВСТУП _____	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ _____	7
1.1. Вплив хронічного опромінення на біологічні властивості мікроорганізмів _____	7
1.1.1 Характеристика хронічного опромінення _____	7
1.1.2 Вплив хронічного опромінення на мікроскопічні гриби _____	8
1.1.3 . Меланінові пігменти та їх роль в життєдіяльності мікроскопічних грибів за хронічного опромінення _____	9
1.2. Роль активних форм кисню в мікроорганізмів за хронічного опромінення _____	12
1.2.1. Характеристика активних форм кисню та умови за яких виникають в клітині _____	12
1.2.2. Дія активних форм кисню на мікроорганізми _____	13
1.3. Роль систем окисного стресу у захисті клітин мікроорганізмів від хронічного опромінення _____	14
1.3.1. Окисний стрес системи та її роль у захисті мікроорганізмів за хронічного опромінення _____	14
1.3.2. Прооксидантна система та її роль у захисті від хронічного опромінення _____	15
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА _____	19
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ _____	19
2.1. Характеристика штамів, використаних у дослідженні та умови їхнього культивування _____	19
2.2. Реактиви, розчини та середовище культивування, які було використано у роботі _____	20
2.3. Визначення рівня продуктів перекисного окиснення _____	

ліпідів _____	21
2.3.1. Визначення вмісту дієнових кон'югатів у гомогенатах дослідних штамів _____	20
2.3.2. Визначення вмісту малонового диальдегіду в міцелії дослідних штамів _____	21
2.4. Визначення впливу хронічного опромінення на дослідні штами грибів _____	22
2.5. Статистична обробка результатів _____	23
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ _____	25
3.1. Дослідження продуктів перекисного окиснення ліпідів у штамів <i>Cladosporium cladosporioides</i> 4 та 4061 як механізму адаптації до хронічного опромінення _____	25
3.2. Реакція прооксидантної системи штамів <i>Cladosporium cladosporioides</i> за впливу хронічного опромінення _____	31
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ _____	39
ВИСНОВКИ _____	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ _____	42
ДОДАТКИ _____	

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

RNS	–	<u>а</u> ктивні <u>ф</u> орми <u>а</u> зоту (<u>R</u> eactive <u>n</u> itrogen <u>s</u> pecies)
АФК	–	<u>а</u> ктивні <u>ф</u> орми <u>к</u> исню (<u>R</u> eactive <u>o</u> xуgen <u>s</u> pecies)
ДК	–	<u>д</u> ієнові <u>к</u> он'югати
МДА	–	<u>м</u> алоновий <u>д</u> иальдегід
ПНЖК	–	<u>п</u> оліненасичені <u>ж</u> ирні <u>к</u> ислоти
ПОЛ	–	<u>п</u> ерекисне <u>о</u> киснення <u>л</u> іпідів

ВСТУП

Вплив хронічного опромінення на еукаріотичні організми вивчається протягом тривалого часу, але ще досі остаточно не з'ясовані процеси, які відбуваються за такої дії. В зв'язку з аварією на Чорнобильській АЕС, що сталася в 1986 році розпочалося активне дослідження впливу хронічного опромінення на мікроорганізми. Так, ще у 1986 році в Чорнобильській зоні відчуження було виділено значну кількість мікроорганізмів, які зазнавали впливу такого опромінення [1]. Це дозволило з'ясувати нові адаптивні механізми та нові властивості цих організмів. Зокрема, Dighton та співавтори з'ясували [1], що представники виду *C. cladosporioides*, виділені в Чорнобильській зоні відчуження, характеризувалися унікальними радіоадаптивними властивостями, зумовленими їхньою здатністю реагувати на ефекти іонізуючого хронічного опромінення. Також активно вивчається роль антиоксидантної системи у різних мікроорганізмів від хронічного опромінення [2, 3]. Зокрема, було досліджено захисну роль меланінових пігментів у мікроорганізмів за іонізуючого опромінення [4].

Відомо також, що за хронічного опромінення клітин може зростати кількість активних форм кисню. Для захисту від їх впливу у мікроміцетів активується система антиоксидантного захисту, зокрема комплекс ферментів (супероксид-дисмутаза, каталаза, глутатіон пероксидаза, тіоредоксин) [5]. Враховуючи те, що перекисне окиснення ліпідів це частина прооксидантної системи у міцеліальних грибів, а наявність продуктів ПОЛ у організмі свідчить про реакцію його на дію несприятливих умов існування, то врівноваження цих систем є важливе для організму. Robertson та співавтори показали [6], що опромінення низькими дозами випромінювання супроводжується підвищенням виживаності клітин дріжджів та пов'язали це явище зі зниженням рівня активних форм кисню.

З огляду на вище викладене, метою роботи було вивчення стану окремих ланок прооксидантної системи штамів *Cladosporium cladosporioides* 4061 та 4 за впливу хронічного опромінення.

Для досягнення мети роботи необхідно було вирішити такі завдання:

- 1) визначити рівень дієнових кон'югатів і малонового диальдегіду у вихідних штамів *C. cladosporioides* 4061 та 4 на різних фазах розвитку культури;
- 2) порівняти рівень дієнових кон'югатів на різних фазах росту у варіантів штамів *C. cladosporioides* 4061 та 4 за дії хронічного опромінення та без нього;
- 3) встановити рівень малонового диальдегіду на різних фазах культивування; у варіантів штамів *C. cladosporioides* 4061 і 4 та порівняти його у адаптованих до хронічного опромінення та неадаптованих культур.

Експериментальну частину роботи було виконано у відділі фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України під керівництвом д.б.н., ст.н.с. Тугай Т.І.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Вплив хронічного опромінення на біологічні властивості мікроорганізмів

1.1.1. Характеристика хронічного опромінення. Іонізуюче випромінювання – будь-яке випромінювання, взаємодія якого із середовищем приводить до утворення електричних зарядів різних знаків. Наразі розрізняють такі види випромінювань: α -, β -випромінювання, фотонне випромінювання, яке включає рентгенівське і γ -випромінювання. Такі типи випромінювання викликають іонізацію, але залежно від виду випромінювання мають різний енергетичний рівень і можуть проникати в клітини в різному ступені [7] Види іонізуючого випромінювання та основні поняття дозиметрії - Енергетика: історія, сучасність і майбутнє [8].

Залежно від часу та дози опромінення розрізняють гостре та хронічне опромінення. Дози розраховуються по-різному враховуючи, який розмір опроміненої ділянки, де вона розташована, яка група зазнала опромінювання і протягом якого часу. Гостре це опромінення великими дозами за період короткого проміжку часу. За γ -випромінювання спостерігається більше біологічне ураження. Так, наприклад, еукаріотичні організми втрачають здатність до розмноження, можливі морфо- та фізіологічні зміни, а також біохімічні, такі як підвищення рівня активних форм кисню, які призводять до зміни складу цитоплазматичної мембрани і можуть призвести до загибелі клітин [9].

Хронічне опромінення це систематичне опромінення дозами, що перевищують гранично допустимі (ГДД). Так, наприклад, для відкритої місцевості ГДД становить 8-12 мкР/год. За хронічного опромінення, аналогічно до гострого, підвищується кількість активних форм кисню, змінюються біохімічні властивості еукаріотичних організмів, умови

культивування мікроорганізмів. Наприклад, Дадачова та співавтори [4] показали, що внаслідок хронічного опромінення у мікроскопічних грибів з'являється здатність до спрямованого росту до джерела випромінювання. Тому, біологічні ефекти за низьких доз хронічного опромінення, є важливими для оцінки впливу на організм. [10]. Так, наприклад в рослинних організмах виділяють три рівня ендogenousного захисту за γ -опромінення для збереження цілісності клітин [11]. Перший рівень захисту організму забезпечують чинники, які інактивують активні форми кисню (АФК). Другий рівень передбачає функціонування системи репарації молекул ДНК, яка відповідає за відновлення пошкоджених молекул ДНК. Клітинний апоптоз належить до третього рівня захисту, за якого здійснюється запрограмована загибель клітин, в яких не відбулась репарація пошкоджених молекул ДНК [11].

1.1.2. Вплив хронічного опромінення на мікроскопічні гриби. У Чорнобильській зоні відчуження, де були проведені дослідження міцеліальних грибів, Dighton та співавтори [1] за хронічного опромінення виділяють два типи середовища існування мікроміцетів. По-перше, це пігментовані мікроскопічні гриби, що зазнають впливу постійного опромінення та колонізують стінки пошкодженого реактора в Чорнобилі. По-друге, міцеліальні гриби, здатні до синтезу меланінових пігментів, що присутні у воді басейну охолодження реактора. Ця вода циркулює через ядро ядерного реактора для охолодження і є надзвичайно радіоактивною. Вода в таких басейнах містить велику кількість мікроорганізмів. Аналіз мікробіоти цієї води засвідчує, що до її складу входять мікроорганізми, резистентні до дії високих доз випромінювання. У цих мікроорганізмів спостерігається підвищення активності каталази та нуклеази [1].

Dadachova та Casadevall показали [4, 1], що радіотолерантні міцеліальні гриби, набували здатності рости спрямовано до джерела випромінювання, та розкладати так звані «гарячі частинки»—шматочки графіту із зруйнованого реактора №4. Останні забруднені різними радіонуклідами з довгим періодом напіврозпаду. Автори назвали здатність росту до джерела випромінювання

явище радіотропізму. Було показано, що як β -, так і γ -випромінювання сприяють спрямованому росту грибів, які було виділено як із забруднених, так і чистих середовищ існування [4, 1].

У радіочутливих мікроміцетів за хронічного опромінення, відбувається підвищення рівня активних форм кисню, яке призводить до змін в ДНК, білках та ліпідів. Також за хронічного опромінення зростає частота мутацій в еукаріотичних організмів [12].

1.1.3. Меланінові пігменти та їх роль в життєдіяльності мікроскопічних грибів за хронічного опромінення. Меланіни – пігменти чорного або темно-коричневого кольору. Це гідрофобні сполуки з молекулярною масою 318,3 г / моль. Меланіни за будовою поділяють на еумеланіни, феомеланіни, та алломеллаліни, залежно від замісників (рис. 1.1.) [13]. Всі це гетерогенні поліфеноли, які утворюють структури вищого порядку з унікальними фізико-хімічними властивостями, включаючи широкосмугове оптичне поглинання, парамагнетизм, транспорт заряду та чудову структурну стійкість [14].

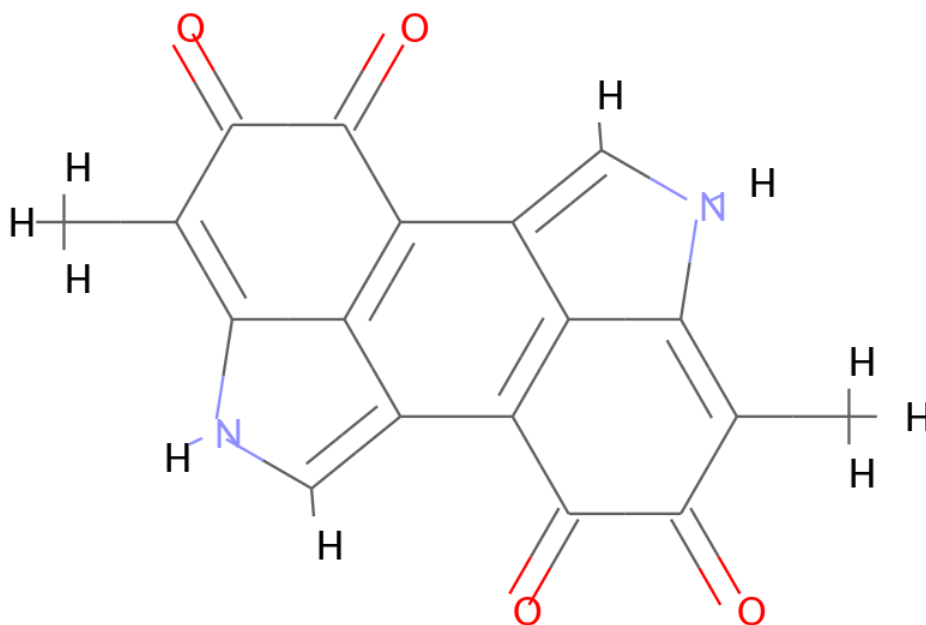


Рис.1.1. Структурна формула меланіну [15].

У міцеліальних грибів вони синтезуються окисною полімеризацією фенольних та індолінових сполук. Міцеліальні гриби для синтезу меланіну використовують такі попередники, як ацетил со-А або малоніл со-А

(рис. 1.2.). Переважна більшість мікроміцетів синтезують меланін за допомогою дигідроксинафталінового шляху (**D**i**h**ydroxyn**a**phthalene, DHN). У цьому шляху молекулою попередником меланіну є ацетил со-А або малоніл со-А. Перший етап дигідроксинафталінового шляху розпочинається полікетидною синтазою (**p**oly**k**etide **s**ynthase,PKS). Після синтезу 1,3,6,8 тетрагідроксинафталіну (**t**etra**h**ydroxyn**a**phthalene THN) серії послідовних реакцій відновлення та дегідратації утворюються проміжні продукти: сциталон, 1,3,8- тригідроксинафталін, вермелон та 1,8-дигідроксинафталін. Полімеризація DHN призводить до утворення меланіну [16,17].

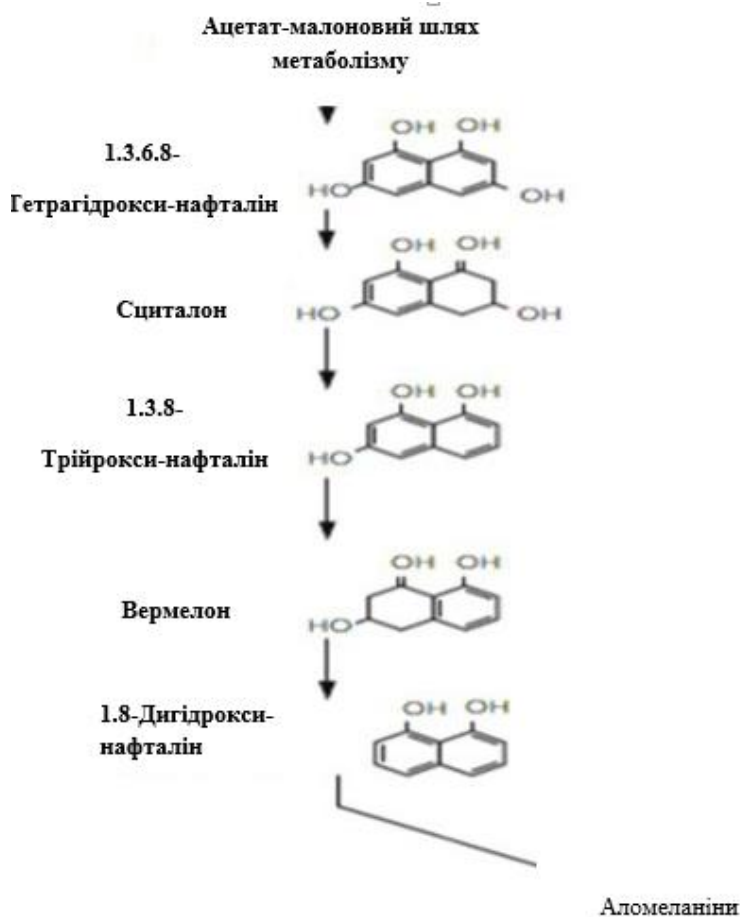


Рис. 1.2. Схема синтезу меланіна дигідроксинафталіновим шляхом [18]

Меланіну притаманні низка біологічних властивостей, зокрема антиоксидантні, радіопротекторні, терморегуляційні, хіміопротекторні, протипухлинні, противірусні, протимікробні, імуностимулювальні та

протизапальні. Окрім хімічної стійкості, меланін збільшує міцність і жорсткість клітини, в клітинній стінці, де він може зшиватися з різними макромолекулами (рис. 1.3). Вміст цих пігментів в клітинній стінці впливає на проникність та сили тургору клітин. Окрім того, однією з властивостей цих пігментів є їхня здатність до поглинання всіх видів електромагнітного випромінювання. Наявність їх також захищає клітину від хімічної деградації, такої як гідроліз кислоти та токсичність важких металів (тобто нітрат срібла) [19]. Dadachova та Casadevall показали [4], що опромінений меланін, порівняно з неопроміненим, виявляв у 4 рази збільшення його здатності знижувати НАДН.

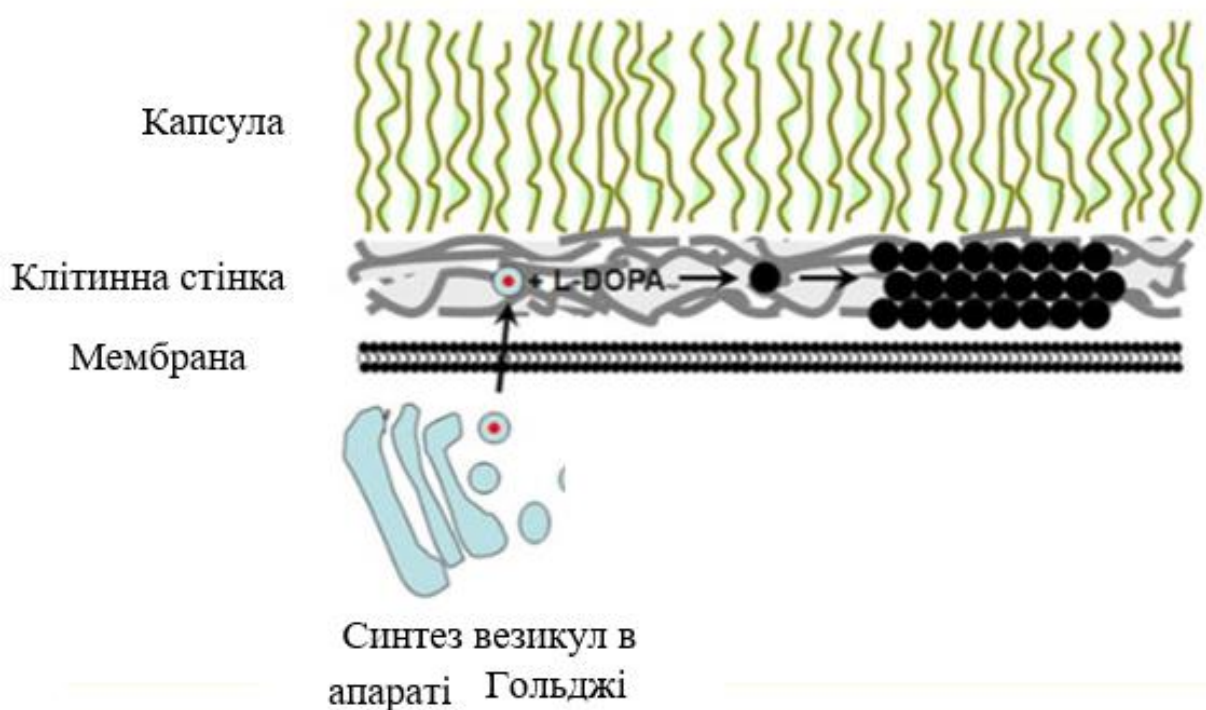


Рис. 1.3. Клітинна стінка мікроміцетів [19].

1.2. Роль активних форм кисню в мікроорганізмів за хронічного опромінення

1.2.1. Характеристика активних форм кисню та умови за яких виникають в клітині. В усіх аеробних організмів постійно утворюються активні форми кисню (АФК) у відповідь на ендогенні та екзогенні чинники. АФК - одні з найпоширеніших окиснювачів у клітинах, включає O_2^- , вільні радикали та перекиси (як органічні, так неорганічні)[20]. Активні форми кисню (**R**eactive **o**xugen **s**pecies, ROS) утворюються в результаті стресу. Надмірне утворення АФК може призвести до змін вмісту клітин та процесів метаболізму. Вільні радикали, які утворюються під впливом іонізуючого опромінення, а також можуть виникати під дією тепла, характеризуються високою хімічною активністю. Ця активність обумовлена наявністю неспарених електронів. Такі радикали мають малу тривалість життя, що вимірюється в мілісекундах. Три основні активні форми кисню, які мають фізіологічне значення це аніон супероксиду ($O_2^{\cdot -}$), гідроксо-радикал ($\cdot OH$) та перекис водню (H_2O_2) (табл 1.1) [21,22, 23].

Таблиця. 1.1

Активні форми кисню [21]

Оксид	Хімічна формула	рівняння реакції
Супероксид-аніон	O_2^-	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^{\cdot -} + H^+$ $2O_2^{\cdot -} + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
Перекис водню	H_2O_2	$Гіпоксантин + H_2O + O_2 \rightleftharpoons Ксантин + H_2O_2$ $Ксантин + H_2O + O_2 \rightleftharpoons \text{сечова кислота} + H_2O$
Гідроксильний радикал	$\cdot OH$	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$
Гіпохлорна кислота	$HOCl$	$H_2O + Cl^- \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$
Пероксильні радикали	$ROO^{\cdot}$	$R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}$
Гідропероксильний радикал	$HOO^{\cdot}$	$O_2^{\cdot -} + H_2O \rightleftharpoons HOO^{\cdot} + OH^-$

Активні форми кисню також можуть впливати на цитоплазматичну мембрану мікроміцетів завдяки високого вмісту поліненасичених жирних кислот (ПНЖК). ПНЖК найбільш сприйнятливі до дії АФК. Таке пошкодження називається перекисним окисненням ліпідів (ПОЛ). За процесу ПОЛ оксидні радикали, такі як пероксильні та гідроксильні, видаляють електрони з ліпідів і згодом утворюють реакційноздатні проміжні продукти такі, як алкільні, алкоксильні, пероксильні радикали. Ці продукти можуть зазнавати подальших реакцій та утворювати первинні, вторинні та кінцеві метаболіти. За стресових умов, коли відбувається підвищення рівня ROS в клітині, за перекисного окиснення ліпідів, може відбуватися пошкодження фосфоліпідів та запрограмована загибель клітин [23].

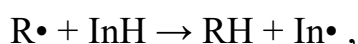
1.2.2. Дія активних форм кисню на мікроорганізми. Перекисне окиснення ліпідів найчастіше утворюються тоді, коли активні форми кисню, такі як $\text{OH} \cdot$ і HO_2 , взаємодіють з атомом водню. [24]. У всіх процесах, де задіяний кисень, як вторинні продукти постійно утворюються АФК. Окрім активних форм кисню, клітинні метаболіти, утворені екзогенним / ендогенним азотом, можуть утворювати активні форми азоту (**Reactive nitrogen species, RNS**), які включають: оксид азоту, пероксинітрит та нітрит / нітрат. Два типи активних форм, такі як, ROS і RNS, можуть діяти разом, генеруючи так званий нітрозоативний стрес ROS / RNS [25]. Вільні радикали можуть викликати ланцюгові реакції перекисного окиснення ліпідів шляхом відщеплення атома водню від карбону бічного ланцюга.. Потім ліпідний радикал реагує з киснем, утворюючи пероксильний радикал, який ініціює ланцюгову реакцію і перетворює поліненасичені жирні кислоти в гідропероксили ліпідів. Ліпідні гідропероксили дуже нестійкі і легко розкладаються на вторинні продукти, такі як альдегіди (4-гідрокси-2,3-нонанал) та малоновий діальдегід (МДА) (рис. [21, 23,26].

Робертсон та його співавтори, використовуючи чорні дріжджі *Wangiella dermatitidis*, показали[6], іонізуюче випромінювання посилює ріст клітин за рахунок збільшення клітинного поділу та розміру клітин. Вони

продемонстрували, що тривале опромінення низькими дозами випромінювання значно збільшило живучість як дикого типу, так і мутанта *wdpks1*, що було пов'язано зі зниженням активних форм кисню.

1.3. Роль систем окисного стресу у захисті клітин мікроорганізмів від хронічного опромінення

1.3.1 Окисний стрес та його роль у захисті мікроорганізмів від впливу хронічного опромінення. Для запобігання надмірного накопичення активних форм кисню та інтенсивності деструктивних окисних процесів в еукаріотичному організмі є складний комплекс захисних антиокисних систем, як ферментативної і неферментативної природи. Ці системи можуть здійснювати детоксикацію АФК. У зв'язку з тим, що гідроксильний радикал $\text{OH} \cdot$ найактивніша форма кисню, дія захисних систем фактично спрямована (або безпосередньо, чи опосередковано) на знешкодження його в клітинах. Роль ендогенних антиоксидантних систем важлива в нормальному клітинному метаболізмі. Одним із механізмів окисного стресу низькомолекулярних оксидів є перехоплення активних вільних радикалів з утворенням малоактивного радикалу антиоксиданту:



де $\text{R} \cdot$ – будь-який активний вільний радикал ($\text{H} \cdot$, $\text{OH} \cdot$, $\text{HO}_2 \cdot$, $\text{L} \cdot$, $\text{LO} \cdot$, $\text{LOO} \cdot$ и др.), InH – антиоксидант (відновна форма), $\text{In} \cdot$ – радикал оксида (малоактивний) [11].

Регуляція відновного та окисного (окисно-відновного) стану є критичним для життєздатності клітин. Різні типи внутрішньоклітинних активних форм кисню можуть бути пошкоджені антиоксидантними ферментами та неферментативними антиоксидантами. Мікроміцети розвинули складні ферментні системи, що складають основні частини антиоксидантної системи, включаючи сімейства супероксиддисмутази, каталази, пероксидази, тіоредоксини та інші (рис. 1.4.) [27,21, 28]



Рис. 1.4. Антиоксидантна система захищає клітину від індукованої ROS перекисного окиснення ліпідів [28].

1.3.2. Прооксидантна система та її роль у захисті мікроорганізмів від хронічного опромінення. Загальний процес перекисного окиснення ліпідів складається з трьох етапів: ініціації, розмноження та припинення. На етапі ініціювання перекисного окиснення ліпідів прооксиданти, такі як гідроксильний радикал, відщеплює алільний водень, утворюючи ліпідний радикал, орієнтований на вуглець. Карбоновий радикал має властивість до стабілізації молекулярної перебудови, утворюючи кон'югований дієн (перший етап). Якщо відбулося поширення, то ліпідний радикал швидко реагує з киснем, утворюючи ліпідний перокси радикал (стадія 2), який

відщеплює водень з іншої молекули ліпідів, утворюючи новий (що продовжує ланцюгову реакцію) та гідропероксид ліпідів (LOOH) (стадія 3). На 4 етапі відбувається припинення реакції, антиоксиданти, віддають атом водню і утворюють відповідний антиоксидант (рис. 1.5) [24, 29].

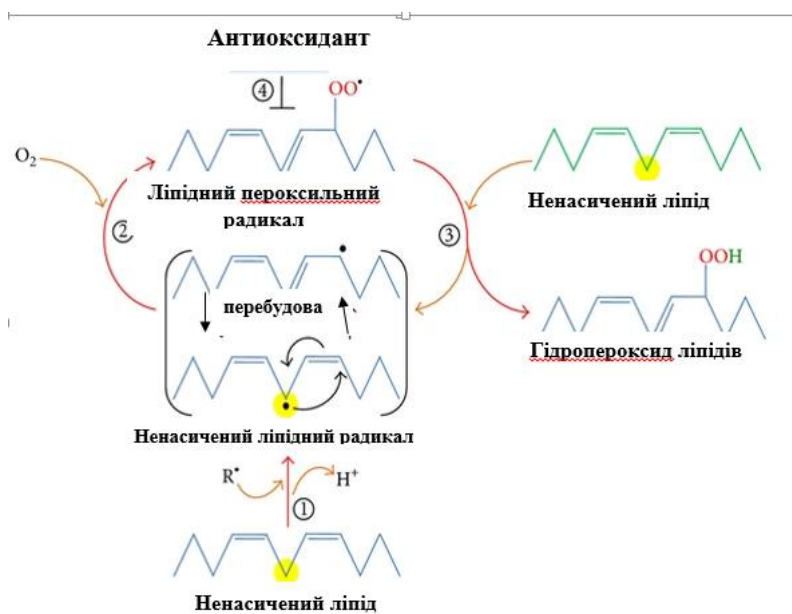


Рис 1.5. Процес перекисного окиснення ліпідів [30].

При перекисному окисненні поліненасичених жирних кислот, першим етапом його є видалення атому водню з карбону, з'єднуючи два подвійні зв'язки. Слабкий зв'язок $C-H$ і стабільність радикалу обумовлюють селективність при видаленні атома водню. Ця резонансна стабілізована пі-система дозволяє ліпіді ізомеризуватися у більш термодинамічно стабільний ізомер, утворюючи кон'югований дієн (1Z, 3E), який реагує з молекулярним киснем, утворюючи пероксид ліпідів (рис. 1.6.). [31]

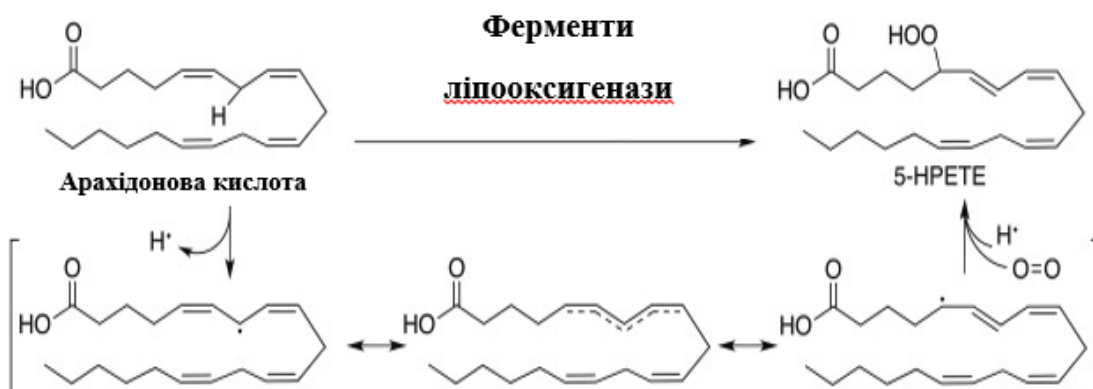


Рис. 1.6. Загальний механізм окиснення поліненасичених жирних кислот [31].

Таким чином, перекисне окиснення ліпідів принципово відрізняється від інших форм ушкодження вільних радикалів тим, що це самостійний процес.[32]. ПОЛ небезпечне не тільки тому, що пошкоджені ліпіди порушують структуру та функції мембрани, а й тому, що під час цього процесу утворюються потенційно мутагенні та побічні продукти (рис. 1.7). Одним з таких продуктів є високореактивна карбонільна сполука, малоновий диальдегід (МДА), що може реагувати з дезоксиаденозином та дезоксигуанозином у ДНК та утворювати ДНК-аддукти [23].

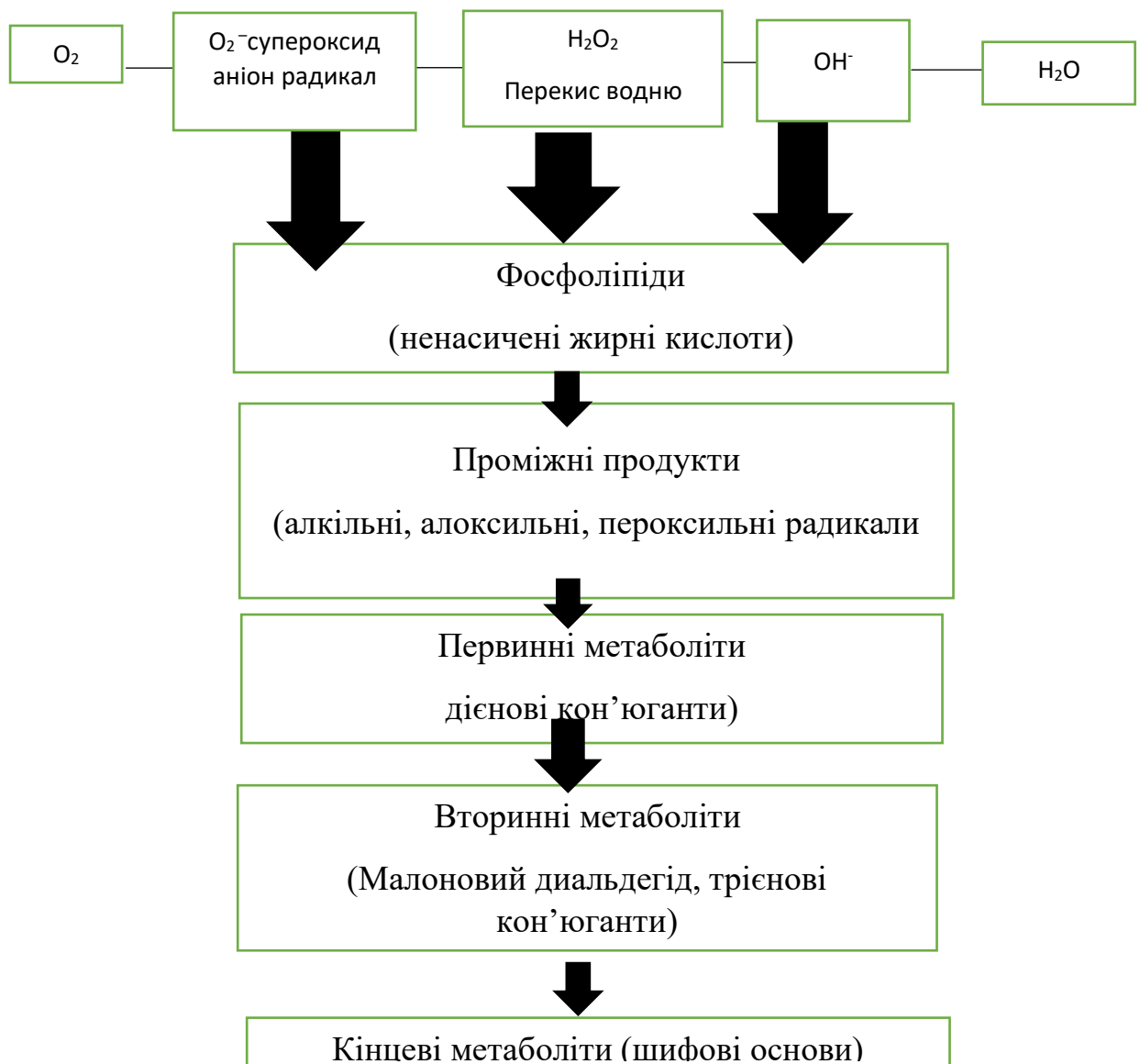


Рис. 1.7. Стадії перекисного окиснення ліпідів

Рівень ПОЛ можна оцінити шляхом вимірювання дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду, оскільки вони є продуктами перекисного окиснення ліпідів [33]. Прооксидантно-антиоксидантна система показує загальну стійкість організму та визначає межі його витривалості до зовнішніх впливів. Адаптивна активація процесів ПОЛ може сигналом окиснювального процесу та спричинювати порушення вищезазначеної рівноваги у клітині, тому що потрібна рівновага цих систем для нормального функціонування еукаріотичних організмів. [23].

Реакції в будь-якому організмі, що утворюються після короткочасного опромінення, швидко припиняються за допомогою окисно-відновних циклів. Однак у певних випадках та певних клітинах, вільні радикали можуть ініціювати ланцюгові реакції, які можуть відбуватися самостійно, що може підвищувати вплив початкового окиснення, викликаного опроміненням, що призводить до значних пошкоджень, які впливають на основні функції клітин. Особливо це стосується цитоплазматичної мембрани, в якій містяться поліненасичені жирні кислоти. Іонізуюче хронічне опромінення може змінювати ланцюгові реакції перекисного окиснення ліпідів, які викликають реакції як у мембрані, так і поза нею [24].

Зміщення рівноваги функціонування прооксидантно-антиоксидної систем це як сигнал стрес-реакції в еукаріотичних організмах. Тоді як, продукти ПОЛ можуть бути як індукторами, так і первинними медіаторами стресу як особливого стану біологічної системи [23]. За підвищення рівня вільних радикалів недостатньо для захисту мікроорганізму як ферментативної системи, так і низькомолекулярних антиоксидантів, оскільки ці радикали атакують цитоплазматичну мембрану [33].

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Характеристика штамів, використаних у дослідженні, та умови їхнього культивування

Для дослідження було використано штами *Cladosporium cladosporioides*4 та 4061, здатні до синтезу меланінових пігментів. Штам *C. cladosporioides*4, виділений з ґрунту території ЧАЕС у 1986 р під час багаторічного моніторингу мікобіоти зони відчуження. Характеризувався радіоадаптивними властивостями. Потужність експозиційної дози становила 5мР/год. *Cladosporium cladosporioides*4061 було виділено з приміщення будинку у м. Києві, в 2003 році. Цей штам був радіотолерантним до хронічного опромінення. Потужність його експозиційної дози була 12мкР/год. Ці культури підтримуються у колекції відділу фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України на скошеному суслі агарі (СА) за температури + 4°C.

Для визначення рівня малонового діальдегіду та дієнових конюгатів використовували культури грибів, які вирощували за умов описаних нижче.

Для отримання посівного матеріалу штами культивували в пробірках на скошеному СА за кімнатної температури ($+ 25 \pm 2^\circ\text{C}$) протягом 14 діб. Для отримання біомаси клітини мікроміцетів змивали рідким середовищем Чапека з поверхні щільного середовища та висівали в рідке поживне середовище Чапека в колби Ерленмеєра, культивували за температури $+ 25 \pm 2^\circ\text{C}$). Посів проводили суспензією конідій з концентрацією 1×10^6 кон/мл. Для підрахунку кількості конідій використовували камеру Горяєва (Marienfeld, Германія).

2.2. Реактиви, розчини та середовища культивування, які було використано у роботі

У роботі використовували такі реактиви:

– органічні речовини та кислоти: глюкоза (осч, ТОВ НВП Альфарус, Україна); 2-тіобарбітурова кислота (хч, Sigma, США); гексан (хч, ТОВ НВП Альфарус, Україна); ізопропиловий спирт (хч, ТОВ НВП Альфарус, Україна); трихлороцтова кислота (хч, ТОВ НВП Альфарус, Україна)

– неорганічні речовини та кислоти: дигідрофосфат калію KH_2PO_4 (чда, Реахім, Росія), калій нітрат KNO_3 (чда, Україна), сульфат магнію MgSO_4 (чда, Реахім, Росія), калій хлорид KCl (х.ч., Реахім, Росія), ферум сульфат FeSO_4 (ч.д.а., Україна),

– середовища такого складу (г/л): сусло агар (СА): пивне сусло–7 %, агар-агар–20; рідке поживне середовище Чапека: NaNO_3 –2, K_2HPO_4 –1, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ –0,5, KCl –0,5, FeSO_4 –0,01, агар–20.

Під час виконання роботи використовували фосфатний буферний розчин такого складу (г/л): NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 (Альфарус, Київ),

2.3. Визначення рівня продуктів перекисного окиснення ліпідів

2.3.1. Визначення вмісту дієнових кон'югатів у гомогенатах дослідних штамів. Для отримання гомогенату використовували міцелій, отриманий з культур, які культивували за умов описаних в підрозділі 2.1. Міцелій від культуральної рідини відділяли шляхом фільтрування через капроновий фільтр та гомогенізували. На електронних аналітичних вагах Ohaus Pioneer (PA 214C) зважували біомасу. До гомогенату додавали суміш гексану та ізопропілового спирту у співвідношенні (m / v / v) 1: 4,5 : 4,5 [34]. Отриману суміш центрифугували за 8000 об / хв протягом 15 хв на центрифугі ОПН-8. До надосадової рідини додавали дистильовану воду у співвідношенні (v / v) (1:10) для розділення фаз, струшували 2 рази, та

відбирали верхню та нижню фази [35]. Спектр поглинання надосоду в ультрафіолетовій частині визначали за допомогою спектрофотометру ЮНИКО 1201. В нижній фазі визначали оптичну густину за довжини хвилі $\lambda = 232$ нм. У верхній фазі визначали оптичну густину за довжини хвилі $\lambda = 220$ нм [36].

Розрахунок вмісту продуктів дієнових кон'югатів (ДК) за коефіцієнтом екстинції здійснювали за формулою (2.1):

$$C=D/\epsilon l, \quad (2.1)$$

де C – концентрація ДК, кмоль; D – оптична густина; ϵ – коефіцієнт молярної екстинції ($1,56 \times 10^5 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$); l – товщина шару розчину в кюветі (1 см).

2.3.2. Визначення вмісту малонового диальдегіду в міцелії дослідних штамів. Гомогенат отримували як описано у пункті 2.3.1. До гомогенату додавали фосфатний буфер (рН 7,2), 0,67%, ТБК та 20 % ТХОу співвідношенні (v / v / v / v) 1: 1: 3 : 2 [37]. Як контроль використовували суміш, в яку замість гомогенату вносили дистильовану воду в об'ємі, що залежав від маси гомогенату співвідношенні (v / v / v / v) 1: 1 : 3: 2. Реакційну суміш нагрівали протягом 30 хв на киплячій водяній бані за температури 100 °C зі зворотнім охолодженням. Суміш охолоджували до кімнатної температури та вимірювали оптичну густину за допомогою спектрофотометру СФ-26 за довжини хвилі $\lambda = 532$ нм проти контролю. Вміст продуктів малонового диальдегіду розраховували за коефіцієнтом екстинції, за формулою (2.2):

$$C=D/\epsilon l, \quad (2.2)$$

де C – концентрація МДА, кмоль; D – оптична густина; ϵ – коефіцієнт молярної екстинції ($1,56 \times 10^5 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$); l – товщина шару розчину в кюветі (1 см).

2.4. Визначення впливу хронічного опромінення на дослідні штами грибів

Для дослідження впливу хронічного опромінення використовували модельну систему, створену співробітниками Інституту ядерних досліджень НАН України доктором фізико-математичних наук Желтоножським В. О. і Садовниковим Л. В. та співробітниками Інституту мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України Тугай Т. І. та Тугай А. В. [Дисертація Тугай А. В. 2016 р], що імітувала низькі експозиційні дози для проведення довгострокових досліджень у контрольованих умовах. Джерелом іонізуючого випромінювання в цій модельній системі ґрунт, відібраний з 5 кілометрової зони відчуження. Основним дозоутвірним елементом був ^{137}Cs (розпад $^{137}\text{Cs} \xrightarrow{\beta-} ^{137m}\text{Ba} \xrightarrow{\gamma(662\text{keV})} ^{137}\text{Ba}$ стабільний). Потужність експозиційної дози – квантівна платформи установки становила 3,7 мР/год (2.65×10^{-10} А/кг). Поглинуту дозу розраховували за формулою (2.3):

$$D = wji/m, \quad (2.3)$$

де – w – середня енергія іонізації молекул; j – співвідношення гальмівних здібностей даного середовища до повітря; i – ступінь іонізації; m – маса середовища [5,2]

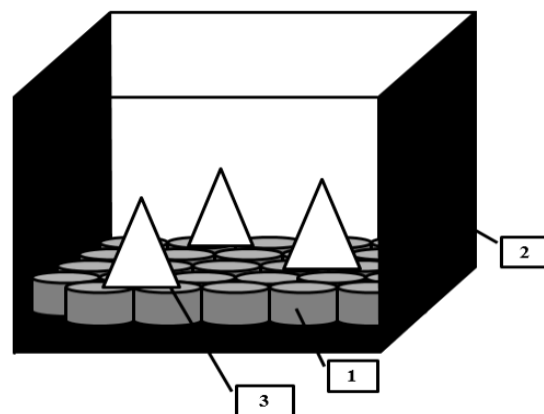


Рис. 2.1. Схематичне зображення модельної установки, яку використовували для хронічного опромінення мікроміцетів в контрольованих умовах [2, 5]

1. – пластикова коробка з ґрунтом з зони відчуження;
2. – захисний шар, Рв товщиною 100 мм;
3. – колби Ерленмеєра з поживним середовищем, засіяні культурами.

2.5. Статистична обробка результатів

Спочатку перевіряли розподіл на нормальність. Оскільки розподіл виявився ненормальним, то використовували непараметричний U-критерій Манна-Уїтні. Рівень значущості становив 0,05 та 0,1. Коли $U_x > U_{\text{табл}}$, різниці не доведено. $U_x < \text{чи} = U_{\text{табл}}$, нульова гіпотеза відкидається та різниця між вибірками стає статистично значима.

Першим кроком було скласти значення в один ряд, Потім ранжирували в порядку підвищення значень. Меншому значенню приписували менший ранг. Визначали значення U -критерію Манна — Уїтні за формулою (2.4):

$$U = (n_1 * n_2) + \frac{n_x * (n_x + 1)}{2} - T_x, 2.4$$

де U- значення U -критерію Манна — Уїтні; n_1 n_2 значення даних; T_x - значення більшої з двох рангових сум.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Дослідження продуктів перекисного окиснення ліпідів у штамів *Cladosporium cladosporioides* 4 та 4061 як механізму адаптації до хронічного опромінення

Перекисне окиснення ліпідів – це частина прооксидантної системи у міцеліальних грибів. Наявність продуктів ПОЛ у організмі мікроміцетів свідчить про реакцію організму на несприятливі умови існування [24]. Тому для визначення рівня перекисного окиснення ліпідів було досліджено два темнопігментовані штами *Cladosporium cladosporioides* 4061 та *Cladosporium cladosporioides* 4. З огляду на те, що деякі види грибів синтезують меланінові пігменти, а наявність цих пігментів є важливою тому, що меланін виконує захисну функцію, а саме підвищує виживаність мікроміцетів за різних несприятливих умов довкілля, зокрема при дії радіації [38].

Відомо, що протягом життєвого циклу в будь-якому організмі відбуваються певні зміни [21]. Наприклад, під час росту міцеліальних грибів в клітинах змінюється вміст ліпідів. В експоненційній фазі росту відбувається посилений ріст та активування процесів синтезу (7 доба). На початку та в кінці стаціонарної фази росту (14 та 21 доба) – синтез первинних та вторинних метаболітів завершується [39].

Рівень перекисного окиснення ліпідів вивчали у пігментованих штамів *C. cladosporioides* 4061 та 4 у двох фазах розвитку культури – логарифмічній (7 доба культивування) та стаціонарній фази росту на початку (14 доба культивування) і наприкінці (21 доба культивування). Тому, рівень дієнових кон'югатів та малонового деальдегіду визначали в гомогенаті міцелію, отриманому з 7-, 14- і 21-добових культур досліджених штамів, вирощених на рідкому живильному середовищі Чапека.

Нами встановлено, що у штаму *C. cladosporioides* 4061, виділеного в 2003 році, з приміщення будинку в Києві, в експоненційній фазі росту спостерігався найнижчий рівень дієнових кон'югатів, який становив 0,16 мкМ/г. На початку стаціонарної фази цей рівень становив 0,36 мкМ/г, а наприкінці – 0,45 мкМ/г (рис. 3.1). Тоді як у штаму *C. cladosporioides* 4, який був виділений в 1986 році, з ґрунту біля Чорнобильської зони відчуження, вміст дієнових кон'югатів у вище зазначених фазах росту становив 0,49 мкМ/г на двох фазах та 1 мкМ/г, відповідно (див. рис. 3.1).

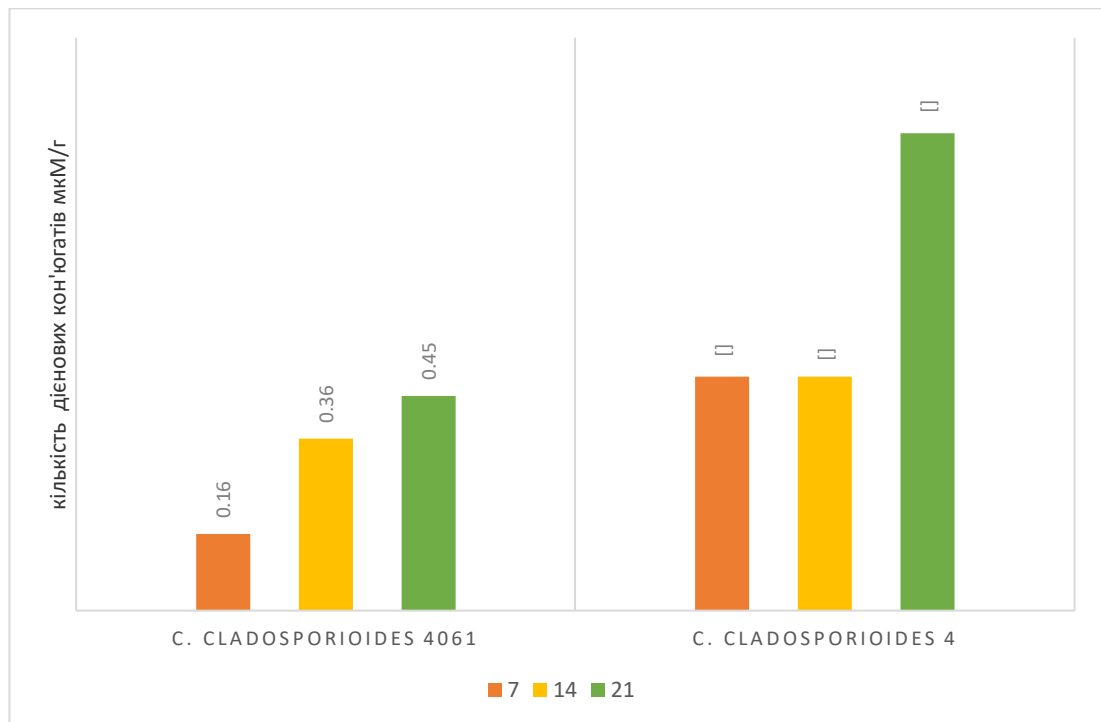


Рис. 3.1. Рівень дієнових кон'югатів у гомогенатах міцелію штамів *Cladosporium cladosporioides* 4061 (1) та *Cladosporium cladosporioides* 4 (2), що перебували на різних фазах розвитку: а–7 доба культивування, б–14 доба культивування, в – 21 доба культивування.

Враховуючи ці дані, можна зробити такі висновки, що наприкінці стаціонарної фази показник дієнових кон'югатів у штаму *C. cladosporioides* 4 був найвищим та практично у 2 рази вищим, ніж у культури *C. cladosporioides* 4061. А Під час логарифмічної фази розвитку культури *C. cladosporioides* 4061 вміст ДК був нижчим у 3 рази, порівняно з

C. cladosporioides 4 (рис. 3.2). У штамів *C. cladosporioides* 4061 на початку стаціонарної фази рівень ДК, порівняно з експоненційною фазою був вищим у 2 рази, тоді як, у *C. cladosporioides* 4 показник не змінився. Наприкінці стаціонарної фази порівняно з логарифмічною вміст дієнових кон'югатів у штамів *C. cladosporioides* 4061 та 4 підвищився практично втричі та вдвічі, відповідно (див. рис. 3,2).

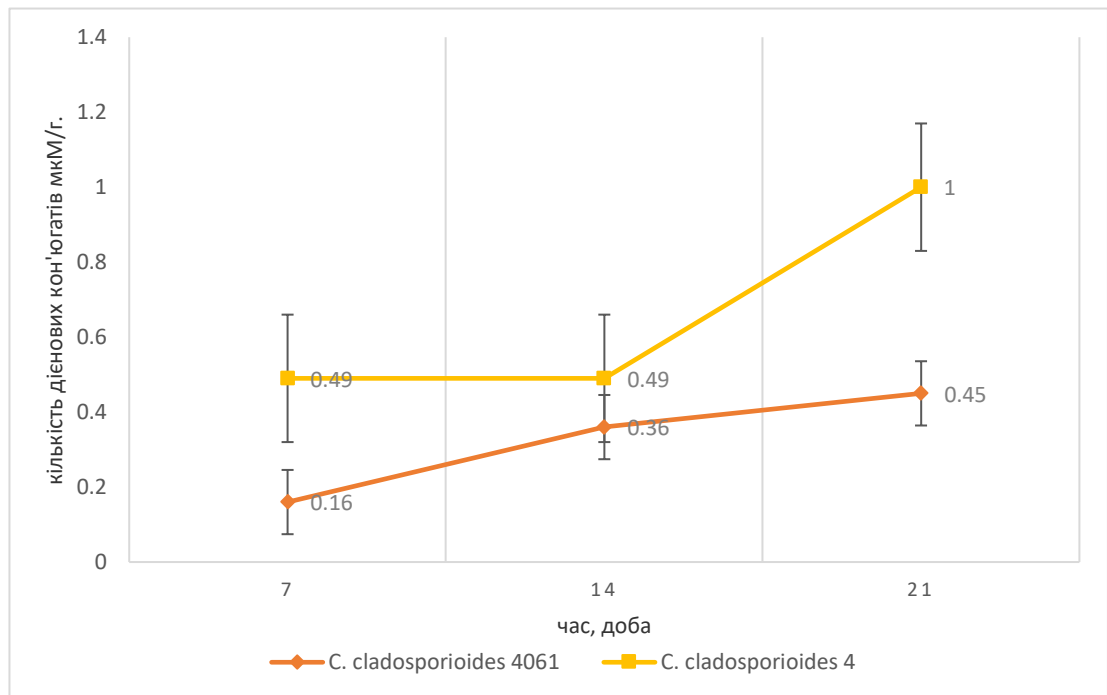


Рис. 3.2. Показник дієнових кон'югатів у культур *C. cladosporioides*, що перебували на різних фазах росту.

У штаму *C. cladosporioides* 4061 у логарифмічній фазі розвитку рівень малонового діальдегіду становив 0,07мкМ/г. На початку та на прикінці стаціонарної фази показник МДА підвищувався в 1,2 та практично в 4 рази, і становив 0,09 та 0,26 мкМ/г, відповідно (див. рис. 3.3. Тоді як у штаму *C. cladosporioides* 4 за вище зазначених умов в становив 0,07, 0,12 та 0,28 мкМ/г, відповідно (рис. 3.3).



Рис. 3.3 Вміст малонового діальдегіду у гомогенатах міцелію штамів *Cladosporium cladosporioides* 4061 (1) та *Cladosporium cladosporioides* 4 (2), що перебували на різних фазах розвитку: а–7 доба культивування, б–14 доба культивування, в – 21 доба культивування

Отримавши такі дані, можна сказати, що рівень МДА у штамів *C. cladosporioides* 4061 та 4 під час різних фаз практично не відрізняється. Хоча в фазах розвитку культури, показник МДА підвищувався. Зокрема, порівняно з логарифмічною фазою росту у вищезазначених штамів на початку стаціонарної фази вміст малонового діальдегіду підвищився в 1,2 і практично в 2 рази, відповідно. А наприкінці стаціонарної фази рівень в обох штамів виріс втричі (рис.3,4).

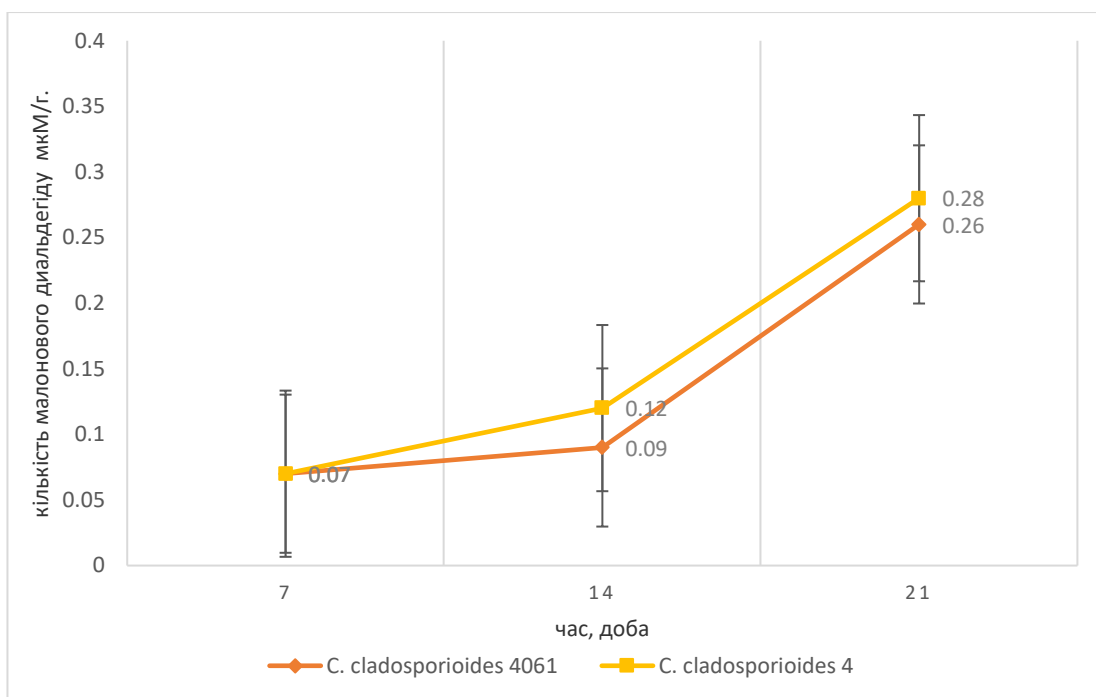


Рис. 3.4. Рівень малонового діальдегіду штамів *Cladosporium cladosporioides* 4061 та 4

Результати засвідчують, що рівень дієнових кон'югатів на початку стаціонарної фази розвитку (14 доба культивування) у штаму *C. cladosporioides* 4061, порівняно з логарифмічною фазою росту, підвищувався практично в 2 рази (див. рис. 3.1 та 3.2) і становив 0,36 мкМ/г. Водночас, у досліджуваній культурі *C. cladosporioides* 4 на 14 добу культивування рівень дієнових кон'югатів залишався без змін (див. рис. 3.1). Рівень малонового діальдегіду у штамів *C. cladosporioides* 4061 та 4 підвищувався незначною мірою і становив 0,09 і 0,12 мкМ/г, відповідно (рис. 3.3).

Таким чином, порівняльний аналіз, рівня дієнових кон'югатів на різних фазах розвитку дозволив встановити, що у дослідної культури *C. cladosporioides* 4061 показник ДК підвищувався під час стаціонарної фази, порівняно з логарифмічною (див. рис. 3.1). Натомість у штаму *C. Cladosporioides* 4 значення ДК залишалися без змін. На кінець стаціонарної фази розвитку (21 доба культивування), рівень дієнових кон'югатів у штаму *C. cladosporioides* 4061 підвищився, втричі, порівняно з

логарифмічною фазами росту, і становив 0,45 мкМ/г (див. рис. 3.2). У штаму *C. Cladosporioides* 4, рівень ДК був вдвічі більшим, ніж в попередніх фазах, і на кінець стаціонарної становив 1 мкМ/г. Вміст малонового діальдегіду у штамів *C. cladosporioides* 4061 та 4 на кінець стаціонарної фази практично не відрізнявся у обох досліджених штамів і становив 0,26 та 0,28 мкМ/г, відповідно (див рис.3.3). У вищезгаданих культур на 21 добу культивування значення показників малонового діальдегіду зростали втричі у *C. cladosporioides* 4061, а у *C. cladosporioides* 4 майже вдвічі, порівняно з експоненційною та початком стаціонарної фази росту.

Отже, інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів міцелію підвищується з віком культури [23]. Порівняльний аналіз показників дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду в логарифмічній та стаціонарній фазах дозволив з'ясувати, що рівень продуктів перекисного окиснення ліпідів у досліджених штамів підвищувався наприкінці стаціонарної фази розвитку культури. Так, було показано, що у штамів *C. cladosporioides* 4061 та 4 вміст МДА збільшився в 3,7 рази в стаціонарній фазі, порівняно з експоненційною. Тому можна припустити, що за звичайного культивування штаму *C. cladosporioides* 4 з радіотропізмом не проявляв ніяких адаптивних властивостей.

З огляду на отримані результати, на наступному етапі вважали за доцільне вивчити рівень продуктів перекисного окиснення ліпідів у штамів *C. cladosporioides* за хронічного опромінення.

3.2. Реакція прооксидантної системи штамів *Cladosporium cladosporioides* за дії хронічного опромінення, в модельній установці.

Адаптація мікроміцетів до хронічного опромінення виявляється формуванням радіостійкості у грибів, які були під впливом хронічного опромінення [40]. Тому, у роботі досліджували рівень перекисного

окиснення ліпідів у двох темнопігментованих штамів *C. cladosporioides* 4 та 4061, один з яких було виділено у зоні відчуження. Останні тривалий час перебували за впливу хронічного опромінення в модельній установці, і адаптувалися до вищезгаданих умов існування. Радіотропні штами порівнювали зі штамми, які попередньо не зазнавали хронічного опромінення під час процесу перекисного окиснення ліпідів. Зокрема, визначали рівень дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду. Ці продукти вивчали за умов, аналогічних описаним у підрозділі 3.1, тільки з використанням модифікаційної установки (див. рис. 2.5). Для порівняння значення показників дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду використовували штами, які не володіли та володіли радіоадаптивними властивостями.

Нами було з'ясовано, що за хронічного опромінення у штаму *C. cladosporioides* 4061 в експоненційній фазі росту (7 доба культивування) рівень дієнових кон'югатів був вдвічі більше, порівняно зі штамом *C. cladosporioides* 4061 без дії хронічного опромінення, і сягав 0,32 мкМ/г (рис. 3.5) При переході культури з логарифмічної в стаціонарну фазу розвитку у цього штаму внаслідок адаптації до хронічного опромінення спостерігалось збільшення вмісту ДК з 0,32 до 0,43 мкМ/г, відповідно. Наприкінці стаціонарної фази показник становив 0,56 мкМ/г, тоді як під час логарифмічної фази цей показник був у 1,6 рази вищим (див рис. 3.6)

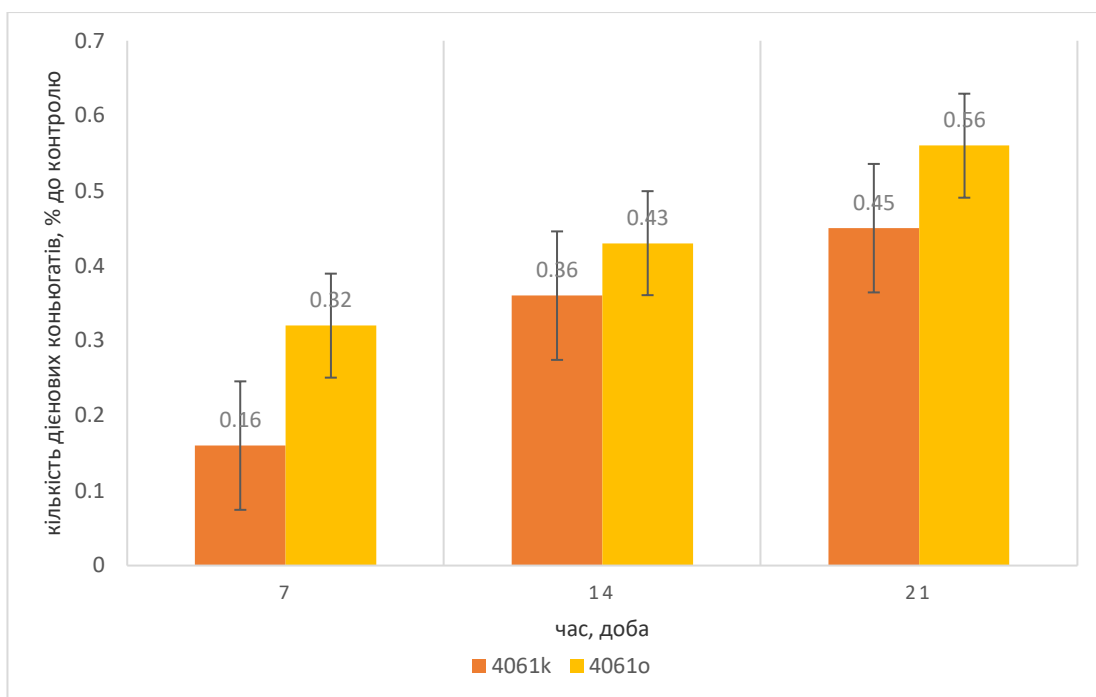


Рис. 3.5 Рівень дієвих кон'югатів у гомогенаті штаму *Cladosporium cladosporioides* 4061 без опромінення (1) та за впливу хронічного опромінення (2), що перебували на різних фазах розвитку: а – 7 доба культивування, б – 14 доба культивування, в – 21 доба культивування.

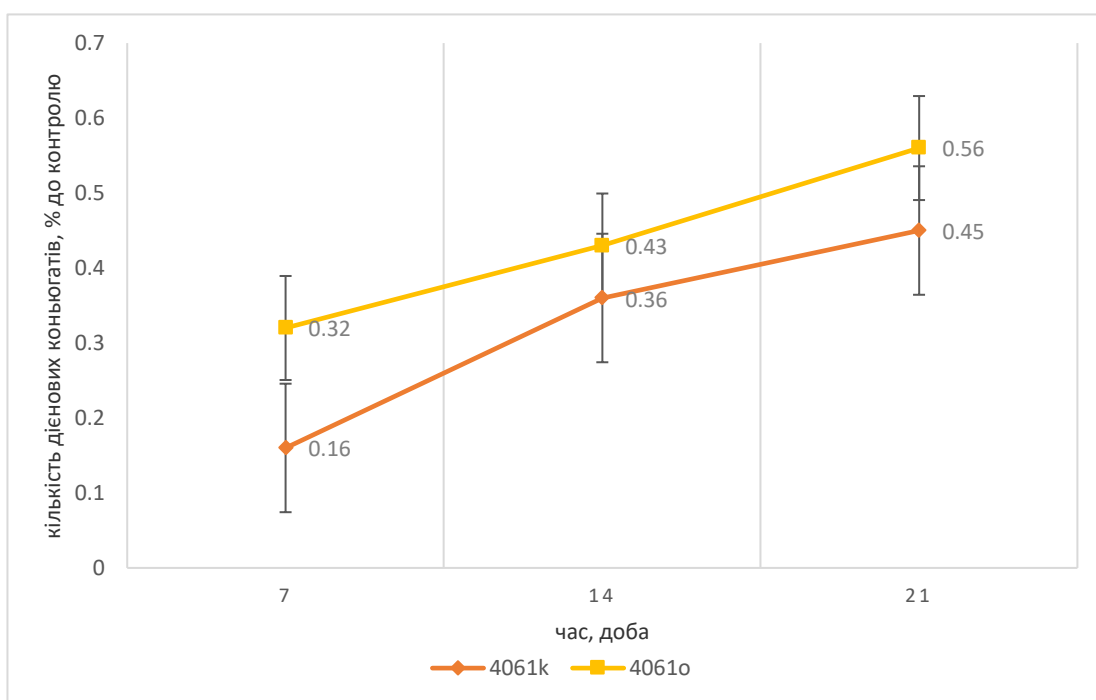


Рис. 3.6 Вміст дієвих кон'югатів у гомогенаті штаму *Cladosporium cladosporioides* 4061 контрольного (1) та за впливу хронічного опромінення

У логарифмічній фазі розвитку культури у *C. cladosporioides* 4 за дії хронічного опромінення, відбулося зниження рівня дієнових кон'югатів в 2 рази (рис. 3,8), порівняно зі штамом що не зазнавав дії хронічного опромінення (ДК =0,49 мкМ/г, і становив 0,15 мкМ/г, відповідно (рис. 3.7)

На початку стаціонарної фази розвитку (14 доба культивування) у штаму *C. cladosporioides* 4061 вміст дієнових кон'югатів зменшився в 1,7 рази (див. рис. 3.6). У культури *C. cladosporioides* 4 показник ДК незначно підвищився і сягав 0,55

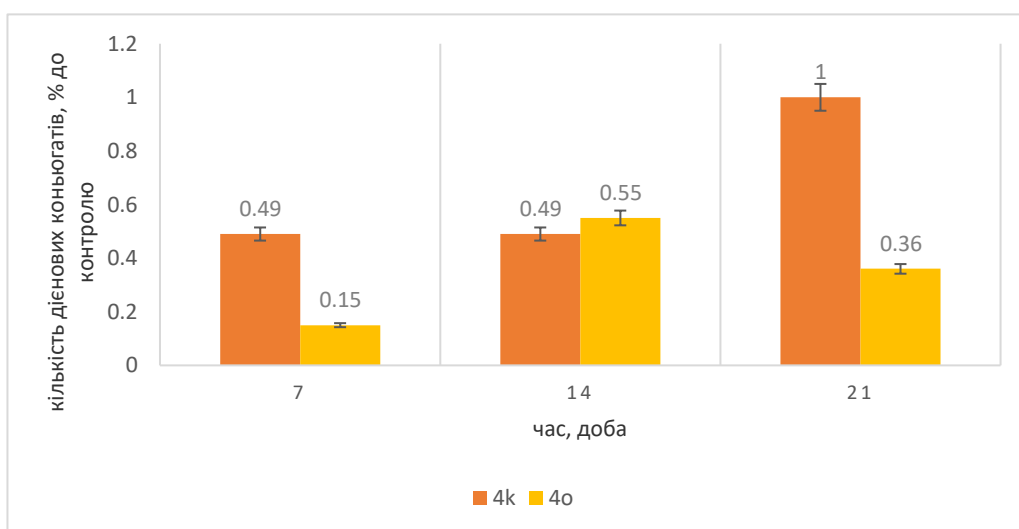


Рис. 3.7.Значення показників дієнових кон'югатів у штаму *Cladosporium cladosporioides* 4–без опромінення (1) та за впливу хронічного опромінення (2), що перебували на різних фазах розвитку: а– 7 доба культивування, б – 14 доба культивування, в – 21 доба культивування

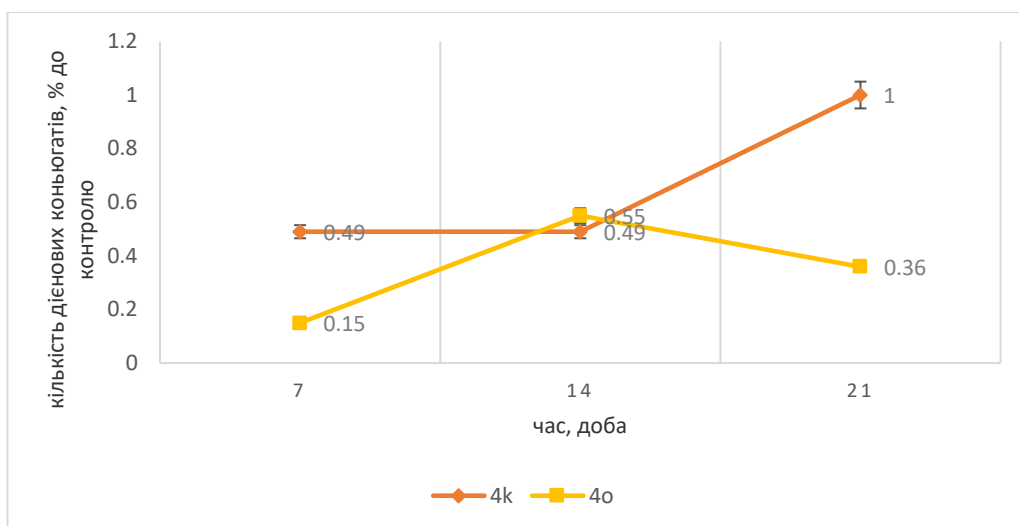


Рис. 3.8. Рівень дієнових кон'югатів у штамів *C. cladosporioides* 4 без опромінення (1) та опроміненого хронічним опроміненням (2)

За переходу культури з логарифмічної в стаціонарну фазу розвитку у *C. cladosporioides* 4 за аналогічних умов рівень ДК підвищився в 3,6 разів (вміст ДК = 0,55мкМ/г), (див. рис. 3.8).

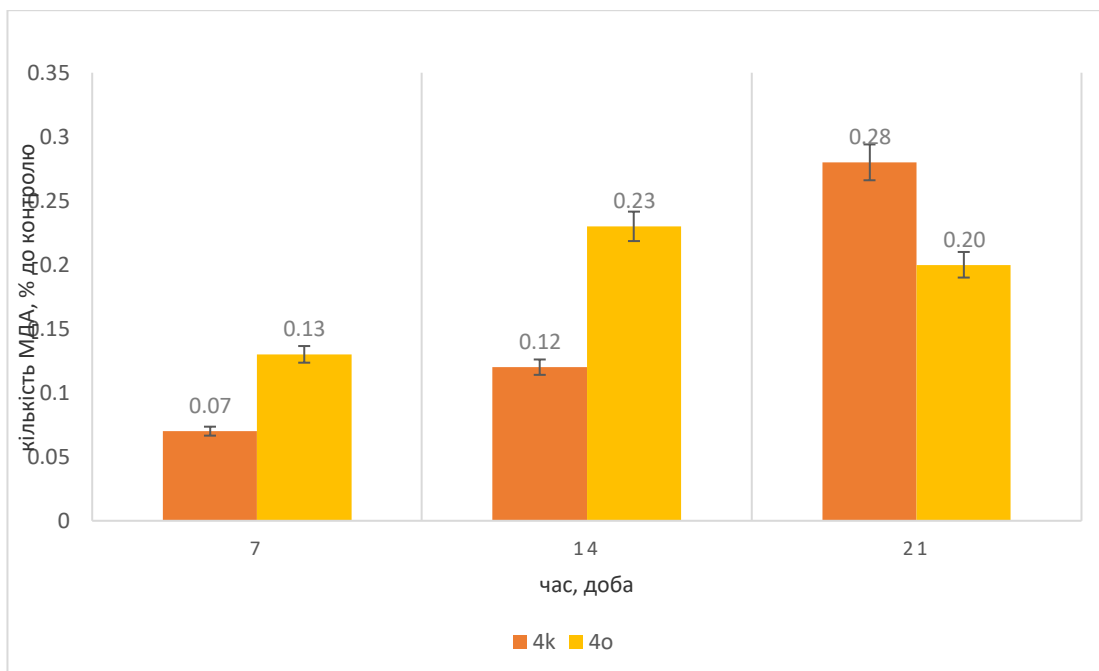


Рис. 3.9. Рівень малонового діальдегіду у штаму *Cladosporium cladosporioides* 4061 без опромінення (1) та за впливу хронічного

опромінення (2), що перебуває на різних фазах розвитку: а – 7 доба культивування, б – 14 доба культивування, в – 21 доба культивування

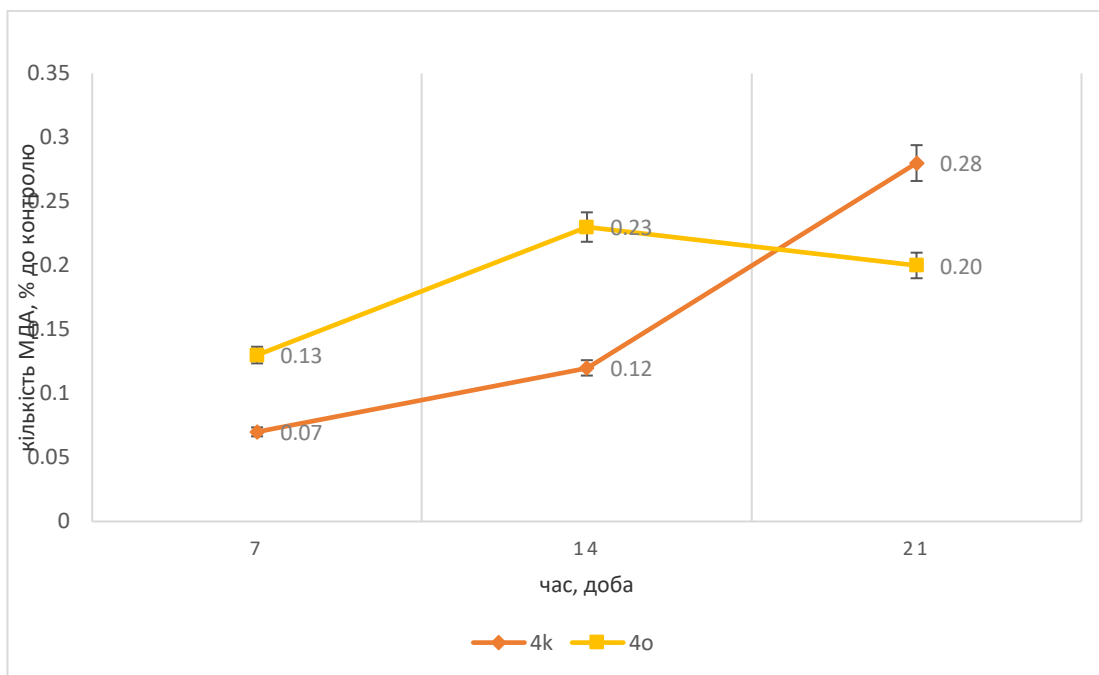


Рис. 3.10. Показник малонового діальдегіду у штаму *C. cladosporioides* 4061 без опромінення (1) та за впливу хронічного опромінення (2)

У варіанту штаму *C. cladosporioides* 4061 за впливу хронічного опромінення, на кінець стаціонарної фази рівень дієнових кон'югатів становив 0,56 мкМ/г, тоді як під час логарифмічної фази цей показник був у 1,6 рази вищим (див. рис. 3.6). Натомість, у варіанта штаму *C. cladosporioides* 4 значення ДК у вищезгаданих фазах залишалося практично без змін (показник ДК = 0,36 мкМ/г). Разом з тим значення показників малонового діальдегіду за аналогічних умов у досліджених варіантів обох культур зменшувалося наприкінці стаціонарної фази, і становило 0,30 та 0,20 мкМ/г, відповідно (див. рис. 3.9 та 3.11). Підвищення рівня продуктів перекисного окиснення ліпідів у варіанту штаму *C. cladosporioides* 4, адаптованого до хронічного опромінення, на кінець стаціонарної фази, відповідно до даних літератури [23], свідчить про накопичення активних форм кисню.

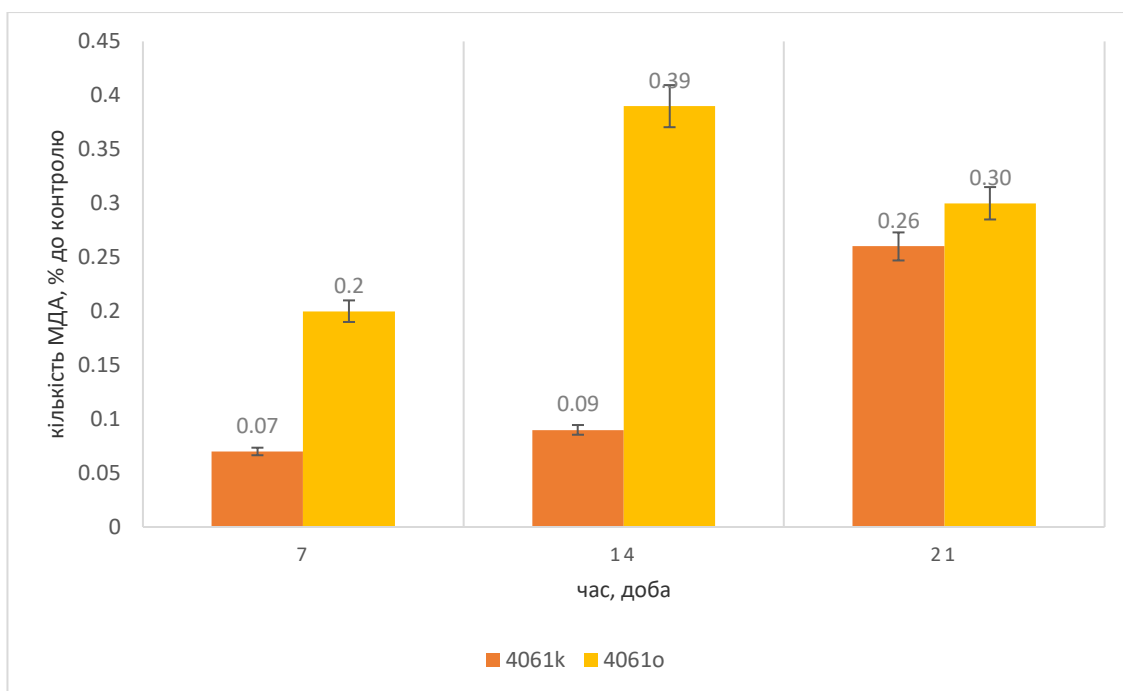


Рис. 3.11. Вміст малонового діальдегіду у штаму *Cladosporium cladosporioides* неопроміненого (1) та опроміненого хронічним опроміненням (2), що перебуває на різних фазах розвитку: в – 7 доба культивування, б – 14 доба культивування, в – 21 доба культивування

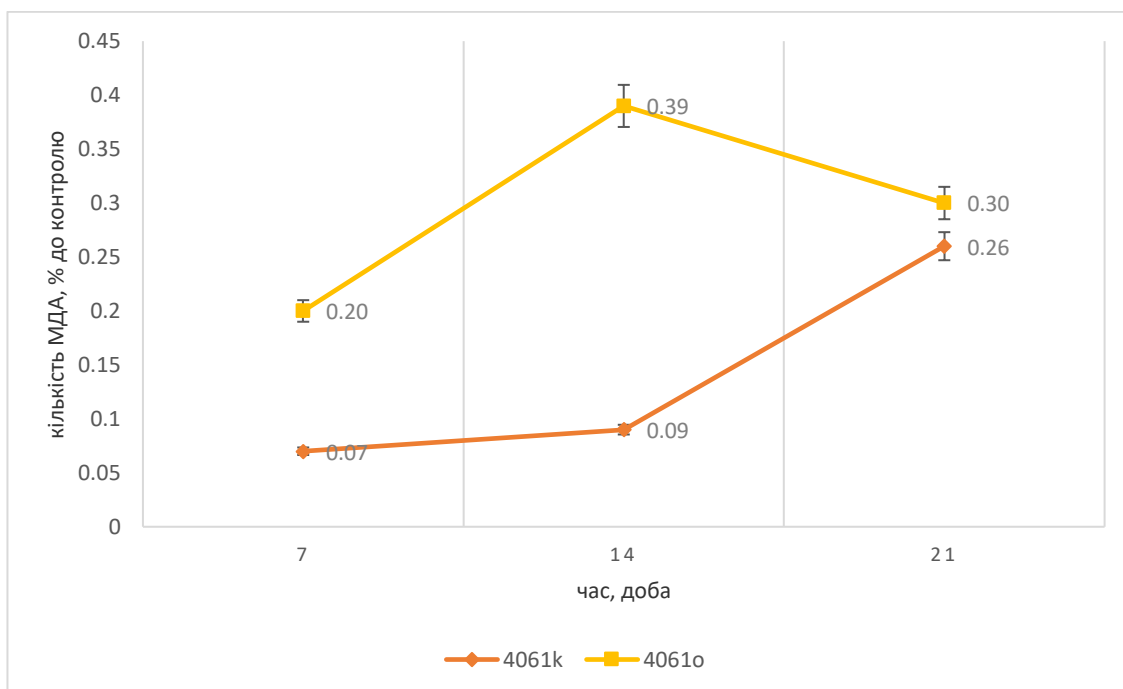


Рис. 3.12. Рівень малонового диальдегіду варіанту штаму *C. cladosporioides* 4061 неопроміненого (1) та опроміненого хронічним опроміненням

Отримані нами результати засвідчують, що за хронічного опромінення у варіантів штамів *C. cladosporioides* 4061 та 4 під час логарифмічної фази росту зростали показники продуктів перекисного окиснення ліпідів (а саме, дієнових кон'югатів та малонового диальдегіду). Зокрема, у адаптованого варіанту штаму *C. cladosporioides* 4 значення показників ДК та МДА на початку стаціонарної фази були найвищими, порівняно з іншими дослідженими часовими проміжками культивування. За адаптації до хронічного опромінення у варіанту штаму *C. cladosporioides* 4 не спостерігалось стрімкого зростання рівня дієнових кон'югатів, що може свідчити про реалізацію адаптивних можливостей цього штаму.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

За хронічного опромінення, в еукаріотичних організмах виявлено, що підвищується рівень активних форм кисню, що, в свою чергу, може вплинути на системи захисту (прооксидантна та антиоксидантна). Тугай дослідила [41], які саме зміни відбуваються в антиоксидантній системі міцеліальних грибів на прикладі *Cladosporium cladosporioides*. Разом з тим вивчена дія хронічного опромінення на антиоксидантну систему у міцеліальних грибів, зокрема у *Aspergillus versicolor* [42], вплив опромінення на мікроскопічні гриби з Чорнобильської зони відчуження, з радіоадаптивними властивостями на вищезазначену систему [43], а також показано загальні адаптивні механізми за хронічного опромінення у мікроміцетів [40], активність ферментів антиоксидантного захисту та радіальний ріст у трьох пострадіаційних генераціях *Cladosporium cladosporioides* [44], особливості росту у трьох поколіннях опромінених популяцій мікроміцетів, *Hormoconis resinae*[45].

Вивчено адаптацію мікроорганізмів до хронічного опромінення [40]. Та роль меланінових пігментів для неї [4], а також вплив на антиоксидантні системи такого опромінення. Хоча функціонування прооксидантної системи міцеліальних грибів вивчається, досі ще остаточно не з'ясовані процеси які відбуваються в цій системі за дії хронічного опромінення.

Нами вперше з'ясовано рівень перекисного окиснення ліпідів у штаму з радіоадаптивними властивостями. Вивчено вплив хронічного опромінення на функціонування окремих ланок прооксидантної системи, зокрема рівень перекисного окиснення ліпідів у штамів *Cladosporium cladosporioides* 4061 та 4. Разом з тим, штаму *C. cladosporioides* притриманий феномен радіотропізму. Ця властивість надає можливість для порівняння впливу такого опромінення, як для радіотропних, так і радіочутливих еукаріотичних організмів. Таке порівняння необхідне, оскільки, дає змогу оцінити вплив

хронічного опромінення на інші еукаріотичні організми. Та з'ясувати нові адаптивні механізми захисту клітин за дії хронічного опромінення.

Paraszkiewicz та співавтори [46.], показали, що у дріжджів *Curvularialunata* за стресових умов рівень продуктів перекисного окиснення ліпідів значно знизився, порівняно з культурою, яка не зазнавала впливу. Натомість у нашому дослідженні спостерігали значне підвищення вмісту цих продуктів у неопроміненого штаму.

Ми показали, що у неопроміненого штаму *Cladosporium cladosporioides* 4 був найвищий показник дієнових кон'югатів наприкінці стаціонарної фази розвитку культури, порівняно з *C. Cladosporioides* 4061, у якого спостерігався найнижчий рівень ДК (ДК = 0,16 мкМ/г) в логарифмічній фазі. За дії хронічного опромінення значення ДК змінилися, і наприкінці стаціонарної фази у *C. cladosporioides* 4061 цей показник був у 1.6 рази вищим.

Показано, що у *C. cladosporioides* 4 значення показників ДК та МДА на початку стаціонарної фази були найвищими, порівняно з іншими дослідженими часовими проміжками. За дії хронічного опромінення у вищезазначеного штаму не спостерігалось стрімкого зростання рівня ДК, що може свідчити про реалізацію адаптивних можливостей цього штаму.

Таким чином, дослідження в роботі є актуальним та потребує подальшого вивчення.

ВИСНОВКИ

1. Рівень малонового диальдегіду практично не відрізнявся у вихідних штамів *C. cladosporioides* 4061 та 4, що не зазнавали опромінення, та поступово зростав у процесі розвитку культур, сягаючи максимальних значень 0,26 та 0,28 мкМ/г, відповідно у кінці стаціонарної фази росту .

2. Кількість дієнових кон'югатів у вихідних штамів *C. cladosporioides* 4061 та 4, що не зазнавали опромінення, у стаціонарній фазі росту, порівняно з логарифмічною, підвищувався практично в 2 та 3 рази, відповідно.

3. У штаму *C. cladosporioides* 4061 за хронічного опромінення в експоненційній фазі росту рівень дієнових кон'югатів був вдвічі вищий, порівняно з неопроміненим штамом, тому його можна охарактеризувати, як вразливий до дії хронічного опромінення.

4. За дії хронічного опромінення у радіотропного штаму *C. cladosporioides* 4 упродовж розвитку не спостерігалось стрімкого зростання рівня дієнових кон'югатів, що може свідчити про реалізацію адаптивних можливостей цього штаму.

5. У опроміненого штаму *C. cladosporioides* 4061 за хронічного опромінення у процесі розвитку культури рівень малонового диальдегіду підвищувався і сягав максимального рівня 0,39 мкМ/г на початку стаціонарної фази.

6. У радіотропного штаму *C. cladosporioides* 4 за дії хронічного опромінення рівень малонового диальдегіду в стаціонарній фазі розвитку культури був в 1,5 рази більшим, порівняно з експоненційною фазою.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Dighton J, Tugay T, Zhdanova N. Fungi and ionizing radiation from radionuclides. *FEMS Microbiology Letters*. 2008;281(2):109-120.
2. Тугай А.В. вплив хронічного опромінення на ґрунтові мікроміцети зони відчуження Чорнобильської АЕС [дисертація]. Київ: Київ. нац. ун-т; ім. Тараса Шевченка 2016. 127 с.
3. Тугай Т.І. адаптація мікроміцетів До хронічного іонізуючого опромінення [дисертація]. Київ: НАНУ інст., ім. Д.К. Заболотного 2013.94 с.
4. Dadachova E, Casadevall A. Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. *Current Opinion in Microbiology*. 2008;11(6):525-531.
5. Tugay A, Tugay T, Lukashov D. Influence of low chronic exposure on physiological and biochemical properties of three irradiated generations *Aspergillus versicolor*. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv Series: Biology*. 2015;70(2):77-81.
6. Robertson K, Mostaghim A, Cuomo C, Soto C, Lebedev N, Bailey R et al. Adaptation of the Black Yeast *Wangiella dermatitidis* to Ionizing Radiation: Molecular and Cellular Mechanisms. *PLoS ONE*. 2012;7(11):e48674.
7. Hong M, Kim D, Ahn J, Kang S, Seo Y, Kim J. Comparison of radiosensitivity response to acute and chronic gamma irradiation in colored wheat. *Genetics and Molecular Biology*. 2018;41(3):611-623.
8. [Internet]. Energetika.in.ua. 2020. Available from: <http://energetika.in.ua/ua/books/book-5/part-3/section-3/3-2/3-2-5>.
9. Hase Y, Satoh K, Seito H, Oono Y. Genetic Consequences of Acute/Chronic Gamma and Carbon Ion Irradiation of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*. 2020;11.
10. Kruszewski M, Wojewódzka M, Iwaneňko T, Collins A, Szumiel I. Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to

chronic low-dose irradiation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 1998;416(1-2):37-57.

11. [Internet]. Bio.msu.ru. 2020 Available from: http://www.bio.msu.ru/res/DictionaryAttachment/209/DOC_FILENAME/MFK_2015_vesna_Izlucheniya_5.pdf.

12. TOMINAGA H, KODAMA S, MATSUDA N, SUZUKI K, WATANABE M. Involvement of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Induction of Genetic Instability by Radiation. *Journal of Radiation Research*. 2004;45(2):181-188.

13. Melanin [Internet]. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2020 [cited 8 June 2020]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Melanin>.

14. Cordero, R. J. B., & Casadevall, A. (2017). Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biology Reviews*, 31(2), 99–112. doi:10.1016/j.fbr.2016.12.003.

15. [Internet]. Ru.qwe.wiki. 2020 [cited 8 June 2020]. Available from: <https://ru.qwe.wiki/wiki/Melanin>.

16. Eisenman H, Casadevall A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011;93(3):931.

17. Almeida-Paes R, Nosanchuk JD, Zancoppe-Oliveira RM. Fungal melanins: Biosynthesis and biological functions. In *Melanin: Biosynthesis, Functions and Health Effects*. Nova Science Publishers, Inc. 2012. p. 77-107.

18. Belozerskaya T, Gessler N, Aver'yanov A. Melanin Pigments of Fungi. *Fungal Metabolites*. 2015;:1-29.

19. García-Rivera, J. and Casadevall, A., 2001. Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. *Medical Mycology*, 39(4), pp.353-357.

20. Харченко С.В, Нетюхайло Л.Г., 2020. [online] [Molodyvcheny.in.ua](http://molodyvcheny.in.ua). Available at: <<http://molodyvcheny.in.ua/files/journal/2014/9/34.pdf>>.

21. Birben E, Sahiner U, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*. 2012;5(1):9-19.
22. Gaschler M, Stockwell B. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;482(3):pp25.
23. Fedotov O. The lipid peroxidation intensity of fungi strains from the orders Agaricales and Polyporales. *Visnyk of Dnipropetrovsk University Biology, ecology*. 2016;24(2):317-323.
24. G. J, Fukumoto R, V. N. Lipid Peroxidation After Ionizing Irradiation Leads to Apoptosis and Autophagy. *Lipid Peroxidation*. 2012.
25. Cristiana F. Introductory Chapter: The Biology of Reactive Species. *Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells*. 2018.
26. Н.С. Леоненко, стан перекисного окислення ліпідів та окислювальної модифікації білків в організмі шурів при дії метсульфурон-метилу в малих дозах.
27. Zhang L, Feng M. Antioxidant enzymes and their contributions to biological control potential of fungal insect pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2018;102(12):4995-5004.
28. Mohsenin V. Lipid peroxidation and antielastase activity in the lung under oxidant stress: role of antioxidant defenses. *Journal of Applied Physiology*. 1991;70(4):1456-1462.
29. <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/360438/> DOI : 10.5530/pj.2017.2.28 Article Available online <http://www.phcogj.com/v9/i2>.
30. Ayala, A., Muñoz, M. and Argüelles, S., 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, pp.1-31.
31. Gaschler M, Stockwell B. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;482(3):419-425.
32. Nam, T., 2011. Lipid Peroxidation and Its Toxicological Implications. *Toxicological Research*, 27(1), pp.1-6.

33. Grotto D, Maria L, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia S et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. *Química Nova*. 2009;32(1):169-174.
34. Биохимия мембран: метод. пособие к лабораторным занятиям для студентов биологического факультета спец. 1 -31 01 01 Биология /авт.-сост. Н.М Орел. – Мн.: БГУ, 2010. – 28 с.
35. Гаврилов, В.Б., Гаврилова, А.Р., Хмара, Н.Ф. Изменение диеновых конъюгатов в плазме по ультрафиолетовому поглощению гептановых и изопропильных экстрактов. // Лаб. Дело. – 1988.-№2. – С. 60-64.
36. Некрасов, Э.В., 2020. *Методы Анализа Перекисного Окисления Липидов В Медико-Биологических Исследованиях*. [online] Cyberleninka.ru. Available at: <<https://cyberleninka.ru/article/n/metody-analiza-perekisnogo-okisleniya-lipidov-v-mediko-biologicheskikh-issledovaniyah/viewer>> [Accessed 7 June 2020].
37. Стальной, Д.М., Гаришвили, Т.Г. Метод определения малонового альдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии /Под ред. В.Н.Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.
38. CorderoR, CasadevallA. Functionsoffungalmelaninbeyondivulence. *FungalBiologyReviews*. 2017;31(2):99-112.
39. Fakas S, Papapostolou I, Papanikolaou S, Georgiou C, Aggelis G. Susceptibility to peroxidation of the major mycelial lipids of *Cunninghamella echinulata*. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2008;110(11):1062-1067.
40. TI Tugay, AV Tugay Adaptation of Micro fungi to Chronic Ionizing Radiation. *New Facts and Hypotheses*.
41. TI Tugaï The effect of gamma irradiation on the physiological-biochemical properties of strains of *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries differing by the trait of radiotropism VV Vember, NN Zhdanov, *Mikrobiolohichnyi zhurnal* (Kiev, Ukraine: 1993) 61 (2), 25-32.

42. Dighton J, Tugay T, Zhdanova N. Fungi and ionizing radiation from radionuclides. *FEMS Microbiology Letters*. 2008;281(2):109-120.
43. Tugay TI, Zheltonozhskaya MV, Sadovnikov LV, Tugay AV, Farfan EB. 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; 101(4): 375–82.
44. Тугай А. В. Радіальний ріст та активність ферментів антиоксидантного захисту у трьох пострадіаційних генераціях *Cladosporium cladosporioides* / А. В. Тугай, Т. І. Тугай, В. О. Желтоножський, М. В. Желтоножська, Л. В. Садовников, Г. В. Пономаренко, О. Б. Поліщук // *Ядерна фізика та енергетика*. - 2017. - Т. 18, № 1. - С. 72-80. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/yadf_2017_18_1_12.
45. Тугай А. В. Особливості ростових процесів та функціонування антиоксидантної системи у трьох поколінь опромінених популяцій мікроміцетів *hormoconis resinae* / А. В. Тугай, Т. І. Тугай, В. О. Желтоножський [і ін.] // *Ядерна фізика та енергетика*. – 2015. – Т. 16, № 4. – С. 408 – 414.
46. Paraszkievicz, K., Bernat, P., Naliwajski, M. and Długoński, J., 2010. Lipid peroxidation in the fungus *Curvularia lunata* exposed to nickel. *Archives of Microbiology*, 192(2), pp.135-141.