

DOI 10.17516/1997-1389-0391

EDN: SICSZU

УДК 577.332.23:539.199

Content of Lipid Peroxydation Products, Activity of Antioxidant Enzymes, and Intensity of Light Emission of Basidiomycete *Neonothopanus nambi* under Stress after Mechanical Damage

Natalya A. Tyulkova* and Vladimir S. Bondar
*Institute of Biophysics of the Federal Research Center
«Krasnoyarsk Science Center SB RAS»
Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 10.06.2021, received in revised form 29.01.2022, accepted 25.05.2022

Abstract. The luminous basidiomycete *Neonothopanus nambi* was used to demonstrate the relationship between intensity of ROS-induced oxidative processes, efficiency of the functioning of antioxidant system enzymes, and the level of light emission of the fungus under stress. Development of oxidative stress after mechanical damage to the mycelium of the fungus was accompanied by a significant (several orders of magnitude) increase in intensity of its glow. At the maximum level of light emission of *N. nambi* mycelium, the activity of enzymes involved in the metabolism of ROS was decreased: the activity of peroxidase and superoxide dismutase to a large extent and the activity of catalase to a lesser extent. The extracts from the biomass of the brightly glowing mycelium were found to contain significantly decreased contents of primary and final products of lipid peroxydation (LP): diethenoid conjugates and Schiff bases. The findings of this study suggest that the increase in the level of bioluminescence of the fungus under stress serves as a compensatory mechanism protecting it against damage by an excessive pool of ROS (mainly H₂O₂ and other peroxide compounds), which are neutralized in the reaction of light emission, preventing the development of free radical oxidation processes, LP in particular.

Keywords: luminous fungi, reactive oxygen species, antioxidant enzymes, diethenoid conjugates, Schiff bases, oxidative stress.

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: n.tyulkova2011@yandex.ru
ORCID: 0000-0003-1555-6514 (Bondar V.)

Citation: Tyulkova N. A., Bondar V. S. Content of lipid peroxydation products, activity of antioxidant enzymes, and intensity of light emission of basidiomycete *Neonothopanus nambi* under stress after mechanical damage. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2022, 15(3), 333–346. DOI: 10.17516/1997-1389-0391



Содержание продуктов перекисного окисления липидов, активность антиоксидантных ферментов и интенсивность световой эмиссии базидиомицета *Neonothopanus nambi* при стрессе после механического повреждения

Н. А. Тюлькова, В. С. Бондарь

*Институт биофизики
Федерального исследовательского центра
«Красноярский научный центр СО РАН»
Российская Федерация, Красноярск*

Аннотация. На примере светящегося базидиомицета *Neonothopanus nambi* продемонстрирована взаимосвязь между интенсивностью АФК-индуцированных окислительных процессов, эффективностью функционирования ферментов антиоксидантной системы и уровнем световой эмиссии гриба в условиях стресса. Установлено, что развитие оксидативного стресса после механического повреждения мицелия гриба сопровождается значительным (на порядок) увеличением интенсивности его свечения. Показано, что при максимальном уровне световой эмиссии мицелия *N. nambi* в нем регистрируется снижение активности ферментов, участвующих в метаболизме АФК – в значительной степени пероксидаз и супероксиддисмутазы, в меньшей степени каталазы. В экстрактах из биомассы ярко светящегося мицелия обнаружено существенное снижение содержания первичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – диеновых конъюгатов и оснований Шиффа. Полученные данные позволяют рассматривать возрастание уровня биолюминесценции гриба при стрессе в качестве компенсаторного механизма его защиты от повреждения избыточным пулом АФК (в первую очередь H_2O_2 и других пероксидных соединений), которые нейтрализуются в реакции светоизлучения, что препятствует развитию процессов свободнорадикального окисления, в частности ПОЛ.

Ключевые слова: светящиеся высшие грибы, активные формы кислорода, антиоксидантные ферменты, диеновые конъюгаты, основания Шиффа, окислительный стресс.

Цитирование: Тюлькова, Н. А. Содержание продуктов перекисного окисления липидов, активность антиоксидантных ферментов и интенсивность световой эмиссии базидиомицета *Neonothopanus nambi* при стрессе после механического повреждения / Н. А. Тюлькова, В. С. Бондарь // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2022. 15(3). С. 333–346. DOI: 10.17516/1997-1389-0391

Введение

Видимое в темноте невооруженным глазом яркое свечение многих видов высших грибов является широко распространенным природным явлением (Harvey, 1952, 1957; Johnson, Haneda, 1966; Shimomura, 2006; Desjardin et al., 2008; Bondar et al., 2012a). Несмотря на значительные успехи, достигнутые в исследованиях биолюминесценции высших грибов за последнее десятилетие (Bondar et al., 2014; Purto et al., 2015; Kotlobay et al., 2018; Oba et al., 2017; Kaskova et al., 2017; Puzyr et al., 2019; Garcia-Iriepa et al., 2020), тем не менее некоторые биохимические аспекты этого феномена не до конца понятны и требуют дальнейшего изучения. В частности, не совсем ясны те метаболические процессы, которые сопровождаются видимым свечением базидиомицетов (Gitelson et al., 2012).

Изучение особенностей биолюминесценции разных видов высших грибов позволило нам развить высказанную ранее идею (Shimomura, 1992; Shimomura et al., 1993) об участии активных форм кислорода (АФК) и ферментов с оксидазной функцией в механизмах излучения света этими живыми организмами (Bondar et al., 2011, 2012a, b). Хорошо известно, что происходящие в биообъектах процессы свободнорадикального окисления контролируются ферментативными и не ферментативными механизмами, обеспечивающими низкий стационарный уровень АФК, свободных радикалов и молекулярных продуктов окисления с их участием (Vladimirov, 1994; Halliwell, Gutteridge, 1999). При этом гомеостаз АФК, необходимый для жизнедеятельности клетки, обеспечивается сбалансированным функционированием про- и антиоксидантной систем (Vladimirov, Proskurnina, 2009).

Общеизвестно, что воздействие на биологические объекты стрессовых факторов разной природы (физических, химических, биологических) вызывает в них образование избыточ-

ного уровня АФК (Vladimirov, 1994; Halliwell, Gutteridge, 1999; Apel, Hirt, 2004; Jaspers, Kangasjarvi, 2010). В свою очередь, генерация большого количества АФК может инициировать развитие оксидативного стресса и разветвленные цепи окислительных реакций (в том числе перекисное окисление липидов – ПОЛ), приводящих к повреждениям биомакромолекул (белки, ДНК), клеточных структур и в конечном итоге гибели клетки (Vladimirov, Proskurnina, 2009; Yin et al., 2011). Хорошо известно, что ключевую роль в защите живых организмов от повреждающего действия АФК выполняет антиоксидантная система, которая включает участвующие в метаболизме АФК ферменты (прежде всего, супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы) и низкомолекулярные соединения (токоферол, аскорбиновая кислота, флавоноиды, восстановленный глутатион, и т.д.), взаимодействующие с активными радикалами (Vladimirov, 1994; Halliwell, Gutteridge, 1999; Vladimirov et al., 2009). Функционирование данной системы нейтрализует избыток АФК и обеспечивает защиту биологических структур клетки, препятствуя окислению внутриклеточных органических соединений и участвуя в детоксикации вторичных метаболитов (Apel, Hirt, 2004).

Следует отметить, что в исследованиях светящихся базидиомицетов *Neonothopanus nambi* и *Armillaria borealis* мы обнаружили многократное усиление их световой эмиссии при воздействии разных стрессовых факторов – инкубация в деионизованной воде, механическое повреждение, радиационное излучение (Bondar et al., 2011, 2013; Medvedeva et al., 2014; Kobzeva et al., 2014; Mogilnaya et al., 2015, 2016). Это позволило высказать гипотезу, что световое излучение высших грибов может являться дополнительным механизмом защиты от повреждающего действия избытком АФК при стрессе (Bondar et al., 2015; Mogilnaya et al., 2015, 2016). Такая ги-

потеза правомочна, поскольку идея о защитной роли биолюминесценции от повреждения живых организмов активными радикалами кислорода была высказана в середине прошлого века (McElroy, Strehler, 1949; McElroy, Seliger, 1961) и получила развитие в ряде дальнейших исследований (Watanabe et al., 1993; Barros, Bechara, 1998; Szpilewska et al., 2003; Katsev et al., 2004).

Совокупность изложенных фактов свидетельствует, что исследования, направленные на выявление взаимосвязей между интенсивностью окислительных процессов с участием АФК, эффективностью функционирования антиоксидантной системы и уровнем световой эмиссии, имеют фундаментальное значение для развития представлений о механизмах свечения высших грибов.

Настоящая работа посвящена изучению интенсивности свечения мицелия базидиомицета *Neonothopanus nambi*, активности его антиоксидантных ферментов и накопления продуктов перекисного окисления липидов в условиях стресса после механического повреждения.

Материалы и методы

В исследованиях использовали образцы пленочного мицелия базидиомицета *N. nambi* IBSO 2391 из Коллекции микроорганизмов (CCIBSO 836) ИБФ СО РАН, который выращивали в чашках Петри на жидкой питательной картофельно-сахарозной среде (200 г картофеля, 20 г сахарозы, 1 л дистиллированной воды) разработанным ранее способом (Bondar et al., 2011). Культивирование гриба проводили в темноте при температуре 26 °С в течение 8–10 суток. Для экспериментов из полученного пленочного мицелия высекали диски диаметром 12 мм, которые помещали в свежую питательную картофельно-сахарозную среду и инкубировали в ней при температуре 22–23 °С в течение 4–5 часов. Это позволяло оценить

эффект механического повреждения мицелия на интенсивность его свечения, уровень активности ферментов, участвующих в метаболизме АФК, и уровень ПОЛ.

В ходе инкубации дисков мицелия *N. nambi* через каждые 30 мин регистрировали интенсивность их свечения на люминометре Glomax 20/20 (Promega, США) со скоростью 1 измерение в 1 секунду. Уровень световой эмиссии выражали в относительных люминесцентных единицах (RLU). В сравнительных экспериментах оценивали также уровень свечения гриба при инкубации дисков мицелия в питательной среде, содержащей нитросиний тетразолий (НСТ) (Sigma, США) в концентрациях 0,01, 0,05 и 0,1 % соответственно. Для определения активности антиоксидантных ферментов в механически поврежденном грибе через определенные промежутки времени часть дисков мицелия извлекали из питательной среды и промывали деионизированной (DI) водой (Milli-Q system, Millipore, США) для удаления остатков питательной среды и метаболитов. Экстракты, содержащие изучаемые ферменты, получали при механическом разрушении мицелия в 2 мл DI воды с помощью гомогенизатора (система стекло-стекло) с последующим удалением клеточных обломков центрифугированием (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Германия) при 16000 g в течение 15 мин при 10 °С.

Уровни активности участвующих в метаболизме АФК ферментов в экстрактах мицелия *N. nambi* оценивали следующим образом. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли методом, изложенным в работе Polesskaya et al. (2004). При этом реакционная смесь содержала: 0,9 мл 0,05 М К/Na-фосфатного буфера (рН 7,8), 0,5 мл 0,05 % раствора НСТ, 20 мкл 0,24 % раствора Na-ЭДТА и 100 мкл экстракта. Реакцию инициировали добавлением 20 мкл 0,025 % рибофлавина. Активность каталазы тестировали методом Aebi (1984). В данном

случае реакционная смесь включала: 1,0 мл 0,05 М К/Na-фосфатного буфера (рН 7,0) и 10 мкл экстракта мицелия. Реакцию запускали внесением в реакционную смесь 10 мкл 0,6 М перекиси водорода. Общую пероксидазную активность определяли методом Wi et al. (2012), используя реакционную смесь, которая содержала: 750 мкл 0,1 М ацетатного буфера (рН 4,6), 100 мкл 0,33 М раствора орто-фенилендиамина, 100 мкл 0,05 М раствора перекиси водорода и 50 мкл экстракта. Уровни активности СОД, каталазы и общей пероксидазной активности оценивали по образованию продуктов катализируемых ими реакций, выход которых регистрировали на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) по величине поглощения при длинах волн 560, 240 и 420 нм соответственно. Активность ферментов выражали в относительных единицах оптической плотности на 1 г сырой биомассы.

Интенсивность ПОЛ в механически поврежденном мицелии *N. nambi* оценивали по содержанию первичных и конечных продуктов – диеновых конъюгатов (ДК) и оснований Шиффа (ОШ) соответственно. Для этого часть инкубируемых дисков мицелия извлекали из питательной среды через определенные промежутки времени и промывали DI водой, после чего замораживали, лиофилизовали и определяли вес сухой биомассы каждого образца. При количественной оценке уровня ДК липидные компоненты из высушенной биомассы мицелия экстрагировали смесью растворителей гептан-изопропанол (соотношение 1:1, v/v) с последующим разделением фаз, в соответствии с методом (Placer, 1968; Хышиктуев и др., 1996). Авторы данного метода показали, что уровни содержания ДК в фазах гептана и изопропанола отражают интенсивность происходящих в биологическом образце процессов перекисного окисления нейтральных липидов и фосфолипидов соответственно. Содержание ДК в разделенных фазах экстракта определяли

спектрофотометрически (UV-1800) по величине поглощения при длине волны 232 нм и выражали в единицах оптической плотности (OD) на 1 г сухой биомассы. При оценке уровня ОШ экстракцию липидных компонентов из сухого мицелия *N. nambi* проводили смесью растворителей хлороформ-метанол (соотношение 2:1, v/v) по методу Fletcher et al. (1973). Содержание ОШ в полученных экстрактах определяли по величине их флуоресценции (спектрофлуориметр Varian Cary Eclipse, Agilent Technologies, США), регистрируемой в диапазоне длин волн 400–600 нм после возбуждения облучением при длине волны 360 нм, и выражали в единицах максимальной световой эмиссии на 1 г сухой биомассы.

В сравнительных исследованиях в качестве контроля использовали диски мицелия *N. nambi*, которые не инкубировали в питательной среде. Сразу после высечения из пленочного мицелия и измерения интенсивности свечения контрольных дисков из них получали экстракты для определения активности антиоксидантных ферментов и содержания продуктов ПОЛ (ДК и ОШ), как это изложено выше.

Эксперименты для определения каждого из изучаемых показателей проводили в четырех-пяти повторах (n). Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с помощью стандартного пакета программ Microsoft Excel. Результаты представлены как средние арифметические (M) со стандартным отклонением (\pm SD). Сравнительный анализ на достоверность различий между средними значениями контрольных и опытных данных проводили с помощью критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney U test), различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В экспериментах было показано, что в ходе инкубации механически поврежденного мице-

лия *N. nambi* в питательной среде наблюдается значительное увеличение уровня его свечения (рис. 1). Из представленных данных видно, что интенсивность световой эмиссии дисков мицелия уже в течение 3–4 часов инкубации может возрасти по сравнению с исходным уровнем на несколько порядков – от $6,6 \cdot 10^6$ до $1,8 \cdot 10^9$ RLU. Эти данные согласуются с результатами наших предыдущих исследований, в которых было показано, что механическое повреждение мицелия базидиомицета *N. nambi* сопровождается значительным увеличением его свечения (Bondar et al., 2011; Kobzeva et al., 2014;

Medvedeva et al., 2014). При этом был обнаружен дозозависимый эффект подавления световой эмиссии инкубируемого мицелия (рис. 1) добавками НСТ от 0,01 до 0,1 %. Поскольку известно, что НСТ является ловушкой супероксид анион-радикала (Peskin, Winterbourn, 2000), наблюдаемое ингибирование свечения указывает на образование этой АФК в механически поврежденном мицелии *N. nambi*. В пользу активного образования супероксид анион-радикала и иных форм АФК в поврежденном мицелии свидетельствуют также результаты его визуально наблюдаемого синего окраши-

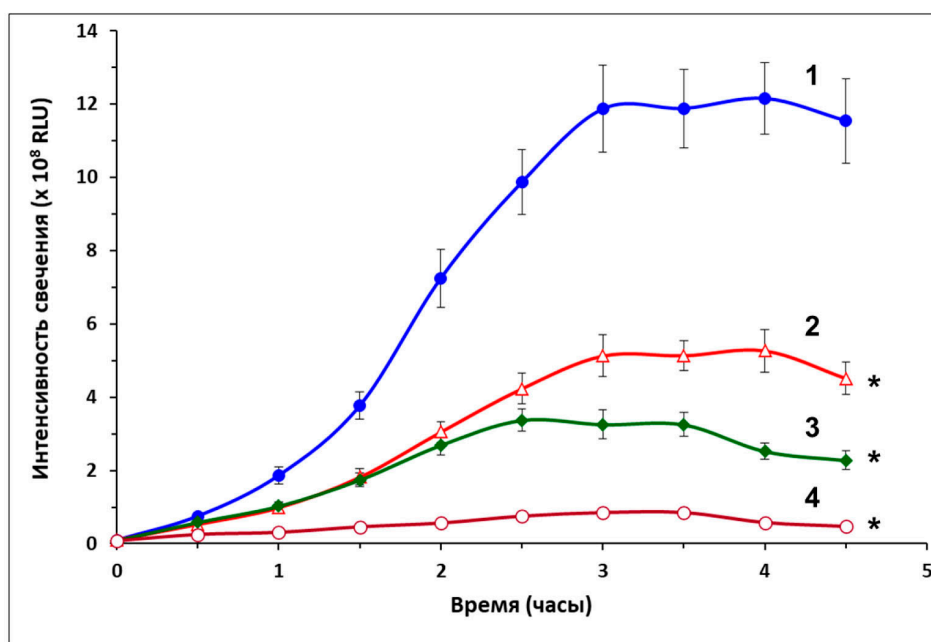


Рис. 1. Интенсивность свечения механически поврежденного мицелия базидиомицета *N. nambi* в зависимости от времени его инкубации в питательной среде: 1 – контроль (без каких-либо добавок), 2–4 – добавки в среду инкубации нитросинего тетразолия до концентрации 0,01, 0,05 и 0,1% соответственно. За нулевое значение принят уровень свечения образцов, зарегистрированный сразу после повреждения мицелия. Представлены средние значения интенсивности свечения ($M \pm SD$) из 5 независимых определений. Здесь и на последующих рисунках достоверные различия ($p < 0,05$) между средними значениями контрольных и опытных данных отмечены значком (*)

Fig. 1. The luminescence intensity of mechanically damaged mycelium of basidiomycete *N. nambi*, as dependent on the time of its incubation in a nutrient medium: 1 - control (without any additives), 2–4 – with nitro blue tetrazolium added to the incubation medium to a concentration of 0.01, 0.05 and 0.1%, respectively. The luminescence level of the samples recorded immediately after damage to the mycelium is taken as zero. The average values of the luminous intensity ($M \pm SD$) from 5 independent determinations are presented. Here and in the following figures, significant differences ($p < 0.05$) between the mean values of the control and experimental data are marked with an asterisk (*)

вания, которое нарастает в ходе инкубации дисков в питательной среде, содержащей 0,1 % НСТ (рис. 2). Хорошо известно, что взаимодействие НСТ с активными радикалами кислорода и прежде всего с супероксид анион-радикалом сопровождается образованием диформаза, имеющего темно-синий цвет (Anderson, Deinard, 1974). В свою очередь, известно, что супероксид анион-радикал является первичным радикалом и инициирует сложный механизм образования иных реакционно-активных АФК – пероксида водорода и гидроксил иона, стимулирующих разветвленные цепи окисления липидов и развитие ПОЛ (Vladimirov, Proskurnina, 2009).

С одной стороны, представленные данные (рис. 1 и рис. 2) согласуются с общепринятыми представлениями о механизме возникновения и развития оксидативного стресса и указывают на интенсивное образование АФК в механически поврежденном мицелии базидиомицета *N. nambi*. В то же время они свидетельствуют в пользу участия АФК в механизме свечения высших грибов и стимуляции грибного свечения при интенсивном образовании радикалов кислорода в условиях стресса. В частности, мы предполагаем, что этот эффект обеспечивается активным образованием в поврежденном грибе

пероксида водорода. Ранее мы показали, что этот кислородный радикал стимулирует свечение мицелия гриба *N. nambi* и выделенной из него люминесцентной системы (Bondar et al., 2011, 2014). При этом выявленное в эксперименте ингибирующее действие НСТ может быть вызвано нейтрализацией образующегося в грибе при стрессе супероксид анион-радикала и невозможностью его дальнейшей трансформации в иные формы АФК, что может осуществляться неферментативно за счет спонтанной дисмутации в кислород и пероксид водорода и/или ферментативно под действием СОД (Vladimirov, Proskurnina, 2009).

Как показали исследования, при максимальной интенсивности свечения мицелия *N. nambi*, которое наблюдается через 3–4,5 часа после механического повреждения (рис. 1), в нем регистрируется существенное снижение общей пероксидазной активности и активности СОД (более чем в 2 и 1,5 раза соответственно, через 3,5 часа инкубации), по сравнению с исходным уровнем активности этих ферментов (рис. 3). При этом было показано, что уровень каталазы в мицелии снижался в значительно меньшей степени (примерно на 7–10 %). Из представленных данных (рис. 1 и рис. 3) следует, что высо-

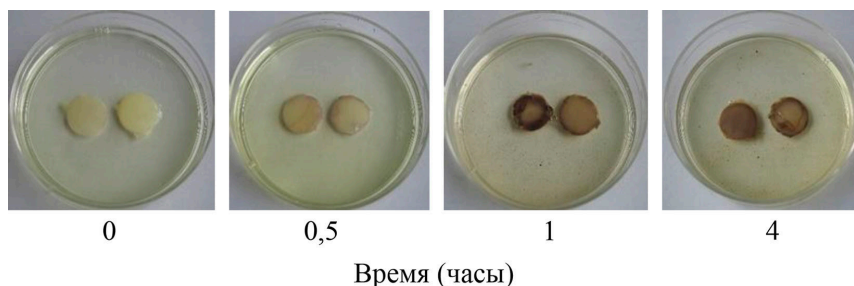


Рис. 2. Динамика изменения цвета дисков мицелия *N. nambi* в ходе их инкубации в питательной среде с добавлением 0,1% нитросинего тетразолия, отражающая процесс образования диформаза при взаимодействии красителя с активными радикалами кислорода. За нулевое значение принят момент помещения дисков в инкубационную среду

Fig. 2. The dynamics of changes in color of *N. nambi* mycelium discs incubated in a nutrient medium supplemented with 0.1% nitro blue tetrazolium, reflecting process of diformazan formation during interaction of the dye with active oxygen radicals. The moment of placing the discs in the incubation medium is taken as zero

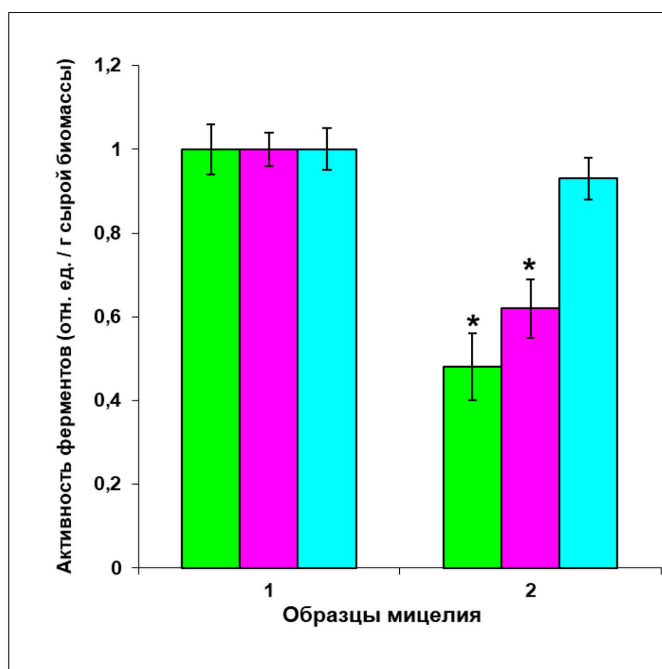


Рис. 3. Уровень активности ферментов-антиоксидантов у базидиомицета *N. namby* после его механического повреждения – сразу после высечения дисков мицелия (1) и на максимуме их световой эмиссии при инкубации в питательной среде в течение 3,5 часов (2): общая пероксидазная активность (зеленые столбцы), активность СОД (сиреневые столбцы), активность каталазы (голубые столбцы). Показания в рядах измерений нормированы на значения активности изучаемых ферментов в начальный момент после механического повреждения мицелия. Здесь и на рис. 4 данные представлены в виде $M \pm SD$, при $n = 5$ для каждого определения

Fig. 3. The level of activity of antioxidant enzymes in mechanically damaged basidiomycete *N. namby* – immediately after excision of mycelium discs (1) and at the maximum of their light emission during 3.5-hour incubation in a nutrient medium (2): total peroxidase activity (green columns), SOD activity (purple columns), catalase activity (blue columns). Indications in series of measurements are normalized to the values of the activity of the studied enzymes at the initial moment after mechanical damage to the mycelium. Here and in Fig. 4 the data are presented as $M \pm SD$, where $n = 5$ for each determination

кий уровень световой эмиссии поврежденного мицелия наблюдается на фоне значительного снижения активности участвующих в метаболизме АФК ферментов (пероксидаз и СОД). С одной стороны, это свидетельствует о том, что на начальном этапе развития оксидативного стресса ферменты антиоксидантной защиты гриба могут подвергаться инактивации (или деградации) высокотоксичными радикалами кислорода, прежде всего пероксинитритом и гидроксил-радикалом. Известно, что эти радикалы могут образоваться при взаимодействии супероксида с монооксидом азота, син-

тезируемым митохондриальной NO-синтазой, и трехвалентным железом ферритина и железосерных комплексов цепей переноса электронов (Vladimirov et al., 2009; Vladimirov, Proskurnina, 2009). В то же время результаты проведенных исследований (рис. 1 и рис. 3) позволяют предполагать, что в начальный период развития стресса эффективность функционирования классической антиоксидантной системы гриба может снижаться. В этом случае значительное увеличение уровня световой эмиссии мицелия можно рассматривать как дополнительный (компенсаторный) механизм защиты гриба

от повреждения избытком АФК (прежде всего H_2O_2 и иных пероксидных соединений, которые нейтрализуются в реакции излучения света).

В пользу протекторной функции грибного свечения, которое препятствует развитию инициируемых радикалами кислорода цепей окислительных реакций при оксидативном стрессе, свидетельствует также сравнительный анализ содержания начальных и конечных продуктов ПОЛ в биомассе контрольных (сразу после механического повреждения) и опытных (максимальная интенсивность свечения при инкубации) образцов мицелия *N. nambi*. Из результатов исследований экстрактов видно (рис. 4), что при высокой интенсивности све-

товой эмиссии инкубируемого мицелия в нем наблюдается значительное снижение уровня ДК, по сравнению с контрольным мицелием с невысоким начальным уровнем свечения. При этом снижение уровня ДК отмечается как в фазе гептана, так и в фазе изопропанола – в 1,4 и 3,1 раза соответственно (рис. 4). Поскольку в фазе изопропанола экстрактов из контрольных образцов мицелия было обнаружено значительно большее содержание ДК (рис. 4) по сравнению с их содержанием в фазе гептана, это позволяет говорить, что в поврежденном мицелии *N. nambi* перекисное окисление фосфолипидов идет гораздо интенсивнее, чем перекисное окисление нейтральных липидов. Такой вы-

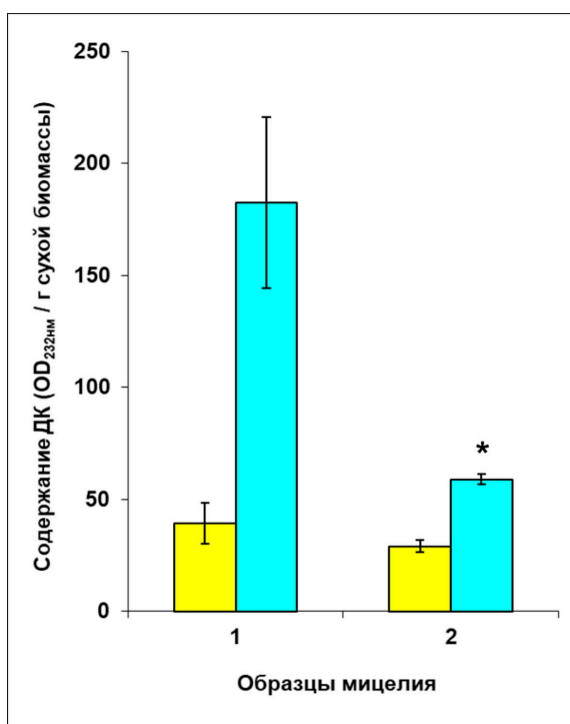


Рис. 4. Уровень содержания диеновых конъюгатов (ДК) в биомассе мицелия *N. nambi* до (1) и после (2) инкубации дисков в питательной среде в течение 4 часов. Количественную оценку ДК проводили в экстрактах из биомассы гриба смесью гептана (желтые столбцы) и изопропанола (голубые столбцы) и последующего разделения фаз

Fig. 4. The level of diene conjugates (DC) in biomass of *N. nambi* mycelium before (1) and after (2) 4-hour incubation of discs in a nutrient medium. The quantitative assessment of DC was carried out in extracts from the fungal biomass with a mixture of heptane (yellow columns) and isopropanol (blue columns) and subsequent phase separation

вод можно считать правомочным, так как он согласуется с мнением других авторов, что уровни ДК в фазах гептана и изопропанола отражают интенсивность происходящих в биологических объектах процессов перекисного окисления нейтральных липидов и фосфолипидов соответственно (Placer, 1968; Хышиктуев и др., 1996). В экспериментах было показано также, что в образцах поврежденного мицелия *N. nambi* с высоким уровнем свечения при инкубации наблюдается существенное снижение содержания ОШ по сравнению с контрольными образцами (рис. 5). Из представленных данных следует, что в биомассе ярко светящегося мицелия обнаруживается практически в 3 раза меньше конечных продуктов ПОЛ. Со-

вокупность представленных данных (рис. 4 и рис. 5) позволяет говорить, что биолюминесценция базидиомицета *N. nambi* является его защитной функцией и препятствует развитию ПОЛ в условиях стресса.

Заключение

Таким образом, на примере исследований мицелия светящегося базидиомицета *N. nambi* показана взаимосвязь между уровнем световой эмиссии гриба, активностью ферментов его антиоксидантной системы и интенсивностью окислительных процессов в стрессовых условиях. Установлено, что развитие окислительного стресса после механического повреждения грибного мицелия сопровождается значитель-

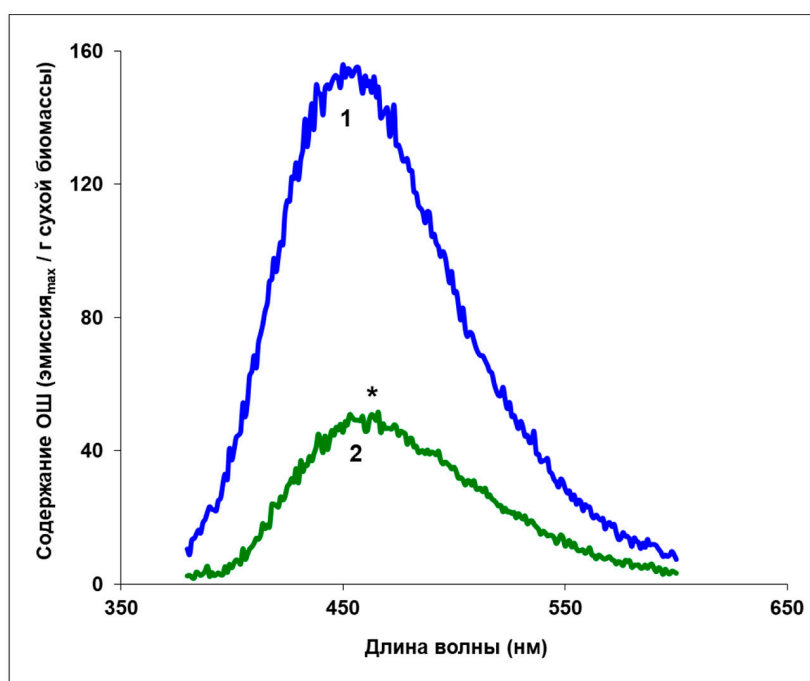


Рис. 5. Уровень интенсивности флуоресценции хлороформ-метанольных экстрактов из образцов мицелия *N. nambi*, отражающий содержание оснований Шиффа (ОШ) в биомассе гриба. Экстракция ОШ проведена из дисков мицелия до (1) и после (2) их инкубации 4 часа в питательной среде. Представлены средние значения уровней флуоресценции из 4-х независимых определений

Fig. 5. The level of fluorescence intensity of chloroform- methanol extracts from *N. nambi* mycelium samples, reflecting the content of Schiff bases (SBs) in biomass of the fungus. Extraction of SBs was carried out from mycelium disks before (1) and after (2) their 4-hour incubation in a nutrient medium. The average values of the fluorescence levels from 4 independent determinations are presented

ным (на порядок) увеличением интенсивности его свечения. Показано, что при максимальном уровне световой эмиссии в грибе регистрируется снижение активности ферментов, участвующих в метаболизме АФК – в значительной степени пероксидаз и СОД, в меньшей степени каталазы. С одной стороны, это свидетельствует о том, что на начальном этапе развития стресса защитная функция классической антиоксидантной системы гриба может быть недостаточно эффективной. В то же время значительное увеличение уровня биолюминесценции можно рассматривать как компенсаторный механизм защиты гриба от повреждения избытком АФК (в частности, H_2O_2

и других пероксидных соединений, которые нейтрализуются в реакции светоизлучения). В свою очередь, нейтрализация избыточного пула активных радикалов кислорода, образующихся в стрессовых условиях, препятствует развитию в грибе процессов свободнорадикального окисления, в частности ПОЛ. На это указывает существенное снижение содержания первичных и конечных продуктов ПОЛ, обнаруженное в биомассе ярко светящегося мицелия. Пока недостаточно ясно, могут ли продукты ПОЛ утилизироваться в реакции свечения или вовлекаются в метаболические циклы гриба – изучение этого вопроса требует отдельного исследования.

Список литературы / References

- Хышиктеув Б. С., Хышиктеуева Н. А., Иванов В. Н. (1996) Методы определения продуктов перекисного окисления липидов в конденсате выдыхаемого воздуха и их клиническое значение. *Клиническая лабораторная диагностика*, 3: 13–15 [Khyshiktuev B. S., Khyshiktueva N. A., Ivanov V. N. (1996) Methods of measuring lipid peroxidation products in exhaled air condensate and their clinical significance. *Klinicheskaja laboratornaia diagnostika*, 3: 13–15 (in Russian)]
- Aebi H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105: 121–126
- Anderson G. L., Deinard A. S. (1974) The nitroblue tetrazolium (NBT) test: a review. *American Journal of Medical Technology*, 40(8): 345–353
- Apel K., Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373–399
- Barros M. P., Bechara E. J. H. (1998) Bioluminescence as a possible auxiliary oxygen detoxifying mechanism in elaterid larvae. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(5): 767–777
- Bondar V. S., Puzyr A. P., Purtov K. V., Medvedeva S. E., Rodicheva E. K., Gitelson J. I. (2011) The luminescent system of the luminous fungus *Neonothopanus nambi*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 438(1): 138–140
- Bondar V. S., Shimomura O., Gitelson J. I. (2012a) Luminescence of higher mushrooms. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 5(4): 331–351
- Bondar V. S., Puzyr A. P., Purtov K. V., Medvedeva S. E., Rodicheva E. K., Kalacheva G. S., Gitelson J. I. (2012b) A study of *Neonothopanus nambi* luminescent system. *Luminescence*, 27: 101–102
- Bondar V. S., Rodicheva E. K., Medvedeva S. E., Tyulkova N. A., Tyaglik A. B., Shpak B. A., Gitelson J. I. (2013) On the mechanism of luminescence of the fungus *Neonothopanus nambi*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 449(1): 80–83
- Bondar V. S., Puzyr A. P., Purtov K. V., Petunin A. I., Burov A. E., Rodicheva E. K., Medvedeva S. E., Shpak B. A., Tyaglik A. B., Shimomura O., Gitelson I. I. (2014) Isolation of luminescence system from the luminescent fungus *Neonothopanus nambi*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 455(1): 56–58

- Bondar V. S., Puzyr A. P., Burov A. E., Medvedeva S. E., Rodicheva E. K., Kobzeva T. V., Melnikov A. R., Karogodina T. Y., Zikirin S. B., Stass D. V., Molin Yu. N., Gitelson J. I. (2015) Effect of ionizing radiation on the luminescence of mycelium of luminous fungus *Neonothopanus nambi*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 460(1): 30–33
- Desjardin D. E., Oliveira A. G., Stevani C. V. (2008) Fungi bioluminescence revisited. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 7(2): 170–182
- Fletcher B. L., Dillard C. J., Tappel A. L. (1973) Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Analytical Biochemistry*, 52(1): 1–9
- Garcia-Iriepa C., Losantos R., Fernandez-Martinez D., Sampedro D., Navizet I. (2020) Fungal light emitter: understanding its chemical nature and pH-dependent emission in water solution. *Journal of Organic Chemistry*, 85(8): 5503–5510
- Gitelson J. I., Bondar V. S., Medvedeva S. E., Rodicheva E. K., Vydryakova G. A. (2012) Chemiluminescent emission of tissues of fruit bodies of higher fungi. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 443(1): 105–108
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1999) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, Oxford Press, 936 p.
- Harvey E. N. (1952) *Bioluminescence*. New York, Academic Press, 649 p.
- Harvey E. N. (1957) *A history of luminescence from the earliest times until 1900*. Baltimore, Maryland, J. H. Furst Company, 768 p.
- Jaspers P., Kangasjarvi J. (2010) Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiologia Plantarum*, 138(4): 405–413
- Johnson F. H., Haneda Y. (1966) *Bioluminescence in progress*. Princeton, Princeton University Press, 664 p.
- Kaskova Z. M., Dörr F. A., Petushkov V. N., Purtov K. V., Tsarkova A. S., Rodionova N. S., Mineev K. S., Guglya E. B., Kotlobay A., Baleeva N. S., Baranov M. S., Arseniev A. S., Gitelson J. I., Lukyanov S., Suzuki Y., Kanie Sh., Pinto E., Mascio P. D., Waldenmaier H. E., Pereira T. A., Carvalho R. P., Oliveira A. G., Oba Yu., Bastos E. L., Stevani C. V., Yampolsky I. V. (2017) Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. *Science Advances*, 3(4): e1602847
- Katsev A. M., Wegrzyn G., Szpilewska H. (2004) Effects of hydrogen peroxide on light emission by various strains of marine luminescent bacteria. *Journal of Basic Microbiology*, 44(3): 178–184
- Kobzeva T. V., Melnikov A. R., Karogodina T. Y., Zikirin S. B., Stass D. V., Molin Yu. N., Rodicheva E. K., Medvedeva S. E., Puzyr A. P., Burov A. A., Bondar V. S., Gitelson J. I. (2014) Stimulation of luminescence of mycelium of luminous fungus *Neonothopanus nambi* by ionizing radiation. *Luminescence*, 29(7): 703–710
- Kotlobay A. A., Sarkisyan K. S., Mokrushina Y. A., Marcet-Houben M., Serebrovskaya E. O., Markina N. M., Somermeyer L. G., Gorokhovatsky A. Y., Vvedensky A., Purtov K. V., Petushkov V. N., Rodionova N. S., Chepurnyh T. V., Fakhranurova L. I., Guglya E. B., Ziganshin R., Tsarkova A. S., Kaskova Z. M., Shender V., Abakumov M., Abakumova T. O., Povolotskaya I. S., Eroshkin F. M., Zairisky A. G., Mishin A. S., Dolgov S. V., Mitiouchkina T. Y., Kopantzev E. P., Waldenmaier H. E., Oliveira A. G., Oba Yu., Barsova E., Bogdanova E. A., Gabaldón T., Stevani C. V., Lukyanov S., Smirnov I. V., Gitelson J. I., Kondrashov F. A., Yampolsky I. V. (2018) Genetically encodable bioluminescent system from fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(50): 12728–12732

McElroy W.D., Strehler B. L. (1949) Factors influencing the response of the bioluminescent reaction to adenosine triphosphate. *Archives of Biochemistry*, 22(3): 420–433

McElroy W.D., Seliger H. H. (1961) Mechanisms of bioluminescent reactions. *Light and life*. McElroy W.D., Glass B. (eds.) Baltimore, Johns Hopkins Press, p. 219–257

Medvedeva S. E., Artemenko K. S., Krivosheenko A. A., Rusinova A. G., Rodicheva E. K., Puzyr A. P., Bondar V. S. (2014) Growth and light emission of luminous basidiomycetes cultivated on solid media and in submerged culture. *Mycosphere*, 5(4): 565–577

Mogilnaya O. A., Ronzhin N. O., Medvedeva S. E., Bondar V. S. (2015) Total peroxidase and catalase activity of luminous basidiomycetes *Armillaria borealis* and *Neonothopanus nambi* in comparison with the level of light emission. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(4): 419–424

Mogilnaya O. A., Ronzhin N. O., Bondar V. S. (2016) Comparative evaluation of total peroxidase and catalase activities during light emission of luminous fungus *Neonothopanus nambi*. *Mycosphere*, 7(4): 499–510

Oba Y., Suzuki Y., Martins G. N. R., Carvalho R. P., Pereira T. A., Waldenmaier H. E., Kanie S., Naito M., Oliveira A. G., Dörr F. A., Pinto E., Yampolsky I. V., Stevani C. V. (2017) Identification of hispidin as a bioluminescent active compound and its recycling biosynthesis in the luminous fungal fruiting body. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 16(9): 1435–1440

Peskin A. V., Winterbourn C. C. (2000) A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clinica Chimica Acta*, 293(1–2): 157–166

Placer Z. (1968) Lipoperoxidation systeme im biologischen material. *Die Nahrung*, 12: 679–684

Polesskaya O. G., Kashirina E. I., Alekhina N. D. (2004) Changes in the activity of antioxidant enzymes in wheat leaves and roots as a function of nitrogen source and supply. *Russian Journal of Plant Physiology*, 51(5): 615–620

Purtov K. V., Petushkov V. N., Baranov M. S., Mineev K. S., Rodionova N. S., Kaskova Z. M., Tsarkova A. S., Petunin A. I., Bondar V. S., Rodicheva E. K., Medvedeva S. E., Oba Yu., Oba Yu., Arseniev A. S., Lukyanov S., Gitelson J. I., Yampolsky I. V. (2015) The chemical basis of fungal bioluminescence. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(28): 8124–8128

Puzyr A. P., Burov A. E., Medvedeva S. E., Burova O. G., Bondar V. S. (2019) Two forms of substrate for the bioluminescent reaction in three species of basidiomycetes. *Mycology*, 10(2): 84–91

Shimomura O. (1992) The role of superoxide dismutase in regulating the light emission of luminescent fungi. *Journal of Experimental Botany*, 43(11): 1519–1525

Shimomura O., Satoh S., Kishi Y. (1993) Structure and non-enzymatic light emission of two luciferin precursors isolated from the luminous mushroom *Panellus stipticus*. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 8(4): 201–205

Shimomura O. (2006) *Bioluminescence: chemical principles and methods*. Singapore, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 470 p.

Szpilewska H., Czyz A., Wegrzyn G. (2003) Experimental evidence for the physiological role of bacterial luciferase in the protection of cells against oxidative stress. *Current Microbiology*, 47(5): 379–382

Vladimirov Yu. A. (1994) Intrinsic chemiluminescence of living tissues. *Free radicals in the environment, medicine and toxicology*. Nohl H., Esterbauer H., Rice-Evans C. (eds.) London, Richelieu Press, p. 345–373

Vladimirov Yu. A., Proskurnina E. V. (2009) Free radicals and cell chemiluminescence. *Biochemistry (Moscow)*, 74(13): 1545–1566

Vladimirov Yu.A., Proskurnina E. V., Demin E. M., Matveeva N. S., Lubitskiy O. B., Novikov A. A., Izmailov D. Yu., Osipov A. N., Tikhonov V. P., Kagan V. E. (2009) Dihydroquercetin (taxifolin) and other flavonoids as inhibitors of free radical formation at key stages of apoptosis. *Biochemistry (Moscow)*, 74(3): 301–307

Watanabe H., Nagoshi T., Inaba H. (1993) Luminescence of a bacterial luciferase intermediate by reaction with H₂O₂: the evolutionary origin of luciferase and source of endogenous light emission. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1141(2–3): 297–302

Wi S. J., Ji N. R., Park K. Y. (2012) Synergistic biosynthesis of biphasic ethylene and reactive oxygen species in response to hemibiotrophic phytophthora parasitica in tobacco plants. *Plant Physiology*, 159(1): 251–265

Yin H., Xu L., Porter N. A. (2011) Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111(10): 5944–5972