

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Ветчинкина Елена Павловна

**Особенности метаболизма ксилотрофных базидиомицетов
в процессе онтогенеза и применение грибных метаболитов
в био(нано)технологии**

Специальность 1.5.18. Микология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена в лаборатории микробиологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленном структурном подразделении Федерального исследовательского центра «Саратовском научном центре Российской академии наук»

Научный консультант: *Никитина Валентина Евгеньевна*
профессор, доктор биологических наук

Официальные оппоненты: *Краснопольская Лариса Михайловна* – доктор биологических наук, академик РАН, Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, лаборатория биосинтеза биологически активных веществ, заведующая лабораторией.
Теплякова Тамара Владимировна – доктор биологических наук, профессор, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, отдел биофизики и экологических исследований, лаборатория микологии, заведующая лабораторией.
Терёшина Вера Михайловна – доктор биологических наук, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, группа экспериментальной микологии, руководитель группы.

Защита диссертации состоится «30» октября 2026 г. в 15 часов 35 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.6 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, кафедра гидробиологии, аудитория М-1.
E-mail: dissovet_00155@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3976>
Автореферат разослан «__» августа 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Д.М. Гершкович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Онтогенез базидиальных макромицетов представляет собой сложный многогранный комплекс событий, затрагивающий физиологические, структурные, генетические и метаболические процессы. Это важная в научном и практическом отношении область микологии, и несмотря на активизацию исследований в последнее время, многое предстоит узнать (Pelkmans *et al.*, 2016).

Молекулярно-физиологические аспекты роста и развития базидиомицетов изучены недостаточно, исследования проведены на немногих модельных видах, ограниченном круге вопросов и носят разрозненный характер (Kües *et al.*, 2002; Knabe *et al.*, 2013; Conrad *et al.*, 2014; Böttcher *et al.*, 2016; Schuhmacher *et al.*, 2024). Кроме того, они не затрагивали характерные стадии онтогенеза грибов, образование которых необходимо для перехода к плодоношению.

В последние полтора десятилетия происходит стремительное накопление геномных и транскриптомных данных. Развитие методов транскриптомного профилирования переводит исследования на новый уровень, позволяя изучать полный набор транскриптов, синтезируемых в клетке, что важно для понимания молекулярных механизмов морфогенеза грибов (Sipos *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2021; Marian *et al.*, 2022; Xie *et al.*, 2023).

На момент начала нашей работы, исследования по секвенированию немодельных организмов носили единичный характер. Первые попытки полногеномного секвенирования *de novo* мицелия *L. edodes*, были представлены практически без аннотации (Tang *et al.*, 2013; Zhong *et al.*, 2013; Shim *et al.*, 2016). Назрела необходимость в полномасштабной функциональной аннотации генов в процессе онтогенеза съедобного лекарственного базидиомицета *L. edodes*.

Понимание молекулярно-физиологических аспектов морфогенеза базидиомицетов и механизмов формирования плодовых тел, представляет интерес и для коммерческого производства экономически ценных культур. Потенциал грибов в плане получения высокоэффективных биологически активных и лекарственных препаратов огромен, и в настоящее время это

направление набирает популярность. В основном используют полисахаридные фракции и терпеноиды плодовых тел (Wasser, 2014; Krasnopolskaya *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2023). Гораздо менее изучены гликопротеины мицелия и метаболиты низкомолекулярной природы макромицетов.

Также грибные метаболиты могут быть использованы в экологически безопасном «зеленом» синтезе наночастиц (Li *et al.*, 2022). Нанотехнологии быстро развиваются и вносят большой вклад в развитие здравоохранения, оптики, химической и пищевой промышленности, охраны окружающей среды (Ahmed *et al.*, 2016). Преимуществом базидиомицетов является их способность продуцировать широкий спектр соединений, переводящих ионы металлов в нетоксичные формы с образованием наночастиц, и аккумулировать их внутри и вне клетки. Несомненной помощью для идентификации генов, связанных с синтезом таких соединений, будет транскриптомный анализ.

Таким образом, очевидна актуальность исследований молекулярно-физиологических аспектов онтогенеза съедобных и лекарственных базидиомицетов с точки зрения фундаментальных и прикладных аспектов.

Цели и задачи исследований

Целью работы была характеристика метаболизма ксилотрофных базидиомицетов в процессе онтогенеза и выявление у них биологически активных метаболитов для использования в био(нано)технологии.

Для достижения поставленной цели были сформулированы задачи:

1. Изучить физиолого-биохимические особенности морфогенеза ксилотрофных базидиомицетов *Pleurotus ostreatus*, *Armillaria mellea*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa* и *Ganoderma lucidum* в ходе их онтогенеза при различных условиях культивирования.
2. Дать характеристику ультраструктуры, химического состава (содержания белков, углеводов, пигментов), активности ферментов и лектинов мицелиальных пленок ксилотрофных базидиомицетов.

3. Провести сравнительный анализ транскриптомных профилей базидиомицета *L. edodes* и особенностей его метаболизма в онтогенезе (от непигментированного мицелия к коричневой мицелиальной пленке, образованию примордия и плодового тела). Идентифицировать гены, ответственные за синтез биологически активных метаболитов (ферментов, лектинов, пигментов, терпеноидов и др.), применяемых в био(нано)технологии.

4. Сопоставить данные транскриптомного профилирования с динамикой активности ключевых ферментных систем и гликопротеинов на разных стадиях онтогенеза базидиомицета *L. edodes*.

5. Оценить цитотоксическую активность белковых, полисахаридных фракций и отдельных гликопротеинов непигментированного мицелия, коричневой мицелиальной пленки и плодовых тел лекарственных базидиомицетов *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum* в отношении ряда опухолевых клеточных линий млекопитающих в экспериментах *in vitro*. Изучить противоопухолевое и иммуностимулирующее действие препаратов на основе внутриклеточных гликопротеинов глубинного мицелия данных видов грибов в экспериментах *in vivo*.

6. Изучить особенности образования наночастиц золота, серебра и селена с помощью базидиомицетов *P. ostreatus*, *L. edodes*, *G. frondosa*, *G. lucidum*, *A. bisporus* и *A. arvensis* и их метаболитов, дать характеристику и определить цитотоксичность биогенных наночастиц. Разработать способ получения наночастиц благородных металлов с заданными параметрами с применением культуральной жидкости *L. edodes*.

Объекты и предмет исследования: онтогенез, ультраструктура, транскриптомы, гены, метаболизм и биохимия грибов, активные грибные метаболиты, «зеленый» синтез наночастиц, применение грибов в биотехнологии. Особенности метаболизма ксилотрофных базидиомицетов, гликопротеины, полисахариды, лектины, противоопухолевые и иммуномодулирующие соединения, ферменты, наночастицы металлов и металлоидов.

Научная новизна полученных результатов.

Впервые, с применением технологий высокопроизводительного секвенирования, охарактеризованы особенности метаболизма клеток на разных этапах развития базидиомицета *L. edodes*.

Получены новые данные по динамике активности ключевых ферментных систем: лиаз, гидролаз, гликозил-гидролаз, оксидоредуктаз, входящих в состав целлюлозолитического, лигнинолитического комплексов базидиомицетов и принимающих участие в биогенезе клеточной стенки, а также лектинов в процессе онтогенеза *P. ostreatus*, *A. mellea*, *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum*.

Микроскопические исследования показали существенные изменения в цитодифференцировке и ультраструктуре клеток на разных стадиях морфогенеза базидиомицетов.

Впервые охарактеризована коричневая мицелиальная пленка *L. edodes* не только с точки зрения протекторной, но и сенсорно-регуляторной функции. Результаты транскриптомного профилирования и верификация полученных данных выявили активацию категорий, указывающих на активный метаболизм данной структуры, которая взаимодействует с мицелием и окружающей средой и выполняет регуляторные функции в процессе онтогенеза базидиомицета.

С применением комплекса биохимических методов и транскриптомного анализа выявлен широкий спектр активных метаболитов, как в плодовом теле, так и в мицелии. Впервые выявлено снижение метаболической активности ряда раковых клеточных линий млекопитающих (A549, Hep-2, HeLa, SPEV-2, C6 и рак почки РА) под действием внутриклеточных гликопротеинов из глубинного мицелия *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum*, не уступающих по активности полисахаридам плодовых тел, а к линии C6 значительно их превосходящих.

Получены новые данные о способности базидиомицетов *P. ostreatus*, *L. edodes*, *G. frondosa*, *G. lucidum*, *A. bisporus* и *A. arvensis*, их экстрактов и отдельных метаболитов к восстановлению соединений металлов и металлоидов до элементного состояния, с образованием наночастиц. Впервые проведен синтез наночастиц золота и серебра с помощью грибных фенолоксидаз.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Результаты работы вносят существенный вклад в понимание молекулярно-физиологических аспектов роста и развития базидиальных макромицетов и механизмов формирования плодовых тел, что может быть использовано при промышленном производстве экономически ценных грибных культур.

Масштабная характеристика транскриптомов лекарственного и съедобного базидиомицета *L. edodes* позволила визуализировать работу метаболических путей и функциональных групп генов в процессе его онтогенеза. Это дало возможность сформировать ценную базу для изучения экспрессии всего генома, в том числе для выявления транскриптов биологически активных соединений, представляющих большой биотехнологический потенциал.

Данные полученные по противоопухолевой активности гликопротеинов из мицелия *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum* в отношении раковых линий, наряду с установленной активацией иммунной системы и отсутствием токсического действия на слизистую желудка, могут служить основанием для разработки на их основе средств, перспективных в комплексной терапии онкозаболеваний.

Показана возможность биоредукции соединений металлов и металлоидов с образованием наночастиц с помощью экстрактов и отдельных метаболитов (фенолоксиляющих ферментов) базидиомицетов. Запатентован способ получения наночастиц благородных металлов с необходимыми параметрами путем варьирования условий процесса микосинтеза.

Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, использованы при разработке и чтении курса лекций «Основы микологии» для аспирантов в ИБФРМ РАН, при прохождении практических занятий, написании курсовых и дипломных работ в организациях биологического и биотехнологического профиля. Материалы диссертационной работы внедрены в производственную практику грибоводческих хозяйств.

Методология и методы исследований. Молекулярно-генетические методы применялись для высокопроизводительного секвенирования и изучения

экспрессии генов; биоинформатический анализ для обработки и интерпретации данных транскриптомного профилирования; биохимические методы применялись для выделения и очистки белков и полисахаридов, определения активности ферментов и лектинов; с помощью методов световой, конфокальной и электронной микроскопии изучались ультраструктура клеток грибов, цитоморфометрия опухолевых тканей и структурные изменения в органах лабораторных животных, а также характеристика наночастиц.

Положения, выносимые на защиту:

1. Коричневая мицелиальная пленка базидиомицета *L. edodes* представляет собой метаболически активную стадию в его онтогенезе. На это указывает высокая активность функциональных гликопротеинов, ферментов и генов, отвечающих за активацию сигнальных и коммуникативных процессов, транскрипционных факторов переключателей развития, перестройку цитоскелета, внутриклеточный и везикулярный транспорт.

2. Охарактеризованы особенности метаболических путей базидиомицета *L. edodes* по стадиям онтогенеза (непигментированный мицелий, коричневая мицелиальная пленка, примордий и плодовое тело) с помощью транскриптомного анализа.

3. Водорастворимые гликопротеины глубинного мицелия *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum* проявляют высокую цитотоксическую и противоопухолевую активность в отношении раковых клеточных линий млекопитающих, в сочетании с активацией иммунитета и отсутствием негативного воздействия на слизистую желудочно-кишечного тракта лабораторных животных.

4. Культуры базидиальных макромицетов *P. ostreatus*, *L. edodes*, *G. frondosa*, *G. lucidum*, *A. bisporus* и *A. arvensis*, их внутриклеточные экстракты и отдельные метаболиты (фенолоксиляющие ферменты Mn-пероксидазы, лакказы и тирозиназы), способны восстанавливать соединения металлов и металлоидов до элементного состояния, с образованием наночастиц.

Связь работы с плановыми исследованиями и научными программами. Работа проводилась с 2009 г. по 2025 г в лаборатории микробиологии ИБФРМ РАН в соответствии с планом научных исследований. Часть исследований выполнена совместно с сотрудниками Института микробиологии НАН Беларуси, Минск; лаборатории молекулярной биологии и лаборатории микроскопии КИББ КазНЦ РАН; лаборатории экстремальной биологии КФУ, Казань; Института химии СГУ им. Н.Г. Чернышевского, Саратов; кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России; с сотрудниками ПКП «Сантана», Саратов. Большинство исследований выполнено на базе ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

Исследования поддержаны грантами РФФИ № 10-04-09357_моб_з, № 11-04-09253-моб_з, № 11-04-00000-моб_з_рос, № 11-04-90811-моб_ст, № 12-04-90828-моб_нр_рос, № 16-34-50025 мол_нр, № 15-04-02926_А; грантом Корпорации «Сибирское здоровье» и грантом компании ОПТЭК.

Личный вклад автора. Все результаты, представленные в диссертации, получены лично соискателем или при его непосредственном участии. Автору принадлежит выбор направления исследований, разработка задач и методов, получение экспериментальных данных, анализ, обсуждение, обобщение полученных результатов и оформление их в виде публикаций. Научные положения диссертации и выводы базируются на собственных исследованиях автора. Все описания и иллюстрации в диссертации являются оригинальными или взяты в переработанном виде из работ, написанных автором.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты и выводы диссертации достоверны, так как основаны на экспериментальном материале многолетних исследований. Работа выполнена с использованием современных методик и оборудования. Данные систематизированы и проведена статистическая обработка результатов.

Материалы диссертации были представлены на **18 российских и 25 международных конференциях.**

Публикации. По теме диссертации опубликовано 27 работ, в том числе 23 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности 1.5.18. Микология (биологические науки).

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 424 страницах, содержит 33 таблицы и 165 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 3 глав собственных исследований и их обсуждения, заключения и выводов, список литературы включает 930 ссылок.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛАВА 1. Морфогенез базидиомицетов. В главе изложены данные по физиологии, структуре, биохимии и генетике биологии развития грибов, в том числе полученные с помощью высокопроизводительного секвенирования.

ГЛАВА 2. Противоопухолевые и иммуномодулирующие свойства биологически активных метаболитов лекарственных базидиомицетов. Глава включает данные по биологически активным и лекарственным соединениям базидиомицетов, противоопухолевым и иммуномодулирующим свойствам вторичных метаболитов, полисахаридов и гликопротеинов грибов.

ГЛАВА 3. «Зеленый» синтез наночастиц, опосредованный грибами. Рассматриваются вопросы биологического синтеза наночастиц металлоидов и металлов, механизмы образования наночастиц, их свойства и применение.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе использовали культуры ксилотрофных *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler штаммы F-249, 2-T, 363, Ner, Poot, 58 siit, 0779, 4080, M-370, 19, 25, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. 1871 штамм НК-35, *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray 1821 штамм 0917, *Ganoderma lucidum* (Curtis) P.

Karst. 1881 штамм 1315, *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm. 1871 штамм 0738 и гумусовых базидиомицетов *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach 1946 штаммы A15, 512 и *A. arvensis* Schaeff. 1774, из коллекции высших базидиальных грибов кафедры микологии и альгологии МГУ им. М.В. Ломоносова, коллекции культур базидиомицетов Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН и коллекции высших грибов Института микробиологии НАН Беларуси.

Выделение, очистка и характеристика полисахаридов, пигментов и гликопротеинов. С помощью различных биохимических методов выделены, очищены и охарактеризованы соединения непигментированного мицелия, мицелиальной пленки, примордий и плодовых тел грибов. Методом ГЖХ определены углеводный и аминокислотный состав, методом ИК-спектроскопии установлены структура и конфигурации растворимых экзо- и эндогликопротеинов, с помощью метода периодатного окисления описана химическая структура растворимых экзо- и эндополисахаридов *L. edodes*.

Определение активности ферментов и лектинов. На разных стадиях морфогенеза *P. ostreatus*, *A. mellea*, *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum* определены активности ферментов хитиназ, ксиланаз, амилаз, инвертаз, целлюлаз, α -, β -галактозидаз, α -, β -глюкозидаз, протеаз, пектатлиаз, Мп-пероксидаз, лигнин пероксидаз, лакказ и тирозиназ, согласно общепринятым методам. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкМ субстрата за 1 минуту на 1 мг белка. Установлена гемагглютинирующая активность и углеводная специфичность лектинов (Lutsik *et al.*, 1981). Исследование белкового состава проводили с помощью электрофореза в ПААГ (Laemmli, 1970). Специфическое окрашивание гелей для визуализации ферментов проводили согласно методикам (Гааль и др., 1992; Paszczynski *et al.*, 1988; Pomerantz and Murthy, 1974).

Транскриптомное профилирование. Транскриптомное профилирование проводили на четырех стадиях онтогенеза (непигментированный мицелий,

коричневая мицелиальная пленка, примордий и плодовое тело) базидиомицета *L. edodes*. Исследование включало выделение РНК, подготовку библиотек кДНК и их секвенирование на Illumina HiSeq 2500, оценку качества и сортировку прочтений, сборку и сортировку транскриптов, проверку качества сборки, аннотацию и классификацию транскриптов, выравнивание прочтений на транскрипты *L. edodes*, поиск дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), классификацию ДЭГ по метаболическим путям, визуализацию результатов. Предложен алгоритм для физиологической интерпретации данных (https://github.com/RimGubaev/deg_to_path). Проведена верификация данных секвенирования с помощью биохимических методов, в том числе при помощи ПЦР-РВ в ДНК-амплификаторе CFX96 («Bio-Rad», США).

Методы микроскопии. Для изучения ультраструктуры, грибные клетки фиксировали эпоксидной смолой ЭПОН, срезы получали на микротоме («ЛКВ-III», Швеция). Анализ полутонких срезов проводили на световом микроскопе Leica DM6000B («Leica Microsystems», Германия), ультраструктуру клеток изучали на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1200 EX («JEOL», Япония). Состояние монослоя клеток млекопитающих оценивали с помощью микроскопа Leica DMI3000B и камеры Leica 420 D CCD в режиме фазового контраста. Особенности апоптотической морфологии клеток млекопитающих изучали на конфокальном лазерном микроскопе TCS SP5 («Leica Microsystems») с применением методов флуоресцентной микроскопии и дифференциальной окраски клеток и органелл (Hezel *et al.*, 2012). Микроскопию наночастиц осуществляли на электронном микроскопе Libra 120 («Carl Zeiss», Германия).

Определение цитотоксичности. Исследования цитотоксичности разных фракций гликопротеинов и полисахаридов глубинного мицелия и плодовых тел *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum* проводили *in vitro* на раковых клеточных линиях A549, Hep-2, HeLa, SPEV-2 и C6 и контрольных линиях Vero и CHO-K1 из коллекции клеточных культур Института Цитологии РАН (Россия). Дыхательную активность определяли по способности клеток восстанавливать

нитротетразоловый синий до формазана по общепринятому методу (МТТ-тест) (Niks and Otto, 1990; Bernas and Dobrucki, 2000). Данные получали на спектрофотометре Spark 10M (Tecan Group Ltd., Швейцария). Цитотоксичность биогенных наночастиц Au^0 и Ag^0 изучали на клеточных линиях HeLa и Vero.

Противоопухолевая активность. Противоопухолевую активность фракций водорастворимых гликопротеинов изучали *in vivo* в отношении перевитого рака почки РА из банка опухолевых штаммов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Эксперименты проводили на свободных от патогенов белых крысах линии Wistar, полученных из ЦНР лабораторных животных (Пушино), в соответствии с международными этическими нормами (<http://conventions.coe.int/treaty/Commun/QueVoulezVous.asp?CL=RUS&NT=123>). Индекс торможения роста опухоли считали согласно (Хабриев, 2005); исследовали опухолевые ткани и структурные изменения в органах животных (Автандилов, 1990).

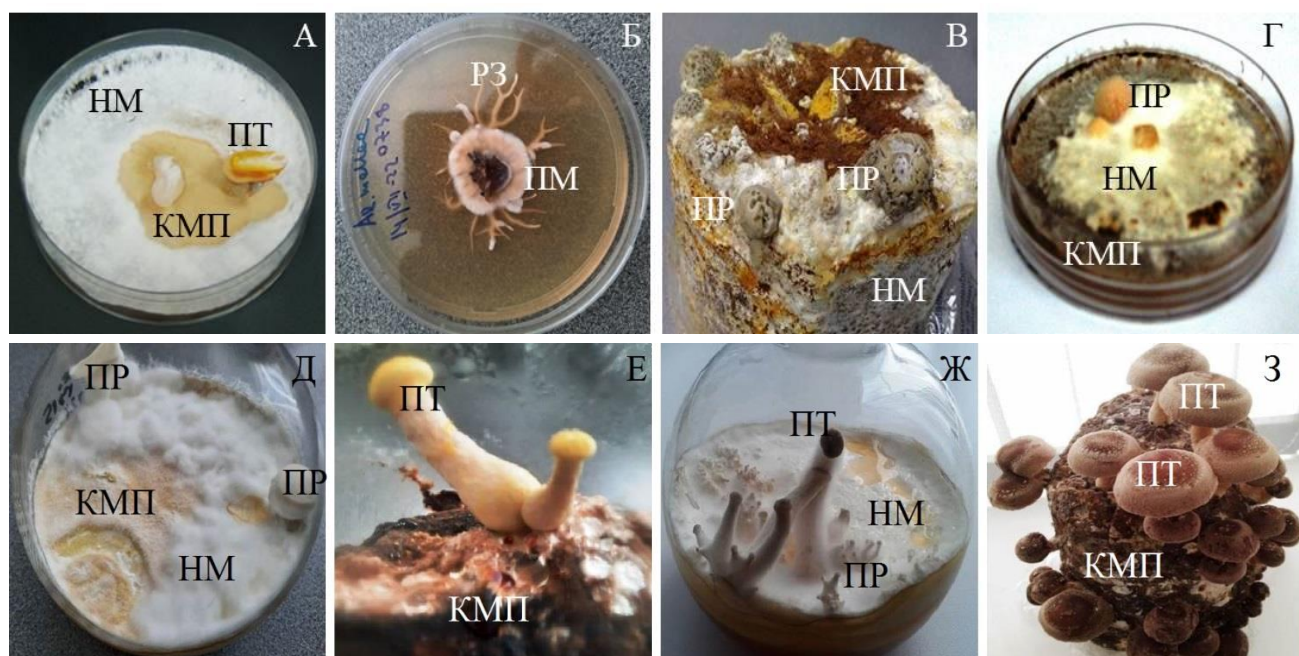
Характеристика наночастиц. Структуру наночастиц определяли методом дифракции электронов в выбранной области (SAED) и спектроскопии энергетических потерь электронов (EELS) на электронном микроскопе Libra 120. Химический состав определяли методом рентгеновской флуоресценции на спектрометре ED2000 («Oxford Instruments», Великобритания), степени окисления рентгенофазовым методом на ДРОН-3.0 и дифракционной базы данных соединений (JCPDS, США). Оптические свойства наночастиц исследовали с помощью ультрафиолетовой спектроскопии на Specord 250 («Jena Analytik», Германия), размер и ζ -потенциал методом динамического светорассеяния на лазерном анализаторе Zetasizer Nano ZS («Malvern», UK).

Статистическая обработка результатов. Эксперименты были проведены не менее чем в 5 повторностях в 5 независимых экспериментах. Статистическую обработку результатов проводили общепринятым методом при помощи ПК с использованием статистического пакета анализа данных программы Excel.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 5. 5.1. Особенности морфогенеза базидиальных макромицетов.

В процессе онтогенеза при твердофазном и глубинном культивировании *L. edodes*, *G. lucidum*, *G. frondosa*, *A. mellea* и *P. ostreatus* последовательно образовывали характерные стадии: непигментированный мицелий (НМ), характеризующийся активным ростом, ветвлением, растяжением гиф, освоением субстрата (Рис.1). У *A. mellea* характерной стадией являются ризоморфы (РЗ) – длинные шнуровидные сплетения гиф необходимые для колонизации субстрата и адаптации (Рис.1Б). На следующем этапе, гифы, расположенные на поверхности субстрата, уплотнялись, приобретали пигментацию и формировали коричневую мицелиальную пленку (КМП), характерную для многих макромицетов. В дальнейшем, под поверхностью пленки, закладывались примордии (ПР) (Рис.1В,Г,Д), формирующиеся затем в плодовые тела (ПТ) (Рис.1А,Е,Ж,З). У культур *L. edodes*, *G. frondosa*, *A. mellea* образование базидиом происходило только после формирования КМП (Vetchinkina *et al.*, 2017; 2025).

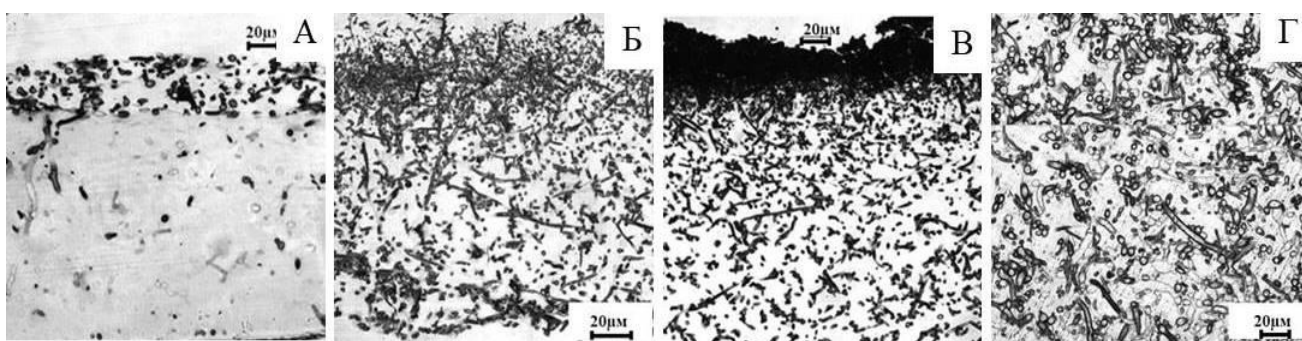


НМ – непигментированный мицелий, ПМ – пигментированный мицелий, РЗ – ризоморфы, КМП – коричневая мицелиальная пленка, ПР – примордий, ПТ – плодовое тело.

Рисунок 1 – Особенности морфогенеза *G. lucidum* (А,Д), *A. mellea* (Б,Е), *G. frondosa* (В), *L. edodes* (Г,З) и *P. ostreatus* (Ж) при культивировании на чашках Петри (А, Б, Г), в колбах (Д, Е, Ж) и опилочно-зерновом субстрате (В,З)

5.2. Микроскопические исследования особенностей роста мицелия и ультраструктуры клеток на разных стадиях развития базидиомицетов.

В зависимости от стадии развития меняется дифференцировка гиф мицелия. Исследование полутонких срезов показали, что гифы НМ расположены достаточно свободно (Рис.2А), затем гифы, не погруженные в субстрат, начинают уплотняться (Рис.2Б) и формировать КМП – очень плотный слой мицелия (Рис.2В). Гифы базидиом имеют свободное продольно-поперечное расположение и больший диаметр в сравнении с другими стадиями морфогенеза (Рис.2Г) (Vetchinkina *et al.*, 2017).



А – непигментированный мицелий; Б – уплотненный мицелий; В – коричневая мицелиальная пленка; Г – примордии; масштаб – 20 мкм.

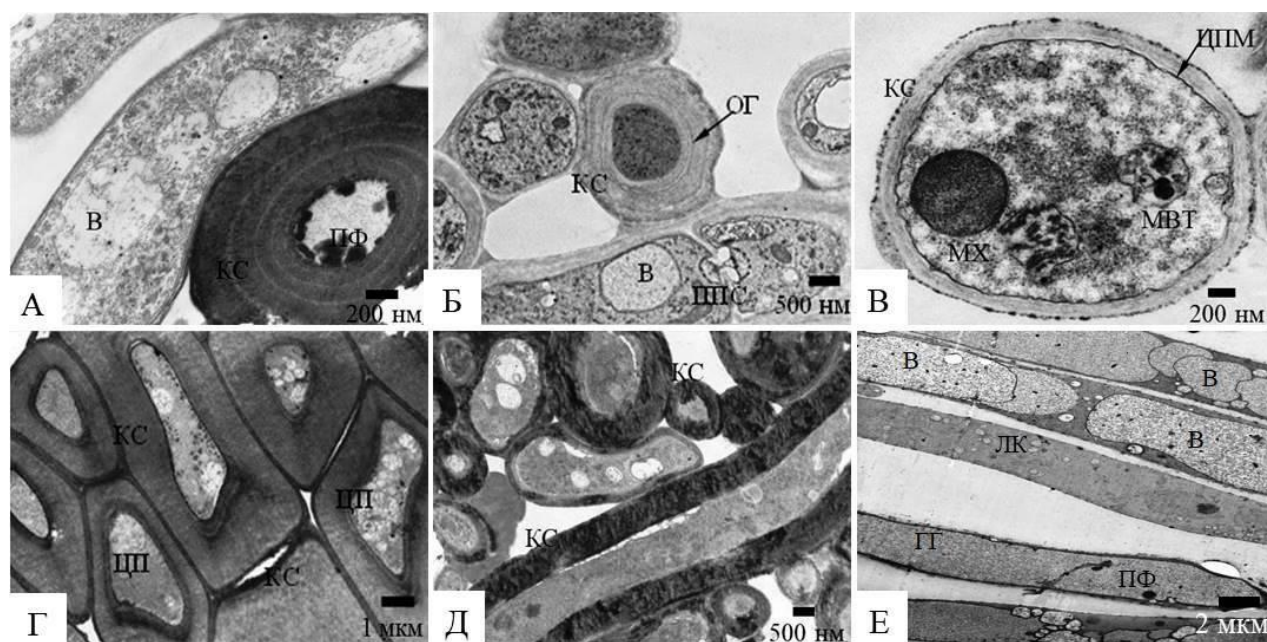
Рисунок 2 – Световая микроскопия полутонких срезов гиф *L. edodes* на разных стадиях развития

В качестве общей особенности КМП базидиомицетов можно отметить усиление межклеточной агрегации с образованием многоклеточной пигментированной структуры от 20 до 100 мкм и четкое разграничение между пленкой и, ниже расположенным, мицелием (Рис.3А–Г) (Vetchinkina, 2025).



Рисунок 3 – Особенности гифальной организации на стадии образования мицелиальной пленки у *G. lucidum* (А), *A. mellea* (Б), *G. frondosa* (В) и *P. ostreatus* (Г); масштаб – 50 мкм

Существенные изменения происходили в ультраструктуре клеток на разных стадиях развития (Рис.4). В клетках НМ, по данным электронной микроскопии, в цитоплазме много митохондрий и рибосом. Мембраны ЭПР, как правило, выровнены вдоль продольной оси ги́ф. Ядра округлой формы с двухслойной мембраной. Секреторные везикулы многочисленны, морфологически разнородны, присутствуют мультивезикулярные тела (Рис.4В).



ОГ – «опорная» ги́фа, КС – клеточная стенка, ППС – пора парентосомы, ЦП – цитоплазма, ЦПМ – цитоплазматическая мембрана, В – вакуоль, МХ – митохондрия, МВТ – мультивезикулярное тело, ПФ – гранулы полифосфата, ЛК – липидные капли, ГГ – гликоген.

Рисунок 4 – Ультраструктура клеток *G. lucidum* (А, Г), *L. edodes* (Б, Д, Е) и *G. frondosa* (В) на стадии НМ (В), КМП (А, Г, Д); ПР (Б) и ПТ (Е); масштаб – 200 и 500 нм, 1 и 2 мкм

На стадии КМП, в отличие от НМ, клетки с сильно утолщенной стенкой до 1–2 мкм. Характерно большое количество вакуолей, меньше рибосом и ЭПР, в большом количестве представлены мультивезикулярные и миелиноподобные структуры (Рис.4А,Г,Д). В ПР и ПТ много «опорных» ги́ф с очень толстой стенкой. В ПТ хорошо выражена вакуолярная система, часто вакуолей в клетке несколько и они заполняют все пространство. Наблюдали липидные капли, гликоген и полифосфатные гранулы (Рис.4Б,Е). Изменения указывают на приспособление к условиям среды и особенности дифференцировки при формировании морфогенных структур (Vetchinkina *et al.*, 2017).

5.3. Сравнительный анализ активности ключевых ферментов и лектинов оценкой предполагаемых функций в онтогенезе.

В КМП, по сравнению с НМ, увеличивалось общее содержание растворимых углеводов относительно содержанию белка в 2–8 раз в зависимости от вида грибов. Отмечено значительное повышение содержания меланинов. Уплотнение и агрегация гиф, утолщение стенок, многократное повышение в клетках содержания углеводов и пигментов характеризует КМП базидиомицетов как протекторный механизм, выполняющий защитную функцию от пересыхания мицелия, ультрафиолетового излучения и патогенов (Vetchinkina, 2025).

Однако, было установлено, что ферменты пектатлиазы, протеазы, гликозил-гидролазы (амилазы, инвертазы, хитиназы, эндоглюканазы, ксиланазы, целлюлазы, α -, β -глюкозидазы и α -, β -галактозидазы), а также оксидоредуктазы (лакказы, тирозиназы, лигнин пероксидазы, Mn-пероксидазы), входящие в состав целлюлозо-, лигнинолитического комплексов ксилотрофных грибов, а также участвующих в биогенезе клеточной стенки, были высоко активны не только на стадии НМ, а также и в клетках КМП (Vetchinkina, 2025).

Например, ферменты галактозидазы, необходимые для расщепления поли- и олигосахаридов до мономеров, обеспечивающих клетку питательными веществами, проявляли высокую активность в КМП, что говорит в пользу метаболической активности этой морфоструктуры (Рис.5).

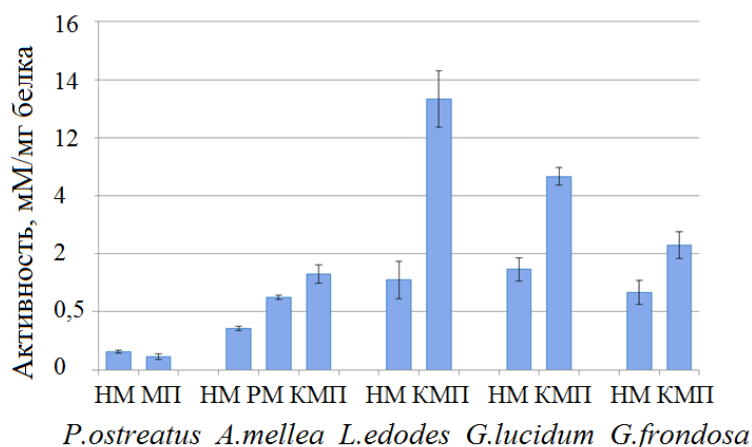


Рисунок 5 – Динамика активности ферментов галактозидаз в зависимости от стадии морфогенеза базидиомицетов; обозначения как на рисунке 1

Ферменты фенолоксидазы были также высокоактивны на данной стадии морфогенеза (Рис.6). Известно, что фенолоксидазы необходимы ксилотрофам для разрушения древесины и обеспечения питательными веществами, однако

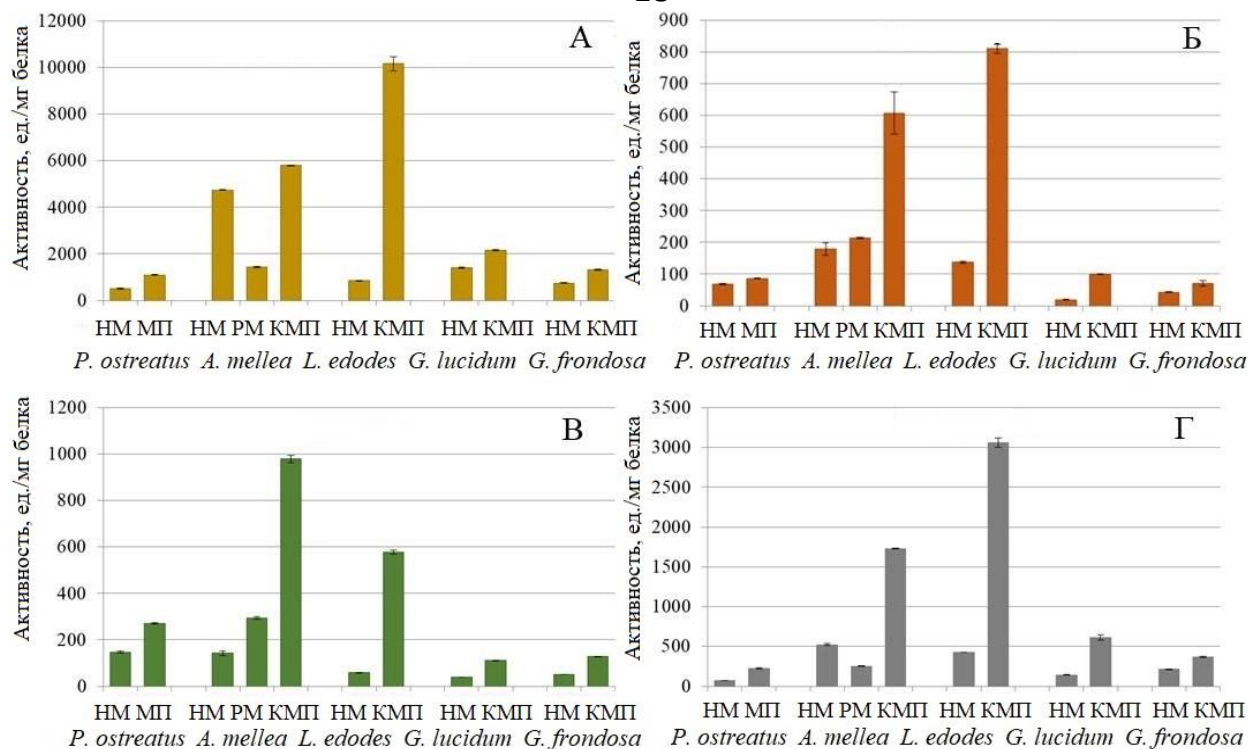


Рисунок 6 – Активности ферментов лигнин пероксидаз (А), Мп-пероксидаз (Б), лакказ (В) и тирозиназ (Г) в зависимости от стадии морфогенеза грибов

кроме того, они принимают участие в морфообразовании. Лакказа катализирует синтез пигментов, выступающих в качестве связующих элементов при сшивке компонентов стенок при образовании базидиом. Тирозиназы участвуют в синтезе меланинов, обеспечивающих защиту от ультрафиолета и влияющих на устойчивость хитин-глюкан-меланинового комплекса к действию патогенов. У штаммов *L. edodes* не способных к формированию КМП отмечалась низкая активность фенолоксидаз (Vetchinkina *et al.*, 2015).

Лектины – гликопротеины, способные обратимо связывать специфические углеводы без нарушения их структуры, были наиболее активны в КМП грибов (Рис.7). Лектины принимают участие во многих процессах между организмами, в тканях и клетках, нужны для обеспечения

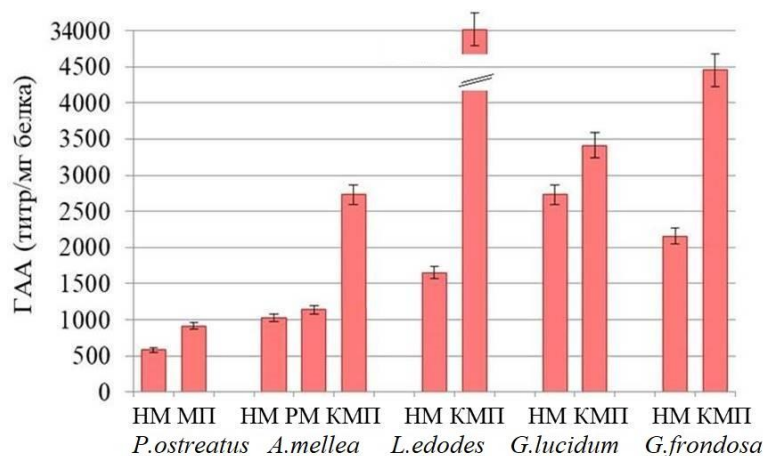


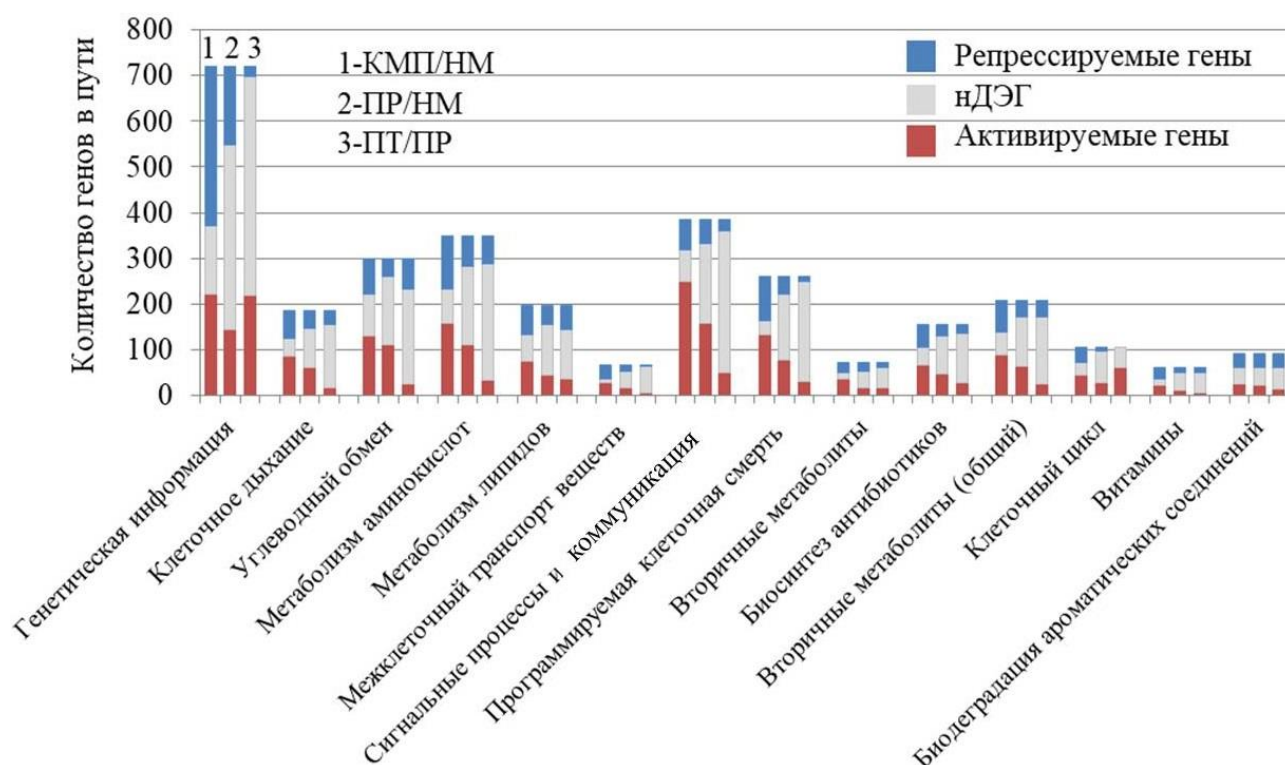
Рисунок 7 – Гемагглютинирующая активность лектинов на разных стадиях морфогенеза грибов; обозначения как на рисунке 1

направленного роста и межклеточного взаимодействия, индуцируют образование морфоструктур и базидиом, участвуют в регуляции разных ферментативных систем (Vetchinkina *et al.*, 2017; Vetchinkina, 2025).

5.4 Высокопроизводительное секвенирование на платформе Illumina HiSeq 2500 и транскриптомное профилирование *de novo* базидиомицета *L. edodes* в процессе онтогенеза.

Высокая активность ферментов и лектинов в КМП указывает на активный метаболизм в клетках данной морфоструктуры и возможные регуляторные функции при переходе в фазу плодоношения. Для подтверждения этого предположения были проведены молекулярно-генетические исследования. На платформе Illumina HiSeq 2500 выполнено секвенирование транскриптомов разных стадий онтогенеза *L. edodes* и получены прочтения, соответствующие фрагментам мРНК на четырех стадиях базидиомицета (НМ, КМП, ПР и ПТ). Сравнение транскриптомных профилей *L. edodes* позволило выявить различия в целом ряде физиологических процессов в клетках разных морфоструктур. Наибольшее количество дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) представлено в паре НМ относительно ПТ и НМ относительно КМП, что говорит о существенном различии в метаболизме данных стадий онтогенеза. Наименьшие различия наблюдаются между ПР и ПТ. С использованием разных баз данных было аннотировано около 11000 генов (Губаев и др., 2018).

Для визуализации различий в работе метаболических путей на разных стадиях онтогенеза *L. edodes*, выявленные ДЭГ были сгруппированы в функциональные категории в соответствии с информацией, представленной в базе данных KEGG <https://bit.ly/2EDuksN>, с оценкой насыщенности метаболического пути активируемыми/репрессируемыми генами. На основе проведенного анализа было получено 140 функциональных категорий и метаболических путей, насыщенных транскриптами ДЭГ в трех группах сравнения. Метаболические пути и группы генов были собраны в более крупные категории, соответствующие функциональному значению (Рис.8).



Группы сравнения: КМП/НМ – коричневая мицелиальная пленка/непигментированный мицелий, ПР/НМ – примордий/непигментированный мицелий, ПТ/ПР – плодовое тело/примордий; нДЭГ – дифференциально не экспрессирующиеся гены.

Рисунок 8 – Общий анализ активации/репрессии функциональных групп генов в процессе онтогенеза *L. edodes* с использованием базы данных KEGG

В КМП относительно НМ обращает на себя внимание активация путей, ответственных за сигнальные процессы и коммуникацию. Обнаружено большое количество активных генов, ответственных за работу АМФ-активируемых протеинкиназ, которые регулируют энергетический гомеостаз и являются ключевыми белками в путях передачи сигналов, регулировании роста и перепрограммировании метаболизма, аутофагии, клеточной полярности, ориентации в пространстве и ответной реакции на параметры окружающей среды (Ge *et al.*, 2022). Также в активации находились МАП-киназы, регулирующие дифференцировку и участвующие в управлении клеточного ответа. Известно, например, что у дрожжей они ответственны за остановку клеточного цикла и спаривание клеток, то есть инициируют процесс полового размножения (Good *et al.*, 2009). Метаболические пути, связанные с передачей сигналов, сопряженных с вторичными мессенджерами, такими как циклический гуанозинмонофосфат (cGMP), с гликозилфосфатидилинозитол-заякоренными

белками (GPI-APs), с ионами кальция Ca^{2+} находились в активации. Наблюдали активацию генов, кодирующих сфинголипиды, которым принадлежит важная роль в динамике цитоскелета, передачи сигналов, трансляции и посттрансляционной модификации белков (Вессассиоли *et al.*, 2019).

В клетках КМП происходит активация генов-регуляторов переключателей развития. Они кодируют белки/белковые комплексы— специфические транскрипционные факторы, контролирующие программы клеточной дифференцировки, формирования органов и тканей. В результате анализа ПЦР-РВ установлена высокая экспрессия гена *exr* на стадии предшествующей плодоношению (Рис.9). В КМП активность гена *exr* выше в 7 раз по сравнению с НМ, что может служить маркером готовности макромицета к формированию ПТ (Ветчинкина и др., 2015).

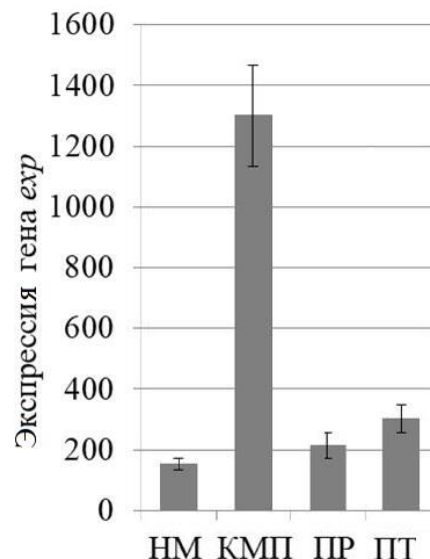


Рисунок 9 – Уровень экспрессии гена *exr* на разных стадиях онтогенеза *L. edodes*; обозначения как на рисунке 1

Исходя из результатов транскриптомного профилирования, в КМП индуцируются процессы биогенеза клеточных стенок, а именно биосинтез глюкозаминов, хитина, а также связанного с клеточными стенками меланина. Внутренние слои клеточной стенки базидиомицетов состоят из фибрилл хитина и β -глюканов, и модель ее роста предусматривает постоянную работу ферментов хитиназ, хитинсинтаз и глюканаз для поддержания баланса между синтезом и лизисом компонентов, что является необходимым для постоянной перестройки полисахаридов данного компартмента. Они играют важную роль при апикальном росте, клеточном делении и ветвлении мицелия, гифальной дифференциации, прорастании и высвобождении спор. Установлено, что активные хитиназы и эндоглюканазы присутствуют в клетках на всех стадиях онтогенеза *L. edodes* (Рис.10). Высокая активность ферментов была отмечена в НМ, а также заметная активация происходит в КМП (Ветчинкина и др., 2015).

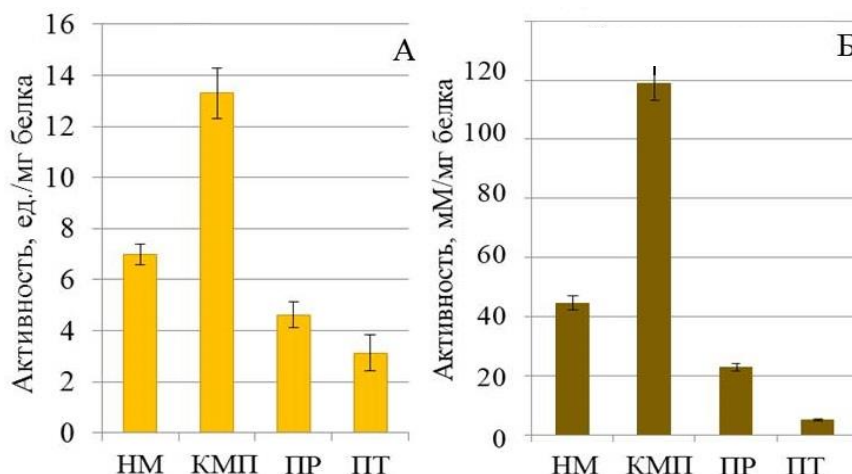


Рисунок 10 – Динамика активности ферментов хитиназ (А) и эндоглюканаз (Б) на разных стадиях онтогенеза *L. edodes*; обозначения как на рисунке 1

В КМП, по сравнению с другими стадиями, обнаружено наибольшее количество активных генов ферментов лигнинолитического комплекса (Рис.11).

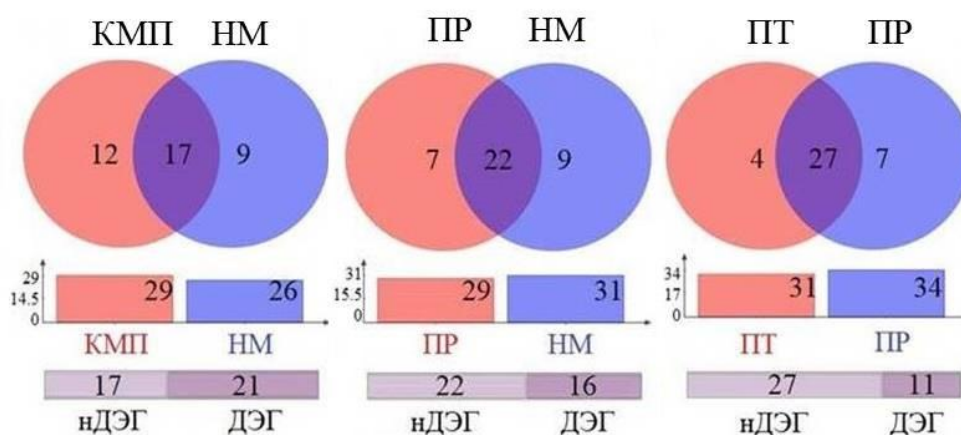


Рисунок 11 – ДЭГ, кодирующие фенолоксидазы на разных стадиях онтогенеза *L. edodes*; обозначения как на рисунке 8

Активность лакказ и тирозиназ была на высоком уровне на всех стадиях онтогенеза, с максимумом в КМП *L. edodes* (Рис.12), были отмечены также изменения в составе белкового комплекса ферментов (Рис.13). Фенолоксидазы участвуют в сшивке компонентов клеточных стенок мицелия при образовании базидиом, а также они могут выступать в качестве сигнальных молекул (Ветчинкина и др., 2015; Vetchinkina *et al.*, 2017; Vetchinkina, 2025).

На разных стадиях онтогенеза *L. edodes* были обнаружены активные гены, кодирующие лектины, с наибольшим количеством на стадии КМП (Рис.14). Лектины молекулярной массой около 130, 140 и 150 кДа характерны только для этого этапа развития базидиомицета (Рис.15Б).

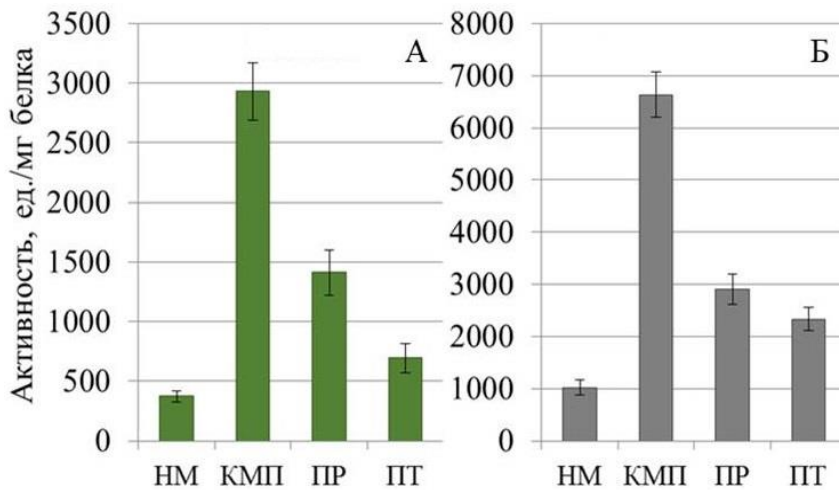


Рисунок 12 – Активность лакказ (А) и тирозиназ (Б) на разных стадиях онтогенеза *L. edodes*; обозначения как на рисунке 1

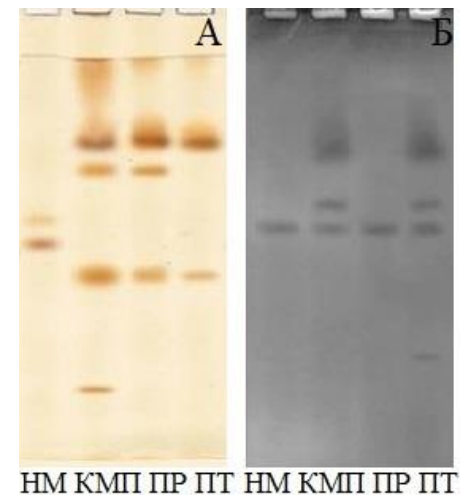


Рисунок 13 – Электрофорез и специфическая окраска лакказ (А) и тирозиназ (Б) *L. edodes*

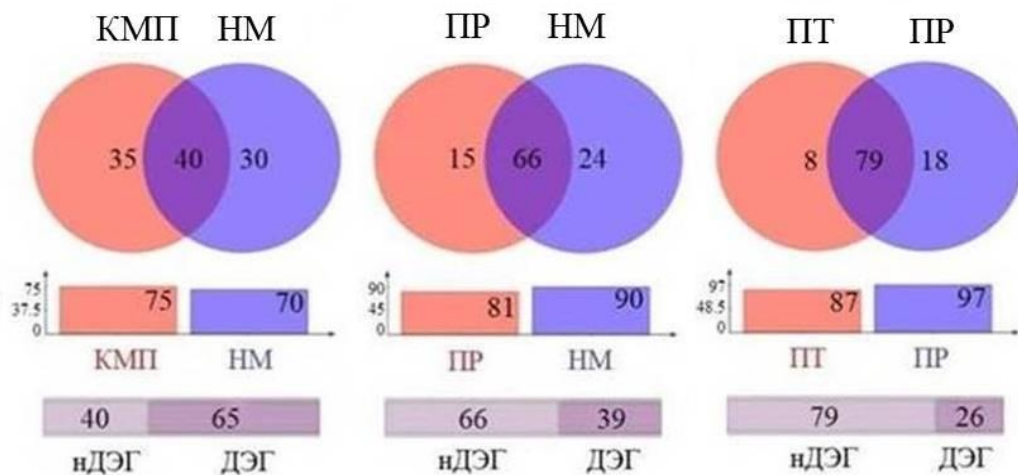


Рисунок 14 – Сравнительный анализ транскриптомов *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза для идентификации ДЭГ, кодирующих лектины; обозначения как на рисунке 8

Лектины были специфичны в отношении *L-D*-меллибиозы, *D*-лактозы и *D*-галактозы. Отмечена их высокая активность на стадии КМП, титр агглютинация составлял более 34000 единиц (Рис.15А). Возможно, лектины участвуют здесь в качестве агрегирующего агент, а также выступают в как маркерные молекулы, необходимые для перехода к плодоношению (Vetchinkina *et al.*, 2017; 2022).

Молекулярно-генетическая информация о морфогенезе экономически ценных грибных культур, наряду с фундаментальной значимостью, также способствует развитию прикладных аспектов, таких как получение грибов с улучшенными свойствами и различные биотехнологии.

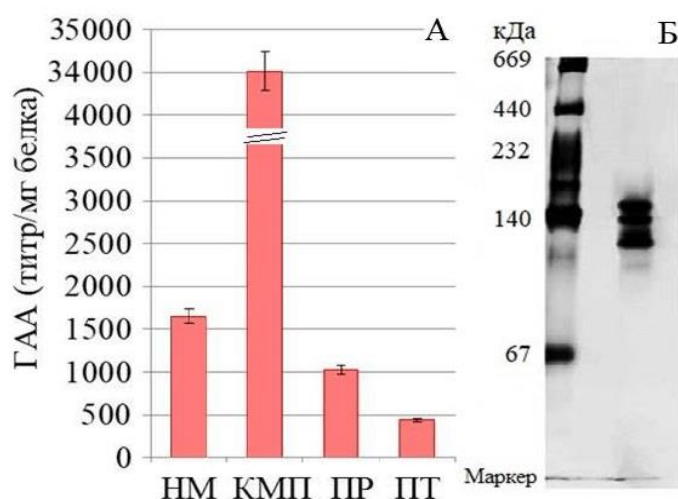


Рисунок 15 – Динамика активности лектинов на разных стадиях онтогенеза *L. edodes* (А) и электрофорез лектинов коричневой мицелиальной пленки (Б)

В результате транскриптомного анализа мы обнаружили, что большинство генов, ответственных за биосинтез вторичных метаболитов и соединений с антибиотической активностью, находились в активации не только в ПТ, но и в НМ и КМП *L. edodes* (Рис.16) (Губаев и др., 2018; Vetchinkina *et al.*, 2022).

В плане получения биологически активных и лекарственных препаратов потенциал базидиомицетов огромен, и в настоящее время направление по изучению высокоэффективных грибных метаболитов набирает популярность (Wasser, 2014).

В настоящее время в качестве сырья используют в основном полисахаридные фракции плодовых тел (*D*-фракция, грифолан, лентинан) макромицетов. Изучению биологически активных водорастворимых соединений глубинного мицелия посвящено гораздо меньше работ. Опираясь на данные транскриптомного анализа, была поставлена задача, оценить противоопухолевую активность глубинного мицелия базидиомицетов.

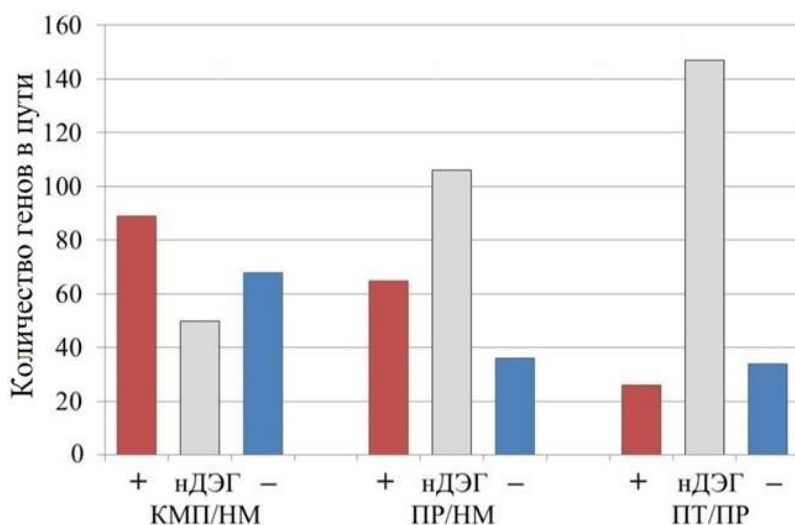


Рисунок 16 – ДЭГ вторичных метаболитов и антибиотиков на разных стадиях онтогенеза *L. edodes*; обозначения как на рисунке 8

ГЛАВА 6. Исследование противоопухолевой активности белковых, полисахаридных фракций и отдельных гликопротеинов глубинного мицелия и плодовых тел лекарственных базидиомицетов.

6.1. Цитотоксичность фракций внутриклеточных гликопротеинов глубинного мицелия лекарственных трутовиков *G. frondosa* и *G. lucidum*.

С применением метода МТТ обнаружена цитотоксическая активность экстрактов гликопротеинов глубинного мицелия *G. frondosa*, которая при 9.4 мг/мл снижала метаболизм всех раковых линий на 90%. Воздействие экстракта на линию С6 был наибольшим и при 9.4–1.2 мг/мл составлял 100–90% потери активности, а при 0.6 мг/мл – 50% (Рис.17А). После разделения методом гель-фильтрации на Sephadex G-75, высокомолекулярная фракция проявляла больший эффект и при концентрации 0.36 мг/мл на 90% снижала активность А549, HeLa, Hep-2, SPEV-2 и на 70% активность клеток линии С6 (Рис.17Б).

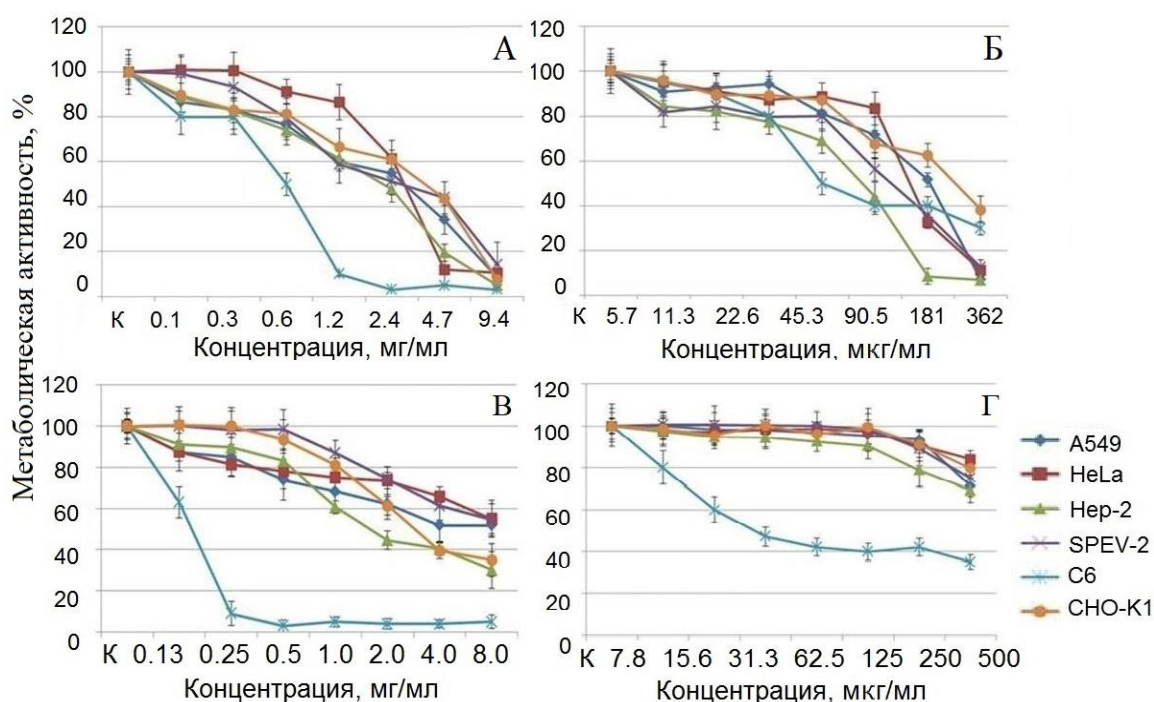
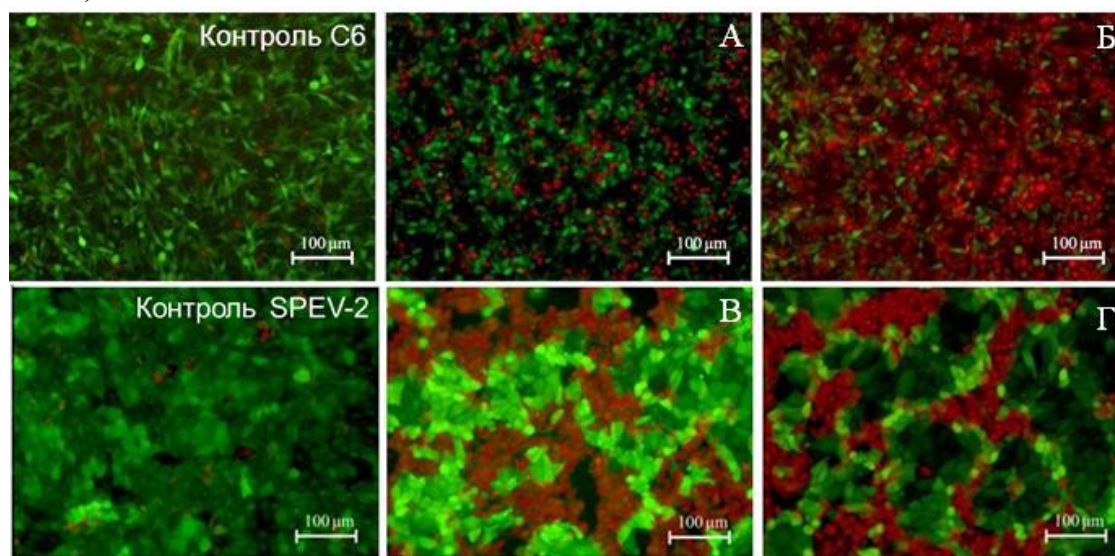


Рисунок 17 – Цитотоксичность суммарной (А, В) и высокомолекулярной (Б, Г) фракций водорастворимых гликопротеинов глубинного мицелия *G. frondosa* (А, Б) и *G. lucidum* (В, Г) по отношению к раковым клеточным линиям

Экстракт гликопротеинов мицелия *G. lucidum* при концентрации 8 мг/мл подавлял метаболическую активность А549, HeLa, Hep-2 и SPEV-2 на 70–40%, при 2 мг/мл на 50–20%, что немного слабее фракций *G. frondosa*. Воздействие

экстракта из *G. lucidum* на линию С6 было очень велико, наблюдалось полное подавление активности клеток при 0.25 мг/мл (Рис.17В). Высокомолекулярная фракция была активна на 40–10% в диапазоне от 0.5 до 0.125 мг/мл в отношении всех линий, кроме С6, где отмечено подавление активности клеток на 60–40% при концентрациях 0.5–0.02 мг/мл (Рис.17Г). Сравнительные исследования показали, что гликопротеины глубинного мицелия не уступают по цитотоксичности гликопротеинам и полисахаридам плодовых тел, а в отношении линии С6, значительно их превосходят (Vetchinkina *et al.*, 2022).

Жизнеспособность раковых клеток при воздействии грибных препаратов была проанализирована с применением световой микроскопии и методов дифференциального окрашивания по типу «мертвый-живой», данные были сопоставимы с результатами МТТ-теста. Йодистый пропидий проникает через мембраны только мертвых клеток, что позволяет селективно окрасить клеточную популяцию (красный цвет). Живые клетки окрашивались зеленым красителем. Экстракт мицелия *G. frondosa* при 0.5 мг/мл подавляла активность клеток С6 на 50% (Рис.18А). При той же концентрации гликопротеины *G. lucidum* подавляли активность С6 на 90% (Рис.18Б). Низкомолекулярные фракции *G. frondosa* и *G. lucidum* при 7 мг/мл подавляли активность SPEV-2 на 50 и 40%, соответственно (Рис.18В,Г).



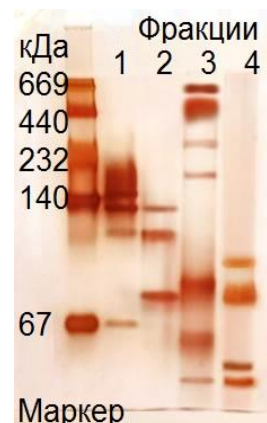
Окраска пропидий йодидом и CellTracker™ CM-DiI Dye; масштаб – 100 мкм.

Рисунок 18 – Цитотоксичность фракций гликопротеинов *G. frondosa* (А, В) и *G. lucidum* (Б, Г) по отношению к линии С6 (А, Б) и к линии SPEV-2 (В, Г)

6.2. Цитотоксичность высокоочищенных внутриклеточных гликопротеиновых фракций из глубинного мицелия *L. edodes*.

Суммарная фракция гликопротеинов *L. edodes* с концентрацией выше 10 мг/мл на 40–90% подавляла дыхательную активность всех исследуемых клеточных линий. Наименьшее цитотоксическое действие экстракт оказывал на HeLa (40%), наибольшее угнетение дыхательной активности (95%) проявлялось в отношении C6 при концентрации 11.4 мг/мл (Vetchinkina *et al.*, 2022).

По мере разделения и очистки гликопротеинов *L. edodes*, цитотоксическое действие на опухолевые клетки усиливалось. Это справедливо в отношении белковых фракций, элюированных с ионообменного носителя при 0.1–0.4 М концентрации NaCl (Рис.19). Наибольшей способностью к подавлению активности фракции обладали в отношении клеток C6, A549 и SPEV-2 (Рис.20). Для белковой фракции 0.1–0.2 М NaCl при концентрации 1 мг/мл доля жизнеспособных клеток этих линий составляла 5–40% (Рис.20А), для фракции 0.3–0.4 М NaCl при той же концентрации активными были 5–20% раковых клеток (Рис.20Б). Угнетать активность Hep-2 и HeLa, гликопротеины были способны на уровне 30–40% при концентрации 1 мг/мл (Рис.20А,Б).



Трис-HCl (1), 0.1-0.2М NaCl (2), 0.3-0.4М NaCl (3), 0.5-2М NaCl (4); нативный электрофорез в ПААГ, окраска AgNO₃

Рисунок 19 – Гликопротеины *L. edodes* после ионообменной хроматографии

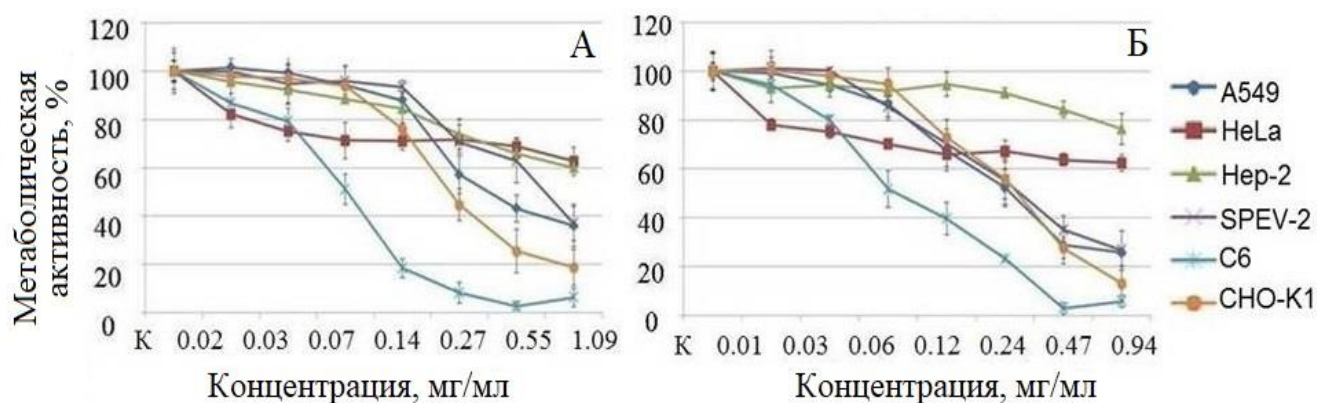
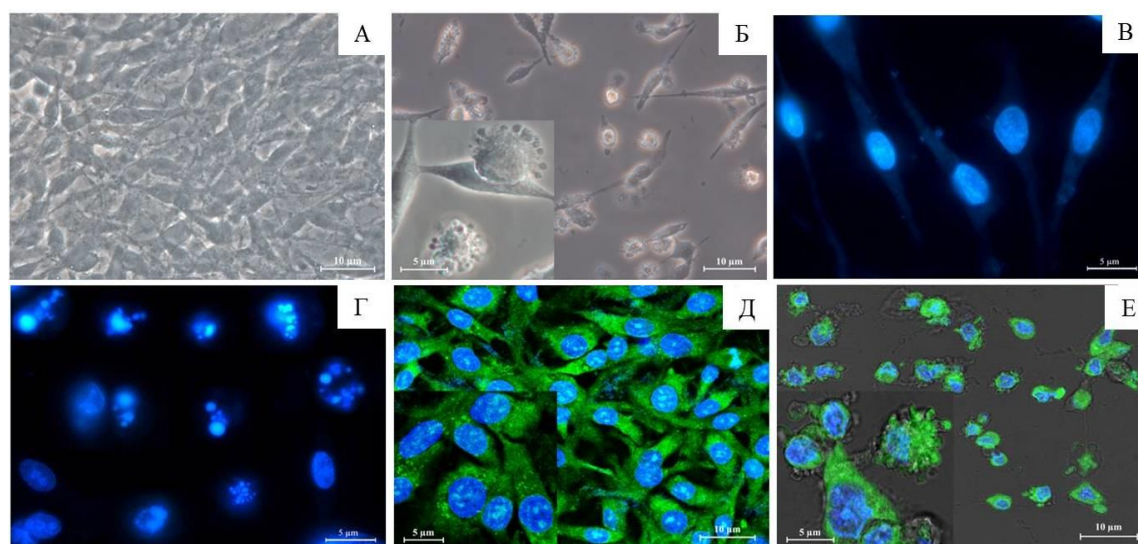


Рисунок 20 – Цитотоксичность фракций гликопротеинов глубинного мицелия *L. edodes* по отношению к раковым клеточным линиям

Важно, что гликопротеины, способные значительно снижать активность раковых клеток, обладали высокой лектиновой активностью (Vetchinkina *et al.*, 2022). Благодаря способности узнавать гликозильные лиганды поверхности клетки и избирательно и обратимо связываться с углеводами, лектины могут узнавать измененные (перегликозилированные) поверхности клеток при их трансформации (малигнизации), в этом заключается слабость опухолевой клетки: она дает «обнаружить» себя (Chernikov *et al.*, 2017). Уже сейчас на основе лектинов создаются коммерческие тест-системы некоторых онкопатологий (Li and King, 2012; Silva *et al.*, 2014). Причастность лектинов к активации широкого спектра защитных реакций организма, наличие противоопухолевой и иммуностимулирующей активностей, открывает большой потенциал к их применению в диагностике и терапии раковых заболеваний.

6.3. Апоптотические морфологические особенности клеток глиомы крысы (С6), подвергнутые воздействию гликопротеинов *L. edodes*.

Высокие концентрации грибных гликопротеинов приводили к полному ингибированию дыхательной активности, связанной с деградацией ключевых внутриклеточных ферментов, раковых клеток. С помощью флуоресцентной,



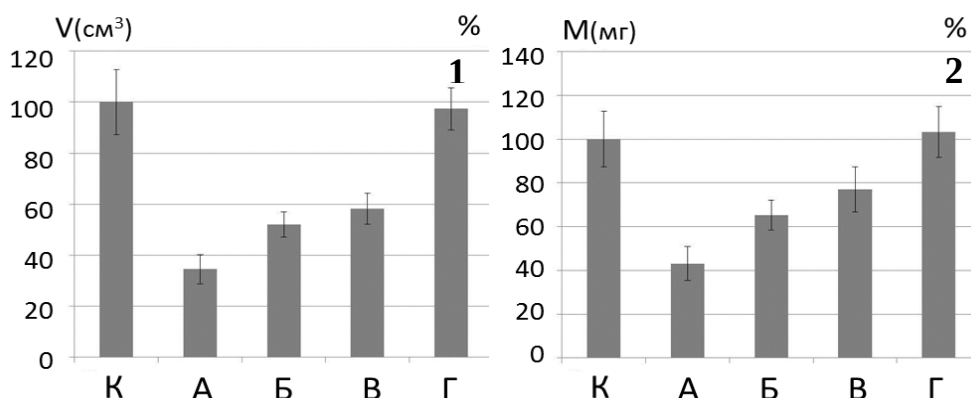
Световая микроскопия: А – контроль, Б – клетки под воздействием гликопротеинов. Флуоресцентная микроскопия: В – контроль, Г – ядра клеток под воздействием. Конфокальная микроскопия: Д – контроль, Е – клетки с морфологическими изменениями; окраска ядер реагентом Hoechst 33342, окраска цитоплазмы акридиновым оранжевым; масштаб – 5, 10 мкм.

Рисунок 21 – Апоптотические морфологические особенности клеток глиомы (С6), под воздействием гликопротеинов глубинного мицелия *L. edodes*

конфокальной микроскопии и дифференциальной окраски ядер реагентом Hoeschst 33342 и цитоплазмы акридиновым оранжевым, была выявлена смерть раковых клеток путем апоптоза. В отличие от контроля (Рис.21А,В,Д), клетки С6 имели типичные апоптотические особенности: сморщивание клеток, наличие апоптотических телец в цитоплазме (Рис.21Б,Е), изменение формы ядер с дефрагментацией хроматина (Рис.21Г) (Vetchinkina *et al.*, 2022).

6.4. Изменение объема и массы опухоли рака почки РА под воздействием гликопротеинов глубинного мицелия и плодовых тел базидиомицетов *in vivo*.

Противоопухолевую активность экстрактов гликопротеинов из глубинного мицелия *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum* выявляли на белых крысах линии Wistar путем подкожного введения в лопаточную область суспензии клеток рака почки РА. После перевивки, начиная с 6 дня, отмечали задержку роста объема опухоли в опытных группах. На 14 сутки после перевивки объем опухоли в опытной группе крыс, получавшей экстракт *L. edodes* (А) был в 3 раза меньше, по сравнению с контрольной группой, и в 2 раза меньше в группах (Б) и (В), в которых животные получали экстракты *G. frondosa* и *G. lucidum*. Экстракт плодового тела *G. lucidum* (Г) оказывал подавляющее действие на рост опухоли только в первые 10 суток, затем объем опухоли увеличивался до показаний контрольной группы (Рис.22.1). Так же и масса опухоли, благодаря



К – группа крыс, получавших физраствор (контроль); группа крыс, получавших гликопротеины глубинного мицелия *L. edodes* (А), *G. frondosa* (Б), *G. lucidum* (В) и плодовых тел *G. lucidum* (Г).

Рисунок 22 – Изменение объема (1) и массы (2) опухоли рака почки РА под воздействием гликопротеиновых экстрактов базидиомицетов

воздействию гликопротеиновых экстрактов мицелия *L. edodes* (А), практически не увеличивалась и была на момент окончания эксперимента более чем в 2 раза меньше по сравнению с контролем (Рис.22.2). В опытных группах Б и В также была отмечена положительная тенденция (Рис.22.1,2) (Vetchinkina *et al.*, 2016).

Гистологические исследования показали дистрофические изменения в опухолевых тканях рака почки РА, отмечена инфильтрация лимфоцитами, нейтрофилами, определялся отек в ткани опухоли и полнокровие сосудов, встречались клетки с признаками апоптоза (пикнотичные ядра, фрагментация ядер). Некрозы в опухоли составляли от 30 до 80% от площади срезов. При соотнесении этих результатов и данных, полученных при сравнении массы и объема опухоли с группой контрольных животных, было выявлено достоверное замедление темпов роста опухоли в 2–3 раза (Vetchinkina *et al.*, 2016; 2022).

6.5. Изучение действия гликопротеинов из глубинного мицелия базидиомицетов на иммунную и пищеварительную системы животных *in vivo*

При исследовании тканей мезентериальных лимфатических узлов были выявлены изменения, указывающие на активацию иммунной системы животных, отмечена гиперплазия лимфоидной ткани, поверхностное увеличение светлых зародышевых центров, наблюдали макрофагальную реакцию. Гистологические исследования слизистой и подслизистой слоев желудка животных показали отсутствие токсического действия при пероральном введении. Следовательно, данный путь может быть рекомендован при лечении грибными гликопротеинами (Ветчинкина и др., 2015; Vetchinkina *et al.*, 2016; 2022).

Учитывая совокупность биологической активности гликопротеинов глубинного мицелия *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum*, представляется перспективным разработка на их основе противоопухолевых препаратов. Лекарственные препараты из подобного природного сырья, могут замедлять и/или останавливать рост опухолей, предотвращать образование метастазов, уменьшать побочные эффекты химио- и радиотерапии.

ГЛАВА 7. Биологический «зеленый» синтез наночастиц золота, серебра и селена почвенными и ксилотрофными базидиомицетами.

Наночастицы (НЧ) находят самое разнообразное применение в медицине, биологии и технологии, и в последнее время область их использования расширяется. Возрастает интерес к безопасному для окружающей среды и человека, «зеленому» синтезу, с применением разных биологических объектов. В большинстве исследований используются бактерии и микроскопические грибы, многие из которых патогены. Перспективны для биосинтеза НЧ макромицеты, которые широко используются для получения продуктов питания, пищевых добавок и лекарственных препаратов. Они не являются токсичными или патогенными, обладают мощной ферментной системой, способны давать большой объем биомассы (Wasser, 2014; Ghobad-Nejhad *et al.*, 2024).

7.1. Биоредукция соединений HAuCl_4 , AgNO_3 и Na_2SeO_3 базидиомицетами с образованием наночастиц.

Установлена способность базидиомицетов *P. ostreatus*, *L. edodes*, *G. frondosa*, *G. lucidum*, *A. bisporus* и *A. arvensis*, их внутриклеточных экстрактов и отдельных ферментов (фенолоксидаз) к биоредукции соединения золота (HAuCl_4), серебра (AgNO_3) и селена (Na_2SeO_3) с образованием НЧ. Исходя из результатов, НЧ имели разную форму и размер, от простых наносфер до сложных и необычных структур, что зависело от типа метаболитов и вида грибов (Рис.23–25) (Ветчинкина и др., 2013; Vetchinkina *et al.*, 2013; 2014; 2016; 2017; 2018; 2019).

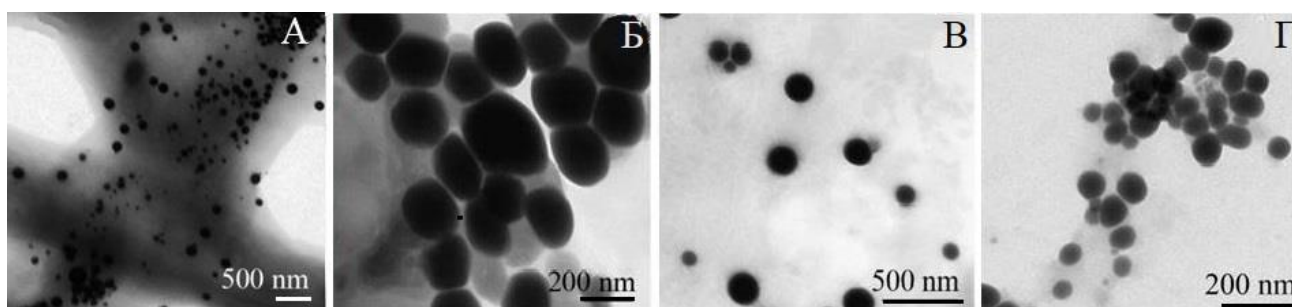


Рисунок 23 – ПЭМ НЧ селена (Se^0) биообразованных из Na_2SeO_3 с помощью мицелия *L. edodes* (А), культуральной жидкости *A. arvensis* (Б), внутриклеточных экстрактов *G. frondosa* (В) и *A. bisporus* (Г); масштаб – 200, 500 нм.

Все базидиомицеты и их экстракты участвовали в биодеградации Na_2SeO_3 с образованием однородных НЧ, представленных исключительно наносферами, диаметром от 20 до 500 нм (Рис.23).

При глубинном культивировании на среде, содержащей AgNO_3 , базидиомицеты были способны к синтезу НЧ серебра (Рис.24). НЧ сферической формы сверхмалого размера 1–10 нм, получали с использованием внутриклеточных экстрактов, например, *P. ostreatus* и *A. arvensis* (Рис.24Б,В).

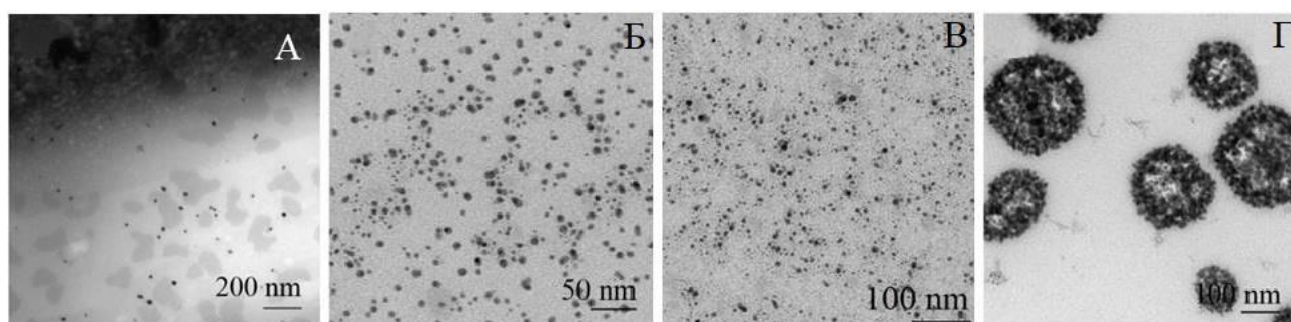


Рисунок 24 – ПЭМ НЧ серебра (Ag^0), биообразованных из AgNO_3 с помощью мицелия *A. bisporus* (А), внутриклеточного экстракта *P. ostreatus* (Б) и *A. arvensis* (В) и культуральной жидкости *L. edodes* (сферические конгломераты «серебряные шарики») (Г); масштаб – 50, 100, 200 нм.

Биогенные НЧ золота разной формы и размера синтезировали все грибы, их экстракты и метаболиты (Рис.25). С помощью ферментов фенолоксидаз, выделенных методом ВЭЖХ, из мицелия *L. edodes*, получали правильные сферы от 2 до 20 нм, НЧ с такими параметрами находят наибольшее применение в биотехнологии (Рис.25В,Г).

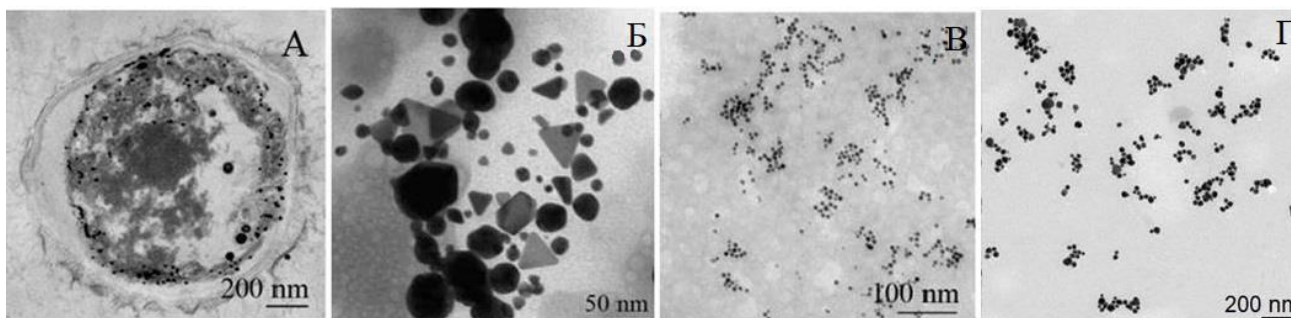


Рисунок 25 – ПЭМ НЧ золота (Au^0), биообразованных из HAuCl_4 внутри гиф *L. edodes* (А), с помощью внутриклеточного экстракта *A. bisporus* (Б), с помощью Мп-пероксидазы (В) и тирозиназы (Г) *L. edodes*; масштаб – 50, 100, 200 нм.

7.2. Характеристика биогенных наночастиц Au^0 , Ag^0 и Se^0 .

НЧ золота, серебра и селена, образованные грибами были охарактеризованы. ζ - Потенциал НЧ золота составлял от -18 до -27 мВ, серебра от 10 до -18 мВ, селена от -12 до -18 мВ, что говорит об их электростатической стабильности, что важно для применения НЧ. По данным рентгенофазового анализа металлы восстанавливались до нулевой степени окисления (Рис.26).

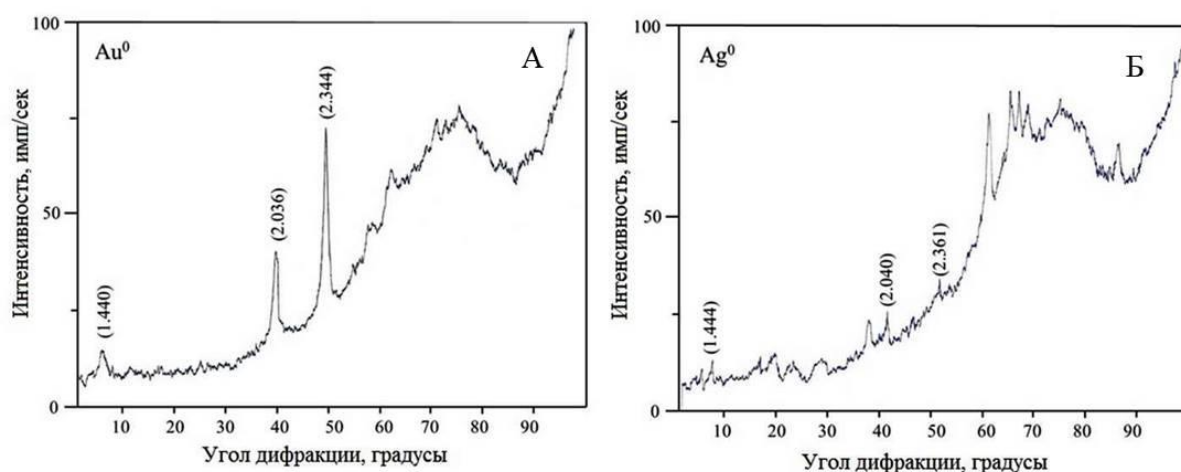


Рисунок 26 – Рентгенофазовый анализ НЧ золота (А) и серебра (Б), полученных из HAuCl_4 и AgNO_3 с помощью базидиомицета *L. edodes*

Методом дифракции электронов в выбранной области на электронном микроскопе Libra 120 были получены дифрактограммы НЧ золота и серебра с поликристаллической структурой (Рис.27А,Б), а НЧ селена с некристаллической (аморфной) структурой (Рис.27В) (Vetchinkina *et al.*, 2018).

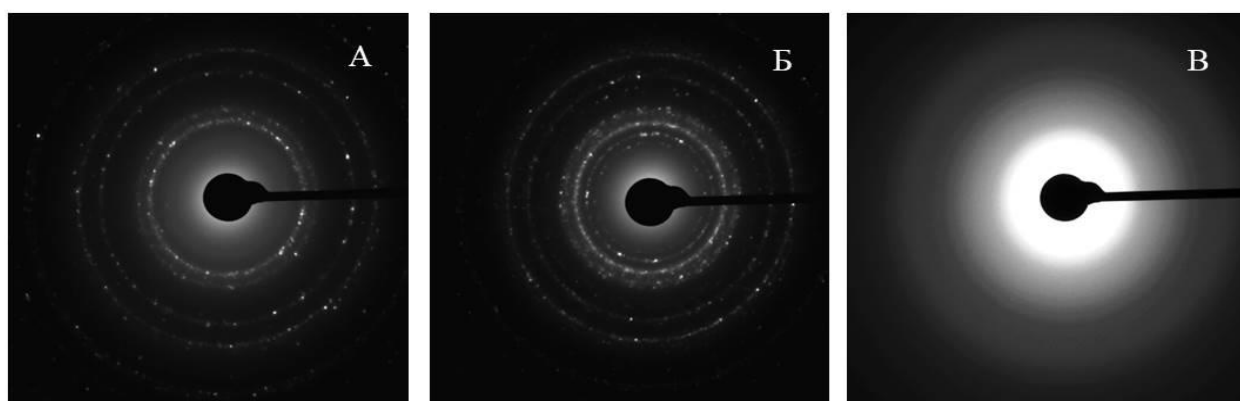


Рисунок 27 – ПЭМ на Libra 120 и электронная дифракция выбранной области (SAED), с определением структуры НЧ Au^0 (А), Ag^0 (Б) и Se^0 (В)

Согласно данным МТТ-теста, микогенные НЧ Au^0 практически не снижали дыхательную активность клеток Vero и HeLa после 24 часов инкубации, что говорит о низком токсическом эффекте НЧ, что важно для их применения. НЧ Ag^0 не были цитотоксичны от 1 до 10 мкг/мл (Vetchinkina *et al.*, 2018).

7.3. Способ получения наночастиц благородных металлов (Au^0 , Ag^0) с заданными свойствами и условия влияния на их параметры.

Первоочередной задачей нанотехнологии является разработка эффективных методик получения монодисперсных НЧ определенного химического состава, размера и формы. Был разработан метод получения НЧ благородных металлов, приводящий к сокращению продолжительности и упрощению процесса биологического синтеза НЧ, путем изменения таких параметров, как возраст грибной культуры и времени инкубации. С помощью данного запатентованного метода можно получать однородные сферические НЧ Au^0 и Ag^0 диаметром около 20 нм, которые широко используются в биотехнологии (Рис.28) (Vetchinkina *et al.*, 2018; 2019; Ветчинкина и др., 2019).

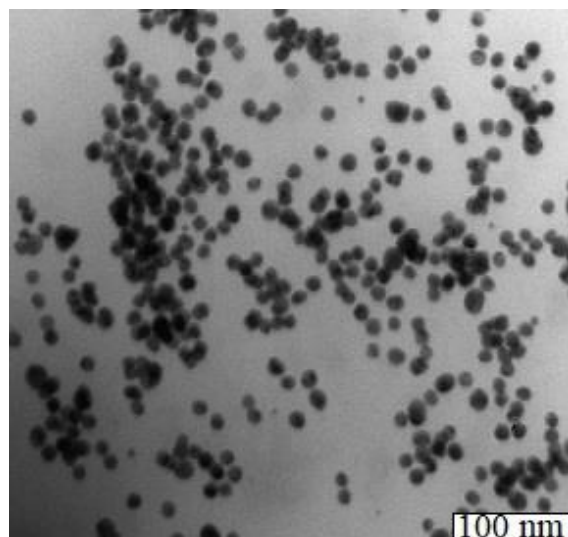


Рисунок 28 – ПЭМ НЧ Au^0 , полученных из HAuCl_4 с использованием культуральной жидкости 7-суточной культуры *L. edodes* при 30 минутах инкубирования; масштаб – 100 нм

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа вносит существенный вклад в молекулярно-физиологическую картину онтогенеза базидиомицетов. Охарактеризованы особенности морфологии, ультраструктуры и биохимического состава клеток мицелия на разных стадиях онтогенеза *P. ostreatus*, *A. mellea*, *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum*, которые отражают приспособление грибов к условиям среды и необходимы при морфогенезе. Особое внимание уделено коричневой мицелиальной пленке – стадии, предшествующей образованию базидиом. Отмечено, что для культур *L. edodes*, *A. mellea* и *G. frondosa* формирование данной структуры было необходимо для последующего плодоношения.

Впервые в мицелиальных пленках выявлена высокая активности лектинов и ферментов пектатлиаз, пептидаз, амилаз, инвертаз, хитиназ, ксиланаз, целлюлаз, эндоглюканаз, глюкозидаз и галактозидаз, лакказ, тирозиназ, лигнин пероксидаз, Мп-пероксидаз, входящих в целлюлозо- и лигнинолитический комплекс, а также участвующих в биогенезе клеточной стенки базидиомицетов.

Проведено секвенирование транскриптомов *L. edodes* на четырех стадиях жизненного цикла, в результате анализа ДЭГ, охарактеризованы особенности метаболизма грибных клеток в процессе онтогенеза. На стадии коричневой мицелиальной пленки по сравнению с непигментированным мицелием выявлена активация метаболических путей, ответственных за передачу сигналов, управление клеточного ответа и адаптацию, регулировку внутриклеточных процессов. Активировались категории, связанные с биосинтезом липидов и пигментов, транспортными и секреторными системами, регуляцией межклеточных контактов, дифференцировкой клеток, биогенезом клеточных стенок, регулированием цитоскелета, инициацией процесса размножения.

На основе полученных результатов, впервые выявлена роль коричневой мицелиальной пленки *L. edodes*, как метаболически активной стадии онтогенеза, предшествующей и необходимой для плодоношения базидиомицета.

Изучение гликопротеинов глубинного мицелия *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum*, позволило выявить достоверное снижение метаболической активности

раковых клеточных линий A549, Hep-2, HeLa, SPEV-2 и C6. Наибольшую цитотоксичность проявляли фракции *G. frondosa*, ингибируя на 90–100% активность всех раковых клеток при 0.4 мг/мл. Гликопротеиновые фракции *G. lucidum* на 100% подавляли рост клеток C6 при 0.25 мг/мл. Выявлены фракции *L. edodes*, обладающие наибольшим цитотоксическим действием, при 0.5 мг/мл жизнеспособность теряли 80–100% клеток C6, A549 и SPEV-2. Гликопротеины не уступали по противораковой активности полисахаридам плодовых тел, а в отношении C6, значительно их превосходили. Дифференциальная окраска ядер и цитоплазмы, визуализировала смерть раковых клеток путем апоптоза.

Фракции гликопротеинов, способных значительно снижать метаболическую активность раковых клеток, обладали высокой лектиновой активностью, что важно, поскольку лектины могут быть использованы в диагностике и терапии различных заболеваний, в частности злокачественных опухолей.

Обнаружены дистрофические изменения и некротические процессы в опухоли почки РА у животных, получавших в качестве лечения экстракты из глубинного мицелия *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum*. Отмечена активация иммунной системы и отсутствие токсического действия на слизистую желудка. Полученные данные могут служить основанием для разработки на их основе средств, перспективных в комплексной терапии онкологических заболеваний.

Существенно расширены представления о «зеленом» синтезе наночастиц (НЧ) с помощью метаболитов высших грибов. Под действием внутриклеточных экстрактов, культуральных жидкостей и отдельных метаболитов базидиомицетов изучено восстановление соединений металлов и металлоидов HAuCl_4 , AgNO_3 и Na_2SeO_3 до элементного состояния, с образованием НЧ.

Впервые показана способность фенолоксидаз грибов к биоредукции соединений металлов с синтезом НЧ. Микосинтез НЧ с помощью бесклеточных экстрактов и метаболитов упрощает процедуру их очистки и выделения. Способность грибов внутриклеточно синтезировать и накапливать НЧ позволит, например, получать высокоэффективные пищевые добавки на основе обогащенного селеном мицелия.

Разработан метод получения НЧ благородных металлов, приводящий к сокращению времени и упрощению процесса синтеза НЧ, путем изменения параметров возраста культуры и времени инкубации. С помощью данного запатентованного метода можно получать устойчивые коллоиды однородных сферических НЧ металлов, которые широко используются в биотехнологии.

ВЫВОДЫ

1. Стадии развития (непигментированный мицелий, мицелиальная пленка, примордий и плодовое тело) базидиальных макромицетов *P. ostreatus*, *A. mellea*, *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum* характеризуются следующими особенностями: изменениями в цитодифференцировке мицелия, ультраструктуре клеток, в соотношении содержания белков, углеводов и пигментов в клетках грибов.

2. В коричневой мицелиальной пленке базидиомицетов, по сравнению с непигментированным мицелием, обнаружена высокая активность ферментов целлюлозолитического и лигнинолитического комплексов, участвующих в биогенезе клеточной стенки, а также лектинов, по сравнению с непигментированным мицелием, что указывает на активный метаболизм данной морфоструктуры и позволяет выделить её формирование как стадию онтогенеза в подготовке грибов к плодоношению.

3. Впервые, с аннотацией дифференциально экспрессирующихся генов, дана характеристика транскриптомных профилей стадий развития *L. edodes* от непигментированного мицелия к образованию коричневой мицелиальной пленки, примордия и плодового тела. Выявлены особенности в работе и регуляции 140 метаболических путей в ходе онтогенеза базидиомицета, в том числе связанных с синтезом биологически активных метаболитов.

4. Транскрипционная активность генов, кодирующих белки сигнальных процессов, переключателей развития, функциональных ферментов и лектинов коррелировала с данными биохимического анализа (ферментативной и гемагглютинирующей активностями, данными ПЦР-РВ анализа, электрофореза).

5. Впервые установлено, что водорастворимые внутриклеточные гликопротеины мицелия *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum*, полученного при глубинном культивировании, снижают *in vitro* метаболическую активность раковых клеточных линий A549, Hep-2, HeLa, SPEV-2 и C6. Эти соединения проявляют противоопухолевую активность *in vivo* в отношении перевитого рака почки РА, вызывая дистрофические изменения клеток и некротические процессы в опухоли. У лабораторных животных при их применении происходит активация иммунной системы при отсутствии токсического действия на слизистую желудочно-кишечного тракта.

6. Внеклеточные и внутриклеточные метаболиты базидиомицетов *P. ostreatus*, *L. edodes*, *G. frondosa*, *G. lucidum*, *A. bisporus* и *A. arvensis* восстанавливают соединения металлов и металлоидов до элементного состояния, с образованием наночастиц разных форм и размеров. Впервые показана способность фенолоксиляющих ферментов базидиомицетов к редукции соединений металлов с образованием наночастиц. Разработан способ получения наночастиц золота и серебра с применением культуральной жидкости *L. edodes*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список публикаций в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности 1.5.18. Микология (биологические науки):

1. Ветчинкина Е.П., Степанова Л.В., Никитина В.Е. Выделение и характеристика биотехнологически значимого фермента – лакказы из ксилотрофных базидиомицетов разных экологических групп // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2009. – № 2. – С. 167–168. EDN: UJPBAE. Импакт-фактор 0,38 (РИНЦ); 0,1/0,05 п.л. (здесь и далее приведен общий объем работы / вклад автора в печатных листах).

2. Никитина В.Е., Ветчинкина Е.П., Пономарева Е.Г., Гоголева Ю.В. Фенолоксидазная активность бактерий рода *Azospirillum* // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 3. – С. 344–351. EDN: MSQKJJ. Импакт-фактор 1,127 (РИНЦ); 0,76/0,38 п.л.

Nikitina V.E., Vetchinkina E.P., Ponomareva E.G., Gogoleva Y.V. Phenol oxidase activity in bacteria of the genus *Azospirillum* // Microbiology. – 2010. – Vol. 79, № 3. – pp. 327–333. EDN: MXECIP. Импакт-фактор 1,3 (JIF); 0,74/0,37 п.л.

3. Ветчинкина Е.П., Пономарева Е.Г., Гоголева Ю.В., Никитина В.Е. Тирозиназы подвижных штаммов бактерий рода *Azospirillum* // Микробиология. – 2013. – Т. 82, № 2. – С. 157–161. EDN: PWNCNT. Импакт-фактор 1,127 (РИНЦ); 0,56/0,41 п.л.

Vetchinkina E.P., Ponomareva E.G., Gogoleva Y.V., Nikitina V.E. Tyrosinases of motile *Azospirillum* strains // Microbiology. – 2013. – Vol. 82, № 2. – P. 142–146. EDN: RFFTSF. Импакт-фактор 1,3 (JIF); 0,52/0,39 п.л.

4. Ветчинкина Е.П., Буров А.М., Агеева М.В., Дыкман Л.А., Никитина В.Е. Биологический синтез золотых наночастиц ксилотрофным базидиомицетом *Lentinula edodes* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2013. – Т. 49, № 4. – С. 402–408. EDN: QBRHPX. Импакт-фактор 1,174 (РИНЦ); 0,67/0,39 п.л.

Vetchinkina E.P., Burov A.M., Ageeva M.V., Dykman L.A., Nikitina V.E. Biological synthesis of gold nanoparticles by the xylophilic basidiomycete *Lentinula edodes* // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2013. – Vol. 49, № 4. – P. 406–411. EDN: RFHTUL. Импакт-фактор 1,1 (JIF); 0,63/0,41 п.л.

5. Vetchinkina E.P., Loshchinina E.A., Kursky V.F., Nikitina V.E. Reduction of organic and inorganic selenium compounds by the edible medicinal basidiomycete *Lentinula edodes* and the accumulation of elemental selenium nanoparticles in its mycelium // Journal of Microbiology. – 2013. – Vol. 51, № 6. – P. 829–835. EDN: SLJJMF. Импакт-фактор 2,6 (JIF); 0,83/0,56 п.л.

6. Vetchinkina E.P., Loshchinina E.A., Burov A.M., Dykman L.A., Nikitina V.E. Enzymatic formation of gold nanoparticles by submerged culture of the

basidiomycete *Lentinus edodes* // Journal of Biotechnology. – 2014. – Vol. 182–183, № 1. – P. 37–45. EDN: SKTRWN. Импакт-фактор 3,9 (JIF); 1,12/0,75 п.л.

7. **Ветчинкина Е.П.**, Горшков В.Ю., Агеева М.В., Гоголев Ю.В., Никитина В.Е. Активность и экспрессия генов лакказы, тирозиназы, глюканазы и хитиназы в процессе морфогенеза *Lentinus edodes* // Микробиология. – 2015. – Т. 84, № 1. – С. 78–89. EDN: JICZHH. Импакт-фактор 1,127 (РИНЦ); 0,54/1,08 п.л.

Vetchinkina E.P., Gorshkov V.Y., Ageeva M.V. Gogolev Y.V., Nikitina V.E. Activity and expression of the laccase, tyrosinase, glucanase and chitinase genes in the morphogenesis of *Lentinus edodes* // Microbiology. – 2015. – Vol. 84, № 1. – P. 49–58. EDN: UFPEUF. Импакт-фактор 1,3 (JIF); 0,94/0,47 п.л.

8. **Ветчинкина Е.П.**, Лощинина Е.А., Курский В.Ф., Никитина В.Е. Биологический синтез наночастиц селена и германия ксилотрофными базидиомицетами // Прикладная биохимия и микробиология. – 2016. – Т. 52, № 1. – С. 103–114. EDN: VCPQOL. Импакт-фактор 1,174 (РИНЦ); 0,94/0,65 п.л.

Vetchinkina E.P., Loshchinina E.A., Kurskyi V.F., Nikitina V.E. Biological synthesis of selenium and germanium nanoparticles by xylophilic basidiomycetes // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2016. – Vol. 52, № 1. – P. 87–97. EDN: WRGQLR. Импакт-фактор 1,1 (JIF); 0,89/0,63 п.л.

9. **Vetchinkina E.P.**, Shirokov A.A., Bucharskaya A.B., Navolokin N.A., Prilepskii A.Y., Burov A.M., Maslyakova G.N., Nikitina V.E. Antitumor activity of extracts from medicinal basidiomycetes // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2016. – Vol. 18, № 11. – P. 955–964. EDN: XZPKSN. Импакт-фактор 1,4 (JIF); 0,82/0,41 п.л.

10. **Vetchinkina E.P.**, Loshchinina E.A., Vodolazov I.R., Kursky V.F., Dykman L.A., Nikitina V.E. Biosynthesis of nanoparticles of metals and metalloids by basidiomycetes. Preparation of gold nanoparticles by using purified fungal phenol oxidases // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2017. – Vol. 101, № 3. – P. 1047–1062. EDN: YUUQCH. Импакт-фактор 4,3 (JIF); 1,48/1,03 п.л.

11. **Vetchinkina E.P.**, Kupryashina M.A., Gorshkov V.Y., Ageeva M.V., Gogolev Y.V., Nikitina V.E. Alteration in the ultrastructural morphology of mycelial hyphae and the dynamics of transcriptional activity of lytic enzyme genes during basidiomycete morphogenesis // Journal of Microbiology. – 2017. – Vol. 55, № 4. – P. 280–288. EDN: YVCEZD. Импакт-фактор 2,6 (JIF); 1,05/0,61 п.л.

12. **Vetchinkina E.P.**, Gorshkov V.Y., Ageeva M.V., Gogolev Y.V., Nikitina V.E. Brown mycelial mat as an essential morphological structure of the shiitake medicinal mushroom *Lentinus edodes* (Agaricomycetes) // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2017. – Vol. 19, № 9. – P. 817–827. EDN: XNIRVD. Импакт-фактор 1,4 (JIF); 0,89/0,65 п.л.

13. Nikitina V.E., Loshchinina E.A., **Vetchinkina E.P.** Lectins from mycelia of basidiomycetes // International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – Vol. 18, № 7. – P. 1334. EDN: TJITPF. Импакт-фактор 4,9 (JIF); 1,76/0,89 п.л.

14. **Vetchinkina E.P.**, Loshchinina E.A., Kupryashina M.A., Burov A.M., Pylaev T.E., Nikitina V.E. Green synthesis of nanoparticles with extracellular and

intracellular extracts of basidiomycetes // PeerJ. – 2018. – Vol. 2018, № 6. – P. e5237. EDN: VBXYLC. Импакт-фактор 2,4 (JIF); 1,37/0,68 п.л.

15. Loshchinina E.A., **Vetchinkina E.P.**, Kupryashina M.A., Kursky V.F., Nikitina V.E. Nanoparticles synthesis by *Agaricus* soil basidiomycetes // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2018. – Vol. 126, № 1. – P. 44–52. EDN: EKHIYX. Импакт-фактор 2,9 (JIF); 0,82/0,41 п.л.

16. Губаев Р.Ф., Горшков В.Ю., Гапа Л.М., Гоголева Н.Е., **Ветчинкина Е.П.**, Гоголев Ю.В. Алгоритм для физиологической интерпретации данных транскриптомного профилирования немодельных организмов // Молекулярная биология. – 2018. – Т. 52, № 4. – С. 576–590. EDN: XVWPIL. Импакт-фактор 1,118 (РИНЦ); 1,55/0,78 п.л.

Gubaev R.F., Gorshkov V.Y., Gapa L.M., Gogoleva N.E., **Vetchinkina E.P.**, Gogolev Y.V. Algorithm for physiological interpretation of transcriptome profiling data for non-model organisms // Molecular Biology. – 2018. – Vol. 52, № 4. – P. 497–509. EDN: PAVYBN. Импакт-фактор 1,2 (JIF); 1,47/0,74 п.л.

17. **Vetchinkina E.P.**, Loshchinina E.A., Kupryashina M.A., Burov A.M., Nikitina V.E. Shape and size diversity of gold, silver, selenium, and silica nanoparticles prepared by green synthesis using fungi and bacteria // Industrial and Engineering Chemistry Research. – 2019. – Vol. 58, № 37. – P. 17207–17218. EDN: HWGNOK. Импакт-фактор 3,9 (JIF); 1,58/0,98 п.л.

18. **Vetchinkina E.P.**, Fomin A.S., Navolokin N.A., Shirokov A.A. Proteins and polysaccharides of medicinal basidiomycete *Lentinus edodes* vegetative mycelium and fruiting bodies display cytotoxicity towards human and animal cancer cell lines // International Journal of Biological Macromolecules. – 2022. – Vol. 195. – P. 398–411. EDN: UHPUGB. Импакт-фактор 8,5 (JIF); 1,88/1,31 п.л.

19. **Vetchinkina E.P.**, Meshcherov A.R., Gorshkov V.Y. Differential activity of the extracellular phenoloxidases in different strains of the phytopathogenic fungus, *Microdochium nivale* // Journal of Fungi. – 2022. – Vol. 8, № 9. – P. 918. EDN: XEHFYR. Импакт-фактор 4 (JIF); 1,48/0,74 п.л.

20. Loshchinina E.A., **Vetchinkina E.P.**, Kupryashina M.A. Diversity of biogenic nanoparticles obtained by the fungi-mediated synthesis: A review // Biomimetics. – 2023. – Vol. 8, № 1. – P. 1. EDN: NFLSZS. Импакт-фактор 3,9 (JIF); 3,38/1,69 п.л.

21. Loshchinina E.A., **Vetchinkina E.P.**, Kupryashina M.A. Diversity of mycogenic oxide and chalcogenide nanoparticles: A review // Biomimetics. – 2023. – Vol. 8, № 2. – P. 224. EDN: IWZWHY. Импакт-фактор 3,9 (JIF); 2,75/1,35 п.л.

22. **Ветчинкина Е.П.**, Горшков В.Ю. Биodeградация синтетических красителей аскомицетами *Microdochium nivale* // Агрохимия. – 2025. – № 2. – С. 84–91. EDN: VAOYTA. Импакт-фактор 1,18 (РИНЦ); 0,77/0,67 п.л.

23. **Vetchinkina E.P.** Comparative characteristics of mycelial mats of xylotrophic Basidiomycetes // Mycological Progress. – 2025. – Vol. 24, № 1. – P. 47. EDN: TSLMZH. Импакт-фактор 3 (JIF); 2,21/2,11 п.л.

Публикации в иных изданиях:

24. **Ветчинкина Е.П.**, Селиванов Н.Ю., Никитина В.Е. Характеристика белков, специфичных для стадии коричневой мицелиальной пленки, предшествующей плодоношению *Lentinus edodes* // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2010. – № 1. – С. 242. EDN: VMMQLS. Импакт-фактор 0,38 (РИНЦ); 0,09/0,045 п.л.

25. Галицкая А.А., **Ветчинкина Е.П.**, Никитина В.Е., Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Пучкова Т.А. Характеристика метаболитов гликопротеиновой природы ксилотрофного базидиомицета *Lentinus edodes* в условиях глубинного и поверхностного культивирования // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. – 2010. – Т. 10, Вып. 1. – С. 29–35. EDN: NRAKVX. Импакт-фактор 0,505 (РИНЦ); 0,82/0,41 п.л.

26. **Ветчинкина Е.П.**, Широков А.А., Наволокин Н.А., Бучарская А.Б., Мудрак Д.А., Тычина С.А., Корчаков Н.В., Маслякова Г.Н., Никитина В.Е. Выявление противоопухолевой активности у веществ грибного происхождения // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 1. – С. 68. EDN: TAZAVH. Импакт-фактор 0,354 (РИНЦ); 0,07/0,03 п.л.

27. **Ветчинкина Е.П.**, Купряшина М.А., Петров С.В., Горшков В.Ю., Гоголев Ю.В., Никитина В.Е. Экспрессия гена специфического фактора транскрипции *exp1* в процессе морфогенеза ксилотрофного базидиомицета *Lentinus edodes* // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. – 2015. – Т. 15, № 4. – С. 67–74. EDN: VOEAYB. Импакт-фактор 0,505 (РИНЦ); 0,83/0,42 п.л.

Получен патент:

Ветчинкина Е.П., Купряшина М.А., Лоцинина Е.А., Буров А.М., Никитина В.Е. «Способ получения наночастиц благородных металлов с помощью базидиальных макромицетов». Опубликовано 05.02.2019. № патента: RU 2679065 С1. Бюл. № 4. EDN: YONNUE; 0,88/0,44 п.л.